

STUDIA

UNIVERSITATIS
BABEŞ-BOLYAI

B i o l o g i a

C L U J - N A P O C A 2 0 0 3



STUDIA

UNIVERSITATIS BABEȘ-BOLYAI

BIOLOGIA

1

EDITORIAL OFFICE: Republicii no. 24, Cluj-Napoca, Romania. Phone: 0264-40.53.52

SUMAR – CONTENTS – SOMMAIRE – INHALT

- S. KISS, Advances in Soil Enzymology (Part IV) 3
- A. OPREA, C. SÂRBU, I. GOIA, Contributions to the Study of Vegetation in Some New Forest Reserves in the Iași County 25
- S. ONAC, V. BERCEA, M. TRIFU, Accumulation of Photosynthetic Pigments and Proteins in the Leaves of Soybean Plants Cultivated on Mine Spoils 39
- A. FLOREA, C. CRĂCIUN, C. PUICĂ, P. GHERGHEL, M.C. OPREA, Hepatotoxicitatea veninului de albine. Studiu histologic și ultrastructural • Hepatotoxicity of the Honey Bee Venom. Histological and Ultrastructural Study 49
- E. KIS, C. CRĂCIUN, Atenuarea modificărilor structurale și metabolice induse de excesul glucocorticoidic prin Propranolol • Attenuation of the Glucocorticoid Excess-Induced Structural and Metabolic Disorders by Propranolol 67
- C. PAȘCA, C. CRĂCIUN, M.I. DRIHA, Nefrotoxicitatea Nurofenului surprinsă la nivel structural și ultrastructural la șobolanul alb Wistar • Nephrotoxicity of Nurofen as Assessed at Structural and Ultrastructural Levels in White Wistar Rats 81
- J. PAPP, Comparison of the Phyllosphere Microflora of Narrow-Leaved Cattail (*Typha angustifolia*) Grown on Unpolluted and Polluted Sites 97

M.-C. LUMPERDEANU, M. DRĂGAN-BULARDA, Studii asupra unor grupe ecologice de bacterii din lacul de acumulare Gilău - județul Cluj • Studies on Some Ecological Groups of Bacteria from the Gilău Dam Lake - Cluj County	103
--	-----

Recenzii – Book Reviews – Comptes Rendus – Buchbesprechungen

L. Calancea, Nitrați, nitriți și nitrosamine. Protecția mediului și sănătatea (S. KISS).....	115
I. Petrescu (Editor), Mediul - Cercetare, Protecție și Gestiune (M. DRĂGAN-BULARDA)	116

ADVANCES IN SOIL ENZYMOLOGY (PART IV)

STEFAN KISS*

SUMMARY. – In Part IV of *Advances in Soil Enzymology* new data are added to our review article on "Enzymology of soils inoculated with microorganisms" which was published in 1999 [14]. In Part IV as in [14], the soil enzymological effects of the inoculation of natural microorganisms and of genetically engineered (modified) microorganisms are dealt with separately.

Parts I-III of *Advances in Soil Enzymology* [15] dealt with Enzymology of oil-contaminated soils; Enzymology of soils affected by industrial emissions; and Enzymology of technogenic soils, respectively, updating the review published in 1998 [16]. Part IV contains new data added to our review article on "Enzymology of soils inoculated with microorganisms" which was published in 1999 [14]. Part IV follows the structure initially established for the review article [14].

I. ENZYMOLOGY OF SOILS INOCULATED WITH NATURAL MICROORGANISMS

I.1. Soil enzyme activities as affected by inoculation of plant growth-promoting microorganisms

The field experiments described by Filippova and Kolotova [6] were carried out on a soddy-podzolic soil at the experimental farm "Preural" of the State University in Perm, in 1966 and 1967. Of the properties of the soil studied we mention its pH (4.85) and molybdenum content (0.21 mg Mo/kg soil). The test plant was broadbean (*Vicia faba* cv. Zhemchuzhin). The Nitragin used for inoculation was a *Rhizobium leguminosarum* culture isolated initially from the root nodules of broadbean plants at their bud formation stage. The plants grew on the soil mentioned above.

The experimental plots were fertilised with superphosphate (3 q/ha) and KCl (1.5 q/ha), then sown in four variants using 1. seeds soaked in water; 2. seeds soaked in 0.03% ammonium molybdate solution; 3. seeds soaked in water and inoculated with Nitragin; 4. seeds soaked in 0.03% ammonium molybdate solution and inoculated with Nitragin.

* Babeș-Bolyai University, Department of Plant Physiology, Laboratory for Environmental Enzymology and Microbiology, 3400 Cluj, Romania. E-mail: skiss@bioge.ubbcluj.ro

At four stages of plant growth the rhizosphere soil was analysed for determination of seven enzyme activities. The results obtained in 1967 are presented in Table 1. Similar results were registered in 1966.

Table 1

Enzyme activities in the rhizosphere of broadbean plants developed from seeds not treated or treated with ammonium molybdate and not inoculated or inoculated with Nitragin [6]

Enzyme activities*	Growth stages**	Experimental variants			
		Control	Molybdenum	Nitragin	Molybdenum + Nitragin
Invertase	A	24.3	22.0	15.0	15.0
	B	54.0	39.5	52.5	65.5
	C	52.0	66.5	63.0	51.5
	D	6.8	1.7	7.5	6.3
Amylase	A	31.5	12.1	26.5	18.5
	B	7.7	3.6	4.6	5.0
	C	7.2	7.2	5.9	7.3
	D	1.8	2.3	2.3	3.2
Urease	A	1.50	2.90	1.70	4.40
	B	4.35	2.72	1.95	3.40
	C	3.60	6.12	5.10	3.74
	D	1.00	7.44	1.70	1.39
Catalase	A	2.45	3.10	2.20	3.10
	B	3.00	4.10	4.50	3.90
	C	2.10	2.80	2.20	2.50
	D	1.35	1.70	1.65	0.62
Peroxidase	A	26.5	81.0	45.0	51.5
	B	9.0	23.5	41.3	19.8
	C	6.7	18.0	21.0	12.0
	D	5.0	2.2	11.7	8.6
Polyphenol oxidase	A	25.0	45.0	32.0	71.5
	B	14.5	53.7	33.7	57.5
	C	2.1	15.0	2.3	19.2
	D	4.6	2.5	2.8	12.3
Dehydrogenase	A	14.0	34.3	16.6	24.5
	B	32.5	32.0	28.7	30.0
	C	6.3	51.0	62.7	69.7
	D	60.0	50.0	49.0	62.5

* Expression of enzyme activities: invertase and amylase – mg glucose/g soil/24 hours; urease – mg NH₃/g soil/24 hours; catalase – cm³ O₂/g soil/minute; peroxidase and polyphenol oxidase – mg purpurogallin/g soil/24 hours; dehydrogenase – mg triphenylformazan/g soil/24 hours.

** A – 3-4 – leaf stage. B – Bud formation stage. C – Flowering stage. D – Milky-waxy maturation stage.

One can see from Table 1 that the activities, excepting amylase activity, increased under the influence of Mo and Nitragin. In most cases, the increase was highest when the treatment with Mo was accompanied by inoculation of Nitragin. The growth stage, at which the activities were highest varied with the nature of enzyme, but each activity greatly decreased at the maturation stage.

It should be mentioned that the total amount of free amino acids in the rhizosphere was also highest in the Mo + Nitragin variant.

In the four experimental variants and in both years, the green biomass and seed yields of the broadbean plants presented the order: control < Nitragin < Mo < Mo + Nitragin. In other words, Mo was more efficient than Nitragin and Mo + Nitragin was the most efficient variant.

In a pot experiment, Apanasenko [2] used samples of a loamy forest soil (pH in KCl 4.15; humus content 1.45%; total N content 0.08%). The soil (8 kg/Mitscherlich pot) was sown with seeds of yellow lupine (*Lupinus luteus* cv. Khutkarastuch). The seeds were not or were inoculated with the effective N₂-fixing strains Nos. 359a and 361a or with the less effective N₂-fixing strains Nos. 365 and 400 of *Rhizobium lupini*. Invertase, polyphenol oxidase and dehydrogenase activities of the rhizosphere soil were measured during and after the growth period.

It could be deduced from the results that inoculation caused only little changes in the rhizosphere enzyme activities and there was no significant difference between the effects exerted on the rhizosphere enzyme activities by the effective and the less effective N₂-fixing strains. At the same time, only the inoculation of the effective N₂-fixing strains led to a significant increase in soil N content.

The Nitragin used by Chunderova and Ivanova [3] for inoculation of red clover (*Trifolium pratense* cv. Sivoritskii 416) seeds was prepared from strain 347a of *Rhizobium lupini* and contained 88.10⁶ cells/g. Field experiments were carried out at the state farm Belogorka (Leningrad region). The 120-m² plots were installed on soddy-podzolic loamy soils (pH in KCl 4.4-4.8; humus content 1.5-2.0%; boron content 0.3-0.5 mg and molybdenum content 0.04 mg/kg soil).

In a 3-year (1967-1969) experiment, in which soil enzyme activities were also measured, the non-inoculated and Nitragin-inoculated clover as well as barley (*Hordeum vulgare*) were the test plants. Before starting the experiment the soil was limed. During the experiment, each plot was fertilised with superphosphate and KCl at yearly rates of P₄₀K₄₀, P₃₀K₄₀ and P₃₀K₆₀, respectively. In 1968, boric acid (400 g/ha) and ammonium molybdate (200 g/ha) were also added as micronutrients. The N fertiliser was ammonium nitrate applied at rates of 0, 20, 40 and 80 kg N/ha.

The analytical data presented in Table 2 are mean values recorded in the third year of the experiment and refer to the plots not fertilised and fertilised with ammonium nitrate at the lowest rate (20 kg N/ha).

The data in Table 2 show that the clover soil was more enzyme-active than the barley soil. The increase was, in general, significant. The effect of the Nitragin-inoculated clover was stronger, but not significantly, than that of the non-inoculated clover. Measurement of the nitrification capacity gave similar results.

Table 2

Effect of non-inoculated and Nitragin-inoculated red clover plants on some enzyme activities and nitrification capacity of soil [3]

N fertiliser	Test plant	Enzyme activities*			Nitrification capacity**
		Urease	Asparaginase	Protease	
No	Barley	0.26	0.10	0.65	8.8
	Clover	0.36	0.17	0.72	13.2
	Clover + Nitragin	0.38	0.17	0.73	12.8
20 kg N/ha	Barley	0.27	0.11	0.67	8.7
	Clover	0.42	0.19	0.70	12.1
	Clover + Nitragin	0.44	0.19	0.74	12.0
LSD 0.95		0.14	0.04	0.06	3.2

* Expression of enzyme activities: urease and asparaginase – mg NH₃/g soil/24 hours; protease – mg amino-N/g soil/48 hours.

** mg NO₃/100 g soil.

The sums of the clover hay yields obtained in the three years in the variants fertilised with 0, 20, 40 and 80 kg N/ha were the following: 91.7, 93.8, 97.6 and 100.4 q/ha, respectively, with the non-inoculated clover, and 108.1, 115.8, 107.2 and 104.1 q/ha, respectively, with the Nitragin-inoculated clover.

It is evident from these crop yield data that *a*) inoculation resulted in increased yield at each N rate; *b*) the yield of the non-inoculated clover tended to increase with the N rate; *c*) the yield of the inoculated clover was increased by the lowest N rate and decreased by the higher N rates.

The 3-year experiment (1967-1969) was continued in the 1970-1972 period as a crop rotation experiment. The plants – potato, spring wheat and oats, respectively -, had increased yields, the soil enzyme activities measured (urease, asparaginase, protease, invertase, phosphatase, catalase, peroxidase, polyphenol oxidase, dehydrogenase), with the exception of peroxidase activity, were higher when in 1969 the crop was clover and not barley. Again, the inoculated clover was more efficient than the non-inoculated one.

Samoilov *et al.* [39] measured enzyme activities in organic fertilisers prepared from peat non-inoculated or inoculated with *Azotobacter* sp. The best results were obtained with a low moor peat (pH 5.2) after its liming at a rate of 5% CaO (weight/weight).

It was found in a laboratory experiment that inoculation of *Azobacter* into the limed peat led to 46.3% increase in urease activity and to 125.0% increase in catalase activity.

The limed peat was also amended with phosphorite meal. (The rate of P addition by the phosphorite amendment is not specified in the paper.) The amended peat was used for fertilisation of a soddy-podzolic soil (pH 4.0-4.2; mobile P and K

contents 5 mg P₂O₅ and 11 mg K/100 g soil) under conditions of a pot experiment. First the soil was fertilised with ammonium nitrate and KCl (0.1 g N and 0.1 g K/kg soil), then the amended peat was added at a rate of 100 g/9 kg soil. The test plant was barley.

During the growth period of the barley plants, at their tillering, inspikation and maturation stages, soil was sampled for determination of its phosphatase activity. The dry biomass and the grain yields of barley were also recorded.

The mean value of the soil phosphatase activity and the yields were higher when the soil was fertilised with the *Azotobacter*-inoculated amended peat in comparison with the effect of the non-inoculated peat. The inoculation-produced increase was 84% (soil phosphatase activity), 8.5% (dry biomass yield) and 10.4% (grain yield).

Kucharski and co-workers [18-28] carried out pot experiments, in which different test plants were used, the soil was or was not inoculated with a N₂-fixing bacterium, the plant yields were recorded and, in general, four soil enzyme activities were measured. Some details and results of the experiments are summarised in Table 3.

It is evident from Table 3 that inoculation did not affect or did increase the plant yields but its effect on soil enzyme activities was rather equivocal even in the experiments with the same plant.

Kucharski and co-workers [18-28] also studied the effect of some phytohormones and precursors on plant yields and soil enzyme activities. The compounds studied were indole-3-acetic acid (heteroauxin), benzyladenine (synthetic cytokinin), L-tryptophan (auxin precursor), adenine and isopentyl alcohol (cytokinin precursors), and L-ethionine and L-methionine (ethylene precursors). They were or were not applied in combination with inoculation of *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae* or *Azotobacter* sp. The test plants were the same as those specified in Table 3.

In these experiments the inoculated N₂-fixing bacterium was in general able to enhance the positive effect and to attenuate the negative effect exerted by some concentrations of phytohormones and precursors on plant yields and soil dehydrogenase, urease, acid and alkaline phosphatase activities.

Perotti and Pidello [37, 38] performed laboratory experiments using the associative N₂-fixing bacterium *Azospirillum brasilense* strain 7001 (streptomycin-resistant derivative of *Azospirillum brasilense* 7-ATCC 29145) and surface samples of a heavy-textured grassland (*Festuca arundinacea*) soil in Casilda, Santa Fe Province, Argentina.

The air-dried and sieved (1 mm) soil samples were placed in Petri dishes and wetted with distilled water (non-inoculated control) or with aqueous suspension of *A. brasilense*, then incubated at 20°C in the dark. During incubation, soil moisture content was kept constant.

Perotti and Pidello [37] studied soil dehydrogenase activity. The soil was sampled from the 0-12-cm layer seasonally (namely, in March, May and September). The number of inoculated *A. brasilense* cells was 2.4.10⁷/g dry soil. Dehydrogenase activity, mineral N content and number of *A. brasilense* cells were determined after 3, 10, 18, 25, 41 and 66 days of incubation.

Table 3

Plant yields and soil enzyme activities as affected by inoculation of a N₂-fixing bacterium
(I – Inoculated. N – Non-inoculated. > and < indicate significant differences at p < 0.01)

N ₂ -fixing bacterium	Plant	Yield	Soil enzyme activities				Reference
			Dehydrogenase	Urease	Acid	Alkaline	
					phosphatase		
<i>Rhizobium leguminosarum</i> biovar.viciae	Faba bean (<i>Vicia faba</i>)	I ≈ N	I > N	I ≈ N	N.D.	N.D.	18
		I ≈ N	I > N	I < N	I ≈ N	I > N	26
		I > N	I ≈ N	I < N	I ≈ N	I ≈ N	28
Azotobacter sp.	Faba bean (<i>Vicia faba</i>)	I ≈ N	I > N	I > N	N.D.	N.D.	18
		I > N	I < N	I ≈ N	I > N	I < N	27
	Carrot (<i>Daucus carota</i>)	I ≈ N	I < N	I < N	I ≈ N	I ≈ N	19
		I ≈ N	I ≈ N	I > N	I ≈ N	I > N	24
		I ≈ N	I < N	I < N	I > N	I < N	25
	Radish (<i>Raphanus sativa</i>)	I > N	I < N	I < N	I < N	I < N	20
		I ≈ N	I ≈ N	I < N	N.D.	N.D.	22
	Lettuce (<i>Lactuca sativa</i>)	I ≈ N	I ≈ N	I ≈ N	I ≈ N	I ≈ N	21
	Buckwheat (<i>Fagopyrum esculentum</i>)	I ≈ N	I > N	I < N	I > N	I ≈ N	23

N.D. – Not determined or determined, but no data published on the activity values.

Mean values of the results obtained in the seasonal determinations showed that inoculation depressed soil dehydrogenase activity during the first 18 days of incubation, but enhanced it in the 25-66-day period. There was a significant correlation between dehydrogenase activity and number of *A. brasilense* cells. The inoculation-caused increase in dehydrogenase activity in the 25-66-day period was attributed not only to the inoculated cells, but also to their stimulating effect on the global microbial activity in soil.

It was also found that in the inoculated soil dehydrogenase activity did not correlate with the NH₄⁺-N content, while the non-inoculated soil exhibited a significant negative correlation between dehydrogenase activity and NH₄⁺-N content.

Perotti and Pidello [38] studied soil urease activity. The soil samples were inoculated with no or with 10⁷ *A. brasilense* cells/g dry soil.

Urease activity was measured after 2-15 days of incubation. During the incubation urease activity decreased. The decrease in the inoculated soil was less strong than that in the non-inoculated soil. Urease activity, like dehydrogenase activity, significantly and negatively correlated with the NH₄⁺-N content only in the non-inoculated soil.

Perotti and Pidello [38] measured urease activity in γ-irradiation-sterilised, then *A. brasilense*-inoculated and incubated soil samples, too. But these investigations are not considered in our present review, which is in concordance with the initial review article [14], in which we did not consider the enzymological investigations dealing with the inoculation of microorganisms into soil samples sterilised by autoclaving.

Palma *et al.* [36] and de Caire *et al.* [4] used two cyanobacteria: *Tolypothrix tenuis* strain No. 40d and *Microchaete tenera* strain No. 13a for inoculation of a poorly drained soil with silty clay loam texture. The cyanobacterial strains were from the culture collection of the Laboratory for Biology of Cyanobacteria, University of Buenos Aires. The soil was sampled from the 0-10-cm layer at Vieytes, Province of Buenos Aires.

The air-dried and sieved (2 mm) 120-g soil samples were placed in plastic boxes, then saturated with distilled water (final weight \approx 160 g). The soil in boxes was inoculated on the surface with 6 g wet weight of *T. tenuis* or *M. tenera* (corresponding to 0.044 and 0.13 g dry weight, respectively). The control, non-inoculated soil received distilled water. Each of the three experimental variants comprised 10 repetitions (10 boxes).

The soil in boxes was incubated under fluorescent light (12-hour photoperiod), at 25°C and constant soil moisture content, for 90 days.

During incubation the cyanobacterial biomass grew producing a film that covered 60-90% of the surface with mean thickness of 2-3 mm.

After the 90-day incubation, the soil was submitted to enzymological analyses. The enzymes and mean values of their activities are specified in Table 4.

This table shows that inoculation of both cyanobacteria led to a significant ($p < 0.05$) increase in each enzyme activity, with a single exception: β -glucosidase activity in the *T. tenuis*-inoculated soil did not differ significantly from that in the non-inoculated (control) soil. At the same time, *T. tenuis*, in comparison with *M. tenera*, was significantly more efficient in increasing urease, phosphatase and dehydrogenase activities and insignificantly less efficient in increasing protease and arylsulphatase activities.

The conclusion was drawn that inoculation of cyanobacteria could be a promising cultural practice for amelioration of soils.

Table 4

Mean values of enzyme activities in soil samples inoculated or not inoculated with cyanobacteria [4]

Enzyme activities*	Soil inoculated with		Non-inoculated (control) soil
	<i>T. tenuis</i> 40d	<i>M. tenera</i> 13a	
β - Glucosidase	188.98 b**	197.36 a	190.16 b
Urease	191.43 a	180.53 b	165.61 c
Protease	119.96 a	129.62 a	68.06 b
Phosphatase	1360.66 a	1274.83 b	1068.13 c
Arylsulphatase	75.17 a	80.82 a	30.28 b
Dehydrogenase	6.55 a	5.77 b	4.98 c

* Expression of enzyme activities: β -glucosidase, phosphatase and arylsulphatase - $\mu\text{g } p$ -nitrophenol/g soil/hour; urease - $\mu\text{g urea-N/g soil/hour}$; protease - $\mu\text{g tyrosine/g soil/hour}$; dehydrogenase - $\mu\text{g triphenylformazan/g soil/20 hours}$.

** Different letters between columns indicate significant differences at $p < 0.05$.

Dzhumaniyazova [5] dealt with the soil biological effects of the so-called bacterial and biological fertilisers. Cultures of phosphate-solubilising bacteria isolated from heavily P-fertilised soils in Uzbekistan were the bacterial fertilisers. The biological fertilisers (biofertilisers) were prepared from micro- and macroalgae and aquatic higher plants. The test plant was sugar beet.

The experiments were carried out in four variants: 1. the soil was fertilised with ammophos, then sown with sugar beet seeds ((glomerules) not inoculated with bacterial fertiliser (not bacterised); 2. the soil was fertilised with ammophos, then sown with bacterised seeds; 3. the soil was farmyard-manured, then sown with bacterised seeds; 4. the soil was treated with biofertiliser, then sown with bacterised seeds.

During the growth period of sugar beet, namely in June, August and October, several soil enzyme activities were measured.

Soil phosphatase activity in the four variants increased in the orders: $1 < 2 < 3 < 4$ (in June and October) and $2 < 1 < 4 < 3$ (in August). These orders mean that farmyard-manuring or biofertilisation + bacterisation was more efficient than ammophos without or with bacterisation.

Bacterisation also resulted in increased soil invertase and urease activities. The effect of bacterisation on soil polyphenol oxidase activity was negative at the beginning of the growth period, but later it became positive. Contrarily, the initial high soil dehydrogenase activity was followed later by decreased activity.

In the soil of bacterised sugar beet, increased numbers of *Azotobacter* and nitrifying bacterial cells were recorded.

Bacterisation enhanced the emergence of sugar beet seeds (glomerules) and growth of the young plants and led, finally, to doubling of the sugar beet yield.

Vázquez *et al.* [42] compared the effects of different inoculants on enzyme activities in the rhizosphere soil of maize plants. Arbuscular mycorrhizal (AM) fungi (*Glomus mosseae*, *Glomus deserticola* and natural endophytes from the test soil) and *Azospirillum*, *Pseudomonas* and *Trichoderma* species were studied. The soil enzyme activities were greatly increased by the AM fungi: the increase was 164% in phosphatase activity, 167% in chitinase activity and 236% in trehalase activity following inoculation of natural endophytes, *G. mosseae* and *G. deserticola*, respectively. The other inoculants changed the soil enzyme activities to a much lesser extent.

García *et al.* [8] used *Pinus halepensis* (Aleppo pine) for afforestation of an east-facing hillslope area located in the semiarid Mediterranean region, on the Carrascoy range in Murcia Province (southeast Spain).

The experiment started in October 1992 when *P. halepensis* seedlings were planted into holes. The experiment comprised six variants: 1. the seedlings were not submitted to any mycorrhizal treatment; 2. the seedlings were inoculated with a suspension of spores of the mycorrhizal fungus *Pisolithus arhizus* (*P. tinctorius*) (direct mycorrhizal inoculation); 3. a small amount (200 g) of forest soil containing this mycorrhizal fungus was added into the planting holes of the seedlings (indirect mycorrhizal inoculation); variants 4, 5 and 6, like variants 1, 2 and 3, were not

inoculated, were directly and indirectly inoculated, respectively, but they were amended with organic waste. This was prepared from municipal solid waste, contained, among other components, 253 g organic C, 11.9 g total N, 5.5 g total P, 16.4 g humic C, 49.5 g carbohydrates/kg and was added to the holes, before planting the seedlings, at a rate of 10 kg/m² soil. A distance of 3 m or more separated the inoculated and non-inoculated seedlings. Each variant comprised at least 25 seedlings.

After 3 years, in April when the highest microbial activity could be expected, soil samples were taken from the planting holes (sampling depth was 0-15 cm) and submitted to several physical, chemical, microbiological and enzymological analyses.

The enzyme activities measured and the results obtained are summarised in Table 5.

Table 5

Effects of mycorrhizal inoculation and organic amendment on enzyme activities in a soil afforested with *Pinus halepensis* [8]

Experimental variants	Enzyme activities*				
	Urease	Protease	Phosphatase	Catalase	Dehydrogenase
1. No inoculation and no amendment	1.63 (0.039)	0.21 (0.008)	43.5 (2.62)	16.0 (0.5)	21.5 (0.7)
2. Direct inoculation, but no amendment	2.00 (0.12)	0.35 (0.028)	82.0 (9.96)	18.5 (0.7)	25.0 (2.2)
3. Indirect inoculation, but no amendment	2.25 (0.18)	0.51 (0.06)	73.0 (6.2)	18.7 (0.8)	25.0 (2.2)
4. Amendment, but no inoculation	2.95 (0.15)	0.65 (0.09)	122 (8.1)	21.2 (0.6)	36.7 (2.4)
5. Amendment and direct inoculation	3.19 (0.9)	1.06 (0.06)	217 (17.5)	23.5 (0.7)	48.7 (2.2)
6. Amendment and indirect inoculation	3.22 (0.12)	0.93 (0.02)	252 (7.5)	22.7 (1.6)	35.7 (1.2)

* Expression of enzyme activities: urease - μM NH₃/g soil/hour; protease on N-α-benzoyl-L-argininamide - μM NH₃/g soil/hour; phosphatase - μM *p*-nitrophenol/g soil/hour; dehydrogenase - μg iodonitrotetrazolium formazan/g soil/20 hours. Standard deviation is given in parenthesis.

The data in Table 5 make it possible to draw the conclusions specified below.

1. Inoculation of the non-amended soil and amendment of the inoculated soil led to increases in each enzyme activity.

2. Amendment without inoculation was more efficient in increasing each enzyme activity than was inoculation without amendment.

3. Combined direct inoculation and amendment resulted in the highest protease, catalase and dehydrogenase activities, whereas combined indirect inoculation and amendment led to the highest increase in the urease and phosphatase activities.

Combined use of mycorrhizal inoculation and organic amendment proved to be the best method also for improving the microbiological, chemical and physical properties of the soil.

I. 2. Soil enzyme activities as affected by inoculation of biocontrol microorganisms

Based on the possibility of controlling the soil-borne phytopathogenic fungi by amending the soil with chitin and by its inoculation with chitinase-producing microorganisms, Ueno and Miyashita [41] used the chitinase-producing *Streptomyces* sp. strain S-84 for inoculation of a light-coloured andosol (pH in H₂O 5.2; total C 5.25%; total N 0.41%) collected at a farm of the University of Tsukuba, Ibaraki, Japan.

The 50-g sieved (2 mm) soil samples were amended with chitin powder (1%, weight/weight), inoculated at the rate of 10⁶ colony-forming units/g dry soil, moistened to 60% of water-holding capacity and incubated at 25⁰C for 41 days. Activity of chitinolytic soil enzymes was measured weekly. The substrates were 4-methylumbelliferyl (4-MU) - chitotriose and 4-MU-chitobiose for chitinase and 4-MU-N-acetylglucosamine for N-acetylglucosaminidase. The activities are expressed in units, one unit being defined as the amount of enzyme that liberated 1 mmol 4-MU from the substrate in 1 minute/g dry soil.

It is evident from Fig. 1 that after 20-28 or 28-34 days of incubation the enzyme activities were significantly higher in the inoculated than in the non-inoculated soil, but at the end of incubation (on day 41) the significant increasing effect of inoculation disappeared.

I. 3. Soil enzyme activities as affected by inoculation of bioremediating microorganisms

For studying the bioremediation of oil-contaminated soils, Samosova *et al.* [40] carried out a laboratory experiment. Samples of a chernozem soil were treated with Romashkino crude oil at a rate of 6% (weight/weight). Some samples were inoculated with an enrichment culture of hydrocarbon-oxidising microorganisms originating from oil-contaminated soils. The control samples were not inoculated. During incubation, the moisture content of soil was maintained at 70% of the water-holding capacity.

After 15 months of incubation, urease and dehydrogenase activities became much higher in the inoculated than in the control soil: the increase was 1.5-2-fold and 2-fold, respectively. Degradation of hydrocarbons also increased in the inoculated samples: 67.2% and 55% of the added oil were degraded in the inoculated and control soil, respectively. But oil degradation was higher (reaching 75.2%) in soil samples which, instead of inoculation, were submitted to systematic loosening during the incubation or to liming at the beginning of the experiment.

Andreson *et al.* [1] point out that the Bacispecin preparation studied by them was a powder easily suspendable in water and contained 2.10⁶ colony-forming units/g. It was used for remediation of an area on which contamination of soil with crude oil occurred more than 10 years before. This area is located on the territory of the enterprise Surgutneftegaz. The soil is a sandy illuvial iron-humus podzol.

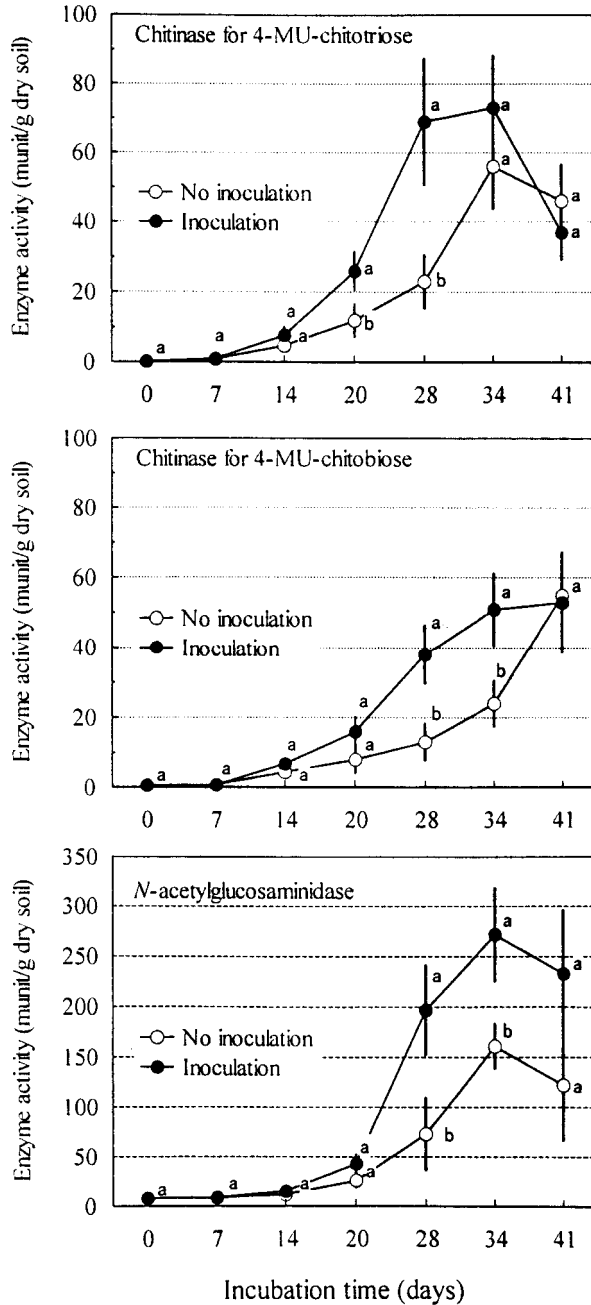


Fig. 1. Chitinase activity for 4-MU-chitotriose and 4-MU-chitobiose and N-acetylglucosaminidase activity in chitin-amended soil with or without inoculation of *Streptomyces* sp. S-84 [41].

Symbols with the same letter at the same incubation time are not significantly different at $p=0.05$; the vertical bars show the 5% confidence limit.

Plots of m^2 were installed. The podzol of the control plots was an unpolluted virgin soil. The plots on the contaminated area were submitted to no or to three different remediating treatments.

The 0-20-cm soil layer of each plot was sampled and analysed from chemical, microbiological and enzymological viewpoints.

The experimental variants are specified and some of the results obtained after 2.5 months of the experiment are summarised in Table 6.

It is evident from this table that crude oil contamination of soil caused, as expected, a significant increase in the total C content as compared to the total C content in the unpolluted soil

The most important finding was that inoculation of Bacispecin led to the greatest diminution of the oil content: in 2.5 months, the residual oil content of 10.31 g/100 g soil was decreased to 4.55 g/100 g soil, which means 55.87% oil degradation. In the (NPK)₁₈₀ and (NPK)₉₀ + Bacispecin variants oil degradation was 30.16 and 52.18%, respectively.

Respiration was most intense and dehydrogenase activity was the highest in the contaminated soil treated with (NPK)₉₀ + Bacispecin, whereas the soil treated only with Bacispecin was the most peroxidase-active. Polyphenol oxidase activity was lacking in the unpolluted soil and was very low in the soil of the other experimental variants.

Based on the results obtained, the authors hope that use of the hydrocarbon-oxidising bacterial preparations will be included in the projects and programmes for remediation of oil-contaminated soils.

Table 6

Effects of the biopreparation Bacispecin and NPK fertilisers on some properties of a crude oil-contaminated soil [1]

Experimental variants	Total C content (%)	Residual oil content (g/100 g soil)	Respiration*	Enzyme activities**		
				Dehydrogenase	Peroxidase	Polyphenol oxidase
Unpolluted virgin soil	0.8	-	0.6	0.032	0.022	0
Contaminated soil, not treated	7.8	10.31	0.7	0.167	0.212	0.009
Contaminated soil, treated with (NPK) ₁₈₀	6.0	7.20	0.8	0.097	0.488	0.003
Contaminated soil, treated with Bacispecin (500 g/m ²)	3.6	4.55	1.4	0.091	0.569	0.005
Contaminated soil, treated with (NPK) ₉₀ and Bacispecin (500 g/m ²)	5.6	4.93	1.6	0.340	0.213	0.004

* Expression of respiration: mg CO₂-C/100 g soil/24 hours.

** Expression of enzyme activities: dehydrogenase – mg triphenylformazan/g soil/24 hours; peroxidase and polyphenol oxidase – mg p-benzoquinone/g soil/hour.

Gabbasova *et al.* [7] found that use of Bacispecin resulted in increased invertase, urease, catalase and dehydrogenase activities in a grey forest soil contaminated with Arlan crude oil.

Air-dried, 500-g, soil samples were treated with 0, 5 or 10% oil (weight/weight) and with 0 or 5 g Bacispecin. The samples were incubated at constant soil moisture content (60% of water-holding capacity). The enzyme activities were measured after 220 days of incubation.

As expected, degradation of oil in soil samples contaminated with 5% crude oil was very marked, the residual oil content approached the level of the admissible oil content. At the same time, oil degradation in soil samples contaminated with 10% crude oil was unsatisfactory.

The investigations initiated by Kireeva for bioremediation of oil-contaminated soils were briefly reviewed in [14]. These investigations, using hydrocarbon-oxidising pure and mixed microbial cultures and biopreparations were continued and the remediating efficiency of these cultures and biopreparations, including their increasing effect on soil enzyme activities, could be again established [10-13].

Malachowska-Jutz et al. [32] carried out a laboratory experiment, in which 2-kg samples of an unpolluted acid forest soil (pH 4.1) were contaminated with 5, 15 and 25% light or heavy oil in three variants: 1. oil only; 2. oil + lime; 3. oil + lime + *Pseudomonas* sp. This *Pseudomonas* strain used for inoculation was initially isolated from soil collected at the oil refinery Czechowice-Dziedzice (Poland) and was found to be very active in degradation of both light and heavy oils. The control soil samples received no treatment.

All samples were incubated at constant soil moisture content of 26% and analysed enzymologically and chemically after 1, 3, 5, 9 and 12 weeks of incubation.

The results showed that dehydrogenase and protease activities markedly increased, cellulase activity slightly increased, while amylase activity markedly decreased in the soil of the oil + lime + *Pseudomonas* variant. The decrease in amylase activity was attributed to the pH increase caused by the lime addition, as in the initially acid forest soil amylase was produced by fungi and the pH optimum of fungal amylase is acid.

The amount of humic acids formed during the incubation was inversely proportionate to the rate of oil addition, and was a little greater in the light oil-contaminated soil samples than in those contaminated with heavy oil. The content of humic acids was always highest in the soil of the oil + lime + *Pseudomonas* variant.

Based on the role played by the extracellular ligninolytic enzymes of white-rot fungi in the initial transformations during degradation not only of lignin, but also of polycyclic aromatic hydrocarbons, in der Wiesche et al. [9], Lang et al. [29] and Zadrazil et al. [43] carried out several laboratory experiments. Two white-rot fungi: *Pleurotus* sp. (DSM 9618) and *Dichomitus squalens* (DSM 9615) were used and activities of their ligninolytic (i.e. decontaminating) enzymes: laccase and manganese peroxidase (MnP) were measured.

In one of the experiments [9], a two-compartment system was used: straw as the lignocellulose substrate was colonised with a white-rot fungus and non-sterile soil was contaminated with ¹⁴C-labelled benzo[a]pyrene (¹⁴C-BaP). The system was incubated and mineralisation of ¹⁴C-BaP and the laccase and MnP activities in soil were measured weekly.

With *Pleurotus* sp., 25-26% of ^{14}C -BaP was mineralised within 20 weeks. Activity of MnP greatly increased and was highest during weeks 4 to 8 and then slowly declined, in correspondance with the mineralisation rate of ^{14}C -BaP.

D. squalens was not able to grow in non-sterile soil.

The conclusion was drawn that MnP has a key position in the degradation of BaP in soil by white-rot fungi.

In another experiment [29], the straw in the two-compartment system was colonised by *Pleurotus* sp. and the microbiota of soil had been previously brought to varying level of metabolic activity which was assessed by respiration and dehydrogenase activity measurements.

The result indicated that growth of *Pleurotus* sp. was not influenced by the soil microbiota and the ligninolytic enzymes laccase and MnP remained active, irrespective of the metabolic activity of the soil microorganisms.

It was also established [43] that both laccase and MnP activities were strongly diminished at temperatures higher than 30°C.

McGrath and Singleton [33] studied the biodegradation of pentachlorophenol (PCP) in soil. PCP is a general biocide used for a variety of purposes such as agriculture and timber preservation. Worldwide use of PCP has led to severe contamination problems particularly around former timber treatment plants.

A laboratory experiment was carried out in the following variants: *a*) soil alone (control); *b*) soil inoculated; *c*) soil contaminated and inoculated; *d*) soil contaminated. A clay loam soil (pH 6.4) collected from the campus at University College Dublin was used. In each variant the weight of sieved soil sample (2 mm) was 40 g. A white-rot fungus was inoculated, namely *Phanerochaete chrysosporium* CMI 174727 grown on peat (2.5 g peat per 40 g soil). PCP at a rate of 250 mg/kg soil was the contaminant. The soil samples of all variants were incubated at 25°C for 6 weeks and maintained at a constant moisture content of 30% (weight/weight). The samples were analysed before and after 1 week of incubation and subsequently on a fortnightly basis.

Analysis of PCP showed that after 6 weeks of incubation the PCP content dropped from the initial 250 mg to 2 mg/kg soil. Degradation of PCP was the result of the soil microbial activity as it was proved, in a separate experiment, that in sterile (autoclaved) soil PCP degradation was negligibly low. Inoculation with *P. chrysosporium* did not improve PCP degradation over non-inoculated PCP-contaminated soil.

Dehydrogenase activity (Fig. 2) in the control and inoculated non-contaminated soil samples had the same level before and after 6 weeks of incubation. Contamination with PCP decreased considerably the dehydrogenase activity in both inoculated and non-inoculated soil samples. The activity did not recover even though PCP concentration had dropped to 2 mg/kg soil after 6 weeks of incubation. This finding and a toxicity test with the common soil bacterium *Bacillus megaterium* suggest that during biodegradation of PCP some intermediates formed are more toxic than is PCP.

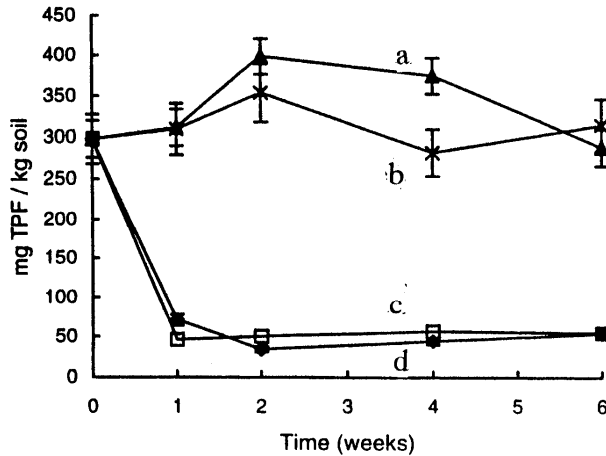


Fig. 2. The effect of fungal inoculation and PCP contamination alone or in combination on dehydrogenase activity in soil during 6 weeks of incubation [33].
 a - Soil alone (control). b - Soil + fungal inoculation. c - Soil + PCP contamination + fungal inoculation.
 d - Soil + PCP contamination. TPF - Triphenylformazan.

II. ENZYMOLOGY OF SOILS INOCULATED WITH GENETICALLY MODIFIED (ENGINEERED) MICROORGANISMS

Inoculation of Pseudomonas fluorescens R2f strains. Kozdrój [17] studied four R2f strains received from Dr. J.D. van Elsas (Research Institute for Plant Protection, Wageningen). Strain Rf2(RP4) is a genetically modified microorganism (GMM), into which the plasmid RP4 was introduced; it is resistant to kanamycin and tetracycline. Strain R2fD5 is a GMM by introduction of the transposon Tn5 into the chromosome; it is resistant to kanamycin and rifampicin. R2fR is a single chromosomal mutant, resistant to rifampicin. R2fN is a double chromosomal mutant, resistant to rifampicin and nalidixic acid.

Twenty-g air-dried and sieved (< 2 mm) samples of a sandy loam soil (pH in H₂O 6.5; organic C 12.6%; total N 0.36%) were inoculated with overnight cultures of the strains at a rate of 6 to 8.10⁶ colony-forming units/g dry soil. The control soil samples were not inoculated. All samples were incubated at 26°C during a 16-hour light period, followed, at 20°C, by an 8-hour dark period. The incubation lasted 18-19 days.

After several incubation times, the soil samples were analysed for determination of their dehydrogenase and urease activities and arginine ammonification capacity.

Fig. 3 illustrates that after the first day of incubation dehydrogenase activity was similarly high in the control and inoculated soil samples, excepting the R2f(RP4) - inoculated soil sample in which dehydrogenase activity was a little higher than in the other samples. The activity significantly declined after 5 days and then stabilised at a similar level, but after 19 days it was a little higher in the inoculated than in the control soil samples.

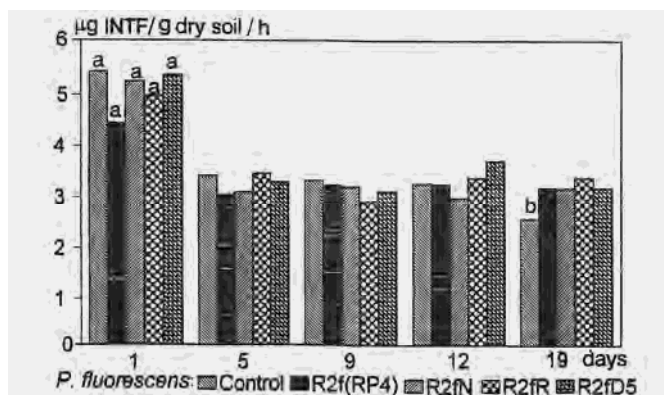


Fig. 3. Dehydrogenase activity during a 19-day incubation of soil samples not inoculated or inoculated with different *Pseudomonas fluorescens* R2f strains [17].

Data presented by bars with the letter *a* are significantly different ($p < 0.05$) from those unmarked or marked with the letter *b*. INTF - Iodonitrotetrazolium formazan.

Significant differences (at $p < 0.05$) between urease activities of the control and inoculated soil samples during the 19-day incubation were not registered with the exception of a single case: on day 9, urease activity in the R2fR-inoculated soil sample was significantly higher than in the other samples.

After the first day of incubation, ammonification of arginine was found to be significantly higher (at $p < 0.05$) in the inoculated than in the control soil samples, but later (after 4, 7, 11 and 18 days of incubation) there was no significant difference between the arginine ammonification capacities of the different soil samples.

It was emphasised in the conclusions that the different R2f strains of the typical soil bacterium *Pseudomonas fluorescens* did not cause any significant and persistent changes in the microbial activity of the inoculated soil.

Inoculation of Pseudomonas fluorescens SBW25, SBW25 EeZY-6KX, F113 and F113 G22. These strains studied by Naseby and Lynch [34] were characterised as follows: SBW25 is a wild-type strain isolated from the rhizosphere of sugar beet; strain SBW25 EeZY-6KX, a genetically modified derivative of SBW25, contains the marker genes *lacZY* (lactose utilisation), kanamycin resistance and *xyIE* (catechol degradation); the wild-type F113 strain produces the antibiotic 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG) and is marked with a *lacZY* cassette; strain F113 G22, also having the *lacZY* insert, is a DAPG-negative derivative produced from F113 by Tn5 mutagenesis.

The test plant was pea (*Pisum sativum* var. Montana).

The soil used was a sandy loam (pH 5.4; organic matter content 1.6%). Its samples were taken from a permanent pasture at Merrist Wood Agricultural College (Surrey).

Coarsely sieved (6 mm) loose soil samples (250 g) were placed in experimental microcosms consisting of 21-cm-high acetate cylinders, slotted between the top and base of plastic 9-cm diameter Petri dishes to create a semi-enclosed system.

Each bacterial strain was grown on tryptone soya agar, then the bacteria were suspended in sterile quarter-strength Ringer's solution and used to imbibe pea seeds for 8 hours, resulting in $2-4.10^8$ colony-forming units per seed. For imbibition of the control seeds no bacterial strain was added to Ringer's solution.

Each microcosm received 8 imbibed seeds, planted at a depth of ~1 cm below the soil surface. Thirty ml of water was added to each microcosm before they were placed in a growth chamber set at a 16-hour photoperiod with a day/night temperature regime of 21⁰C/15⁰C, respectively.

After 21 days of growth the microcosms were harvested and rhizosphere soil was collected, sieved (2 mm) and analysed enzymologically and microbiologically. The shoot and root weights were also determined.

The soil enzyme activities measured and their mean values are presented in Table 7.

The data in Table 7 show that, of the four strains inoculated, strain F113 producing DAPG caused the most evident changes in soil enzyme activities: it *significantly* decreased β -glucosidase and N-acetylglucosaminidase activities and increased phosphodiesterase and arylsulphatase activities, and *insignificantly* decreased acid β -galactosidase and acid phosphatase activities and increased alkaline phosphatase activity*. The DAPG-negative F113 G22 strain had a significantly negative effect only on the alkaline phosphatase activity. No significant differences were registered in soil enzyme activities between the strains SBW25 and SBW25 EeZY-6KX and between them and the control.

Table 7

Mean values of enzyme activities in the rhizosphere soil of pea plants developed from seeds inoculated with wild-type and genetically modified *Pseudomonas fluorescens* strains [34]

Enzyme activity*	Inoculated strains				
	No (control)	SBW25	SBW25 EeZY-6KX	F113	F113 G22
β -Glucosidase	1.019 b	1.026 b	0.765 a,b	0.624 a	1.022 b
N-Acetylglucosaminidase	0.321 b	0.334 b	0.267 a,b	0.184 a	0.295 b
Acid β -galactosidase	0.515 a,b	0.623 b	0.501 a,b	0.452 a	0.505 a,b
Acid phosphatase	7.911 a,b	9.282 b	7.857 a,b	7.058 a	8.241 a,b
Alkaline phosphatase	1.235 b,c	0.757 a,b	0.934 a,b	1.523 c	0.704 a
Phosphodiesterase	0.111 a	0.086 a	0.119 a,b	0.168 b	0.087 a
Arylsulphatase	0.091 a	0.094 a	0.117 a,b	0.161 b	0.076 a

*Each activity is expressed as mg *p*-nitrophenol released/g dry soil.

Significant differences between strains at $p=0.05$ level are indicated by different letters.

* Strain F113 also caused a significant decrease in the shoot-to-root ratio of pea plants in comparison to the other strains and control, indicating plant stress.

Taking into account the results of both enzymological and microbiological analyses, the conclusions arrived at were the following: the soil enzyme activities proved to be a sensitive indicator of perturbations caused by the inoculated strains and provided information as to the nature of perturbations; total microbial populations were not a sensitive indicator of perturbations; measurement of r and K strategies (rapid and slower colony formation, respectively) was a more reliable indicator of perturbation than total populations, but this too is nonfunctional and, unlike soil enzyme activities, does not give an indication on the effects of the inoculated strains upon ecosystem function.

A second experiment performed by Naseby and Lynch [35] may be considered as a variant of their first experiment [34] briefly reviewed above, as the same soil, the same test plant (pea), the same SBW25 and SBW25 EeZY-6KX strains were used under the same experimental conditions as in the first experiment, but, after 7 days of growth, the soil microcosms were amended with 30 ml of 2% lactose or 0.1% kanamycin solution, in place of water.

In the second experiment, as in the first one, the rhizosphere soil was analysed enzymologically after harvesting the pea plants following their 21-day growth.

In this experiment, besides the 7 enzyme activities measured in the first experiment, alkaline β -galactosidase activity was also estimated.

Lactose amendment significantly increased (at $p < 0.01$ or $p < 0.001$) all enzyme activities in the rhizosphere of both non-inoculated and inoculated plants. In the kanamycin-amended non-inoculated soil only alkaline phosphatase and phosphodiesterase activities were significantly higher ($p < 0.05$) than in the non-amended and non-inoculated soil. The inoculated strains did not significantly change the effects of lactose and kanamycin amendments on the soil enzyme activities.

A short report on these investigations was also published, by Lynch and Naseby [31].

Inoculation of Pseudomonas fluorescens 2-79RL. In one of the experiments performed by Lin and Crowley [30] for studying *P. fluorescens 2-79RL* (hereafter referred to as 2-79RL), a suspension of the 2-79RL cells was inoculated into non-sterile and sterile aqueous extracts of a California loamy sandy soil (pH 7.7; C:N ratio 11:1; total C 0.9%).

The 2-79RL strain contains the Tn7-*luxCDABE* gene cassette from *Photobacterium fischeri*, which is regulated by the ribosomal RNA promoter *rrnB P₂*. It also carries chromosomal antibiotic resistance markers for streptomycin and ampicillin.

The non-sterile and sterile water extracts (50 ml each) were inoculated with the strain to a final density of 10^8 colony-forming units/ml, then incubated at 24°C up to 35 days.

During incubation of the inoculated non-sterile soil extract, number of the 2-79RL cells and dehydrogenase activity strongly decreased, while in the non-inoculated non-sterile soil extract the total number of heterotrophic bacteria decreased to a much lesser extent.

In the sterile soil extract, the inoculated 2-79RL cells were less negatively affected and their dehydrogenase activity did not decrease.

In the inoculated non-sterile soil extracts there are two sources of dehydrogenase activity, namely the inoculated 2-79RL cells and the other bacteria. One can deduce from the results that decrease of dehydrogenase activity in such extracts should be attributed to a much larger extent to decrease of dehydrogenase activity in the 2-79RL cells than in the other bacteria. Consequently, the effects exerted by the soil as a living system on the inoculated microorganisms can easily be assessed by measuring dehydrogenase activity.

Conclusions. 1. The effects of the inoculation of natural microorganisms on soil enzyme activities were studied under both laboratory and field conditions.

2. The investigations, in which the effects of the inoculation of genetically modified (engineered) microorganisms on soil enzyme activities were studied, continued to be carried out only under laboratory conditions. This means that the investigators remained precautionous in releasing such microorganisms for field experiments.

3. Soil enzyme activities are a sensitive indicator of the biological effects exerted by the inoculated microorganisms.

4. The sense (increasing or decreasing) and extent (strong or weak) of these effects depend on the nature of the inoculated microorganisms and the soil enzyme studied as well as on the biological, chemical and physical soil properties and experimental conditions.

REFERENCES

1. Andreson, R.K., Boiko, T.F., Bagautdinov, F.Ya., Danilenko, L.A., Denezhkin, E.M., Novoselova, E.I., Khaziev, F.Kh., Andreson, B.A., *Primenenie biologicheskogo metoda dlya ochistki i rekul'tivatsii neftezagryaznennykh pochv*, "Zashchita Korr. Okhrana Okruzh. Sredy", No. 2, 1994, 16-18.
2. Apanasenko, I.P., *Uplyv inakulyatsyi lubinu na fermentatyvnyuyu aktyvnasts' gleby i nakaplenne v ėi azotu*, "Vestsi Akad. Navuk BSSR, Ser. Biyal. Navuk", No. 4, 1973, 46-51.
3. Chunderova, A.I., Ivanova, A.I., *Effektivnost' nitragina pod klevler i posledeistvie biologicheskogo azota v sevooborote*, in Muromtsev, G.S. (Red.), *Aktual'nye Problemy Sel'skokhozyaistvennoi Mikrobiologii*, pp. 11-25, Vses. Nauchno-Issled. Inst. Sel'skokhoz. Mikrobiol., Leningrad, 1974.
4. de Caire, G.Z., de Cano, M.S., Palma, R.M., de Mulé, C.Z., *Changes in soil enzyme activities following additions of cyanobacterial biomass and exopolysaccharide*, "Soil Biol. Biochem.", **32**, 2000, 1985-1987.
5. Dzhumaniyazova, G., *Bakterial'nye i biologicheskie udobreniya*, "Sakh. Svekla", No. 9, 2000, 21.

6. Filippova, K.F., Kolotova, S.S., *Vliyanie molibdena i nitragina na biokhimicheskie protsessy mikroorganizmov v rasteniyakh kormovykh bobov i ikh rizosfere*, in *Mikrobiologicheskie i Biokhimicheskie Issledovaniya Pochv*, pp. 188-193, Izd. Urozhai, Kiev, 1971.
7. Gabbasova, I.M., Khaziev, F.Kh., Suleimanov, R.R., Galimzyanova, N.F., Boiko, T.F., *Stimulirovanie mikroflory neftezagryaznennoi seroi lesnoi pochvy s pomoshchs'yu organicheskikh dobavok*, "Bashk. Ekol. Vestn.", No.2, 1999, 14-18.
8. García, C., Hernández, T., Roldan, A., Albaladejo, J., Castillo, V., *Organic amendment and mycorrhizal inoculation as a practice in afforestation of soils with Pinus halepensis Miller: effect on their microbial activity*, "Soil Biol. Biochem.", **32**, 2000, 1173-1181.
9. in der Wiesche, C., Lang, E., Martens, R., Zadrazil, F., *Comparison of the activities of ligninolytic enzymes and mineralization of benzo[a]pyrene by white-rot fungi in straw-soil systems*, in Dick, R.P. (Ed.), *Enzymes in the Environment: Activity, Ecology and Applications*, Abstr. Int. Conf. (Granada, Spain, 1999), 1999, p. 96.
10. Kireeva, N.A., Tarasenko, E.M., Onegova, T.S., *Biologicheskaya rekul'tivatsiya neftezagryaznennykh pochv*, "Itogi Biol. Issled. Bashk. Gos. Univ." (Ufa), No. 6, 2000, 115-118.
11. Kireeva, N.A., Tarasenko, E.M., Onegova, T.S., *Podbor bioindikatsionnykh pokazatelei dlya diagnostiki neftezagryaznennykh i rekul'tiviruemykh pochv. Selection of bioindicator indexes for diagnostics of oil-contaminated and recultivated soils*, "Tez. Dokl. XI. Mezhdunar. Simp. 'Sovremennye Problemy Bioindikatsii i Biomonitringa'. Abstr. XI. Int. Symp. 'Problems of Today in Bioindication and Biomonitring'" (Syktyvkar, 2001), 2001, 78-79; 271.
12. Kireeva, N.A., Vodop'yanov, V.V., Miftakhova, A.M., *Biologicheskaya Aktivnost' Neftezagryaznennykh Pochv*, Izd. Gilem, Ufa, 2001.
13. Kireeva, N.A., Vodop'yanov, V.V., Novoselova, E.I., Onegova, T.S., Zhdanova, N.V., *Mikrobiologicheskaya Rekul'tivatsiya Neftezagryaznennykh Pochv*, OAO "VNIIOENG", Moskva, 2001.
14. Kiss, S., *Enzymology of soils inoculated with microorganisms*, "Stud. Univ. Babeş-Bolyai, Biol.", **44** (1-2), 1999, 3-44.
15. Kiss, S., *Advances in soil enzymology (Parts I-III)*, "Stud. Univ. Babeş-Bolyai, Biol.", **46** (1), 2001, 3-48.
16. Kiss, S., Paşca, D., Drăgan-Bularda, M., *Enzymology of Disturbed Soils*, Elsevier, Amsterdam, 1998.
17. Kozdrój, J., *Microbial activity in soil inoculated with different mutants of Pseudomonas fluorescens*, "Acta Microbiol. Pol.", **46** (1), 1997, 57-63.
18. Kucharski, J., Nowak, G., *The effect of L-tryptophan on yield of field bean and activity of soil microorganisms*, "Acta Microbiol. Pol.", **43** (3-4), 1994, 381-388.
19. Kucharski, J., Wyszowska, J., *The effect of L-methionine and L-ethionine (ethylene precursors) on carrot yield and soil microbial activity*, in *Drobnoustroje w Środowisku. Występowanie, Aktywność i Znaczenie*, pp. 357-366, Akad. Rol., Kraków, 1997.

20. Kucharski, J., Wyszowska, J., *Wpływ L-etioniny na drobnoustroje glebowe i plonowanie rzodkiewki*, in *Drobnoustroje w Środowisku. Występowanie, Aktywność i Znaczenie*, pp. 367-374, Akad. Rol., Kraków, 1997.
21. Kucharski, J., Wyszowska, J., *Abundance and activity of soil microbes and lettuce yield as a result of phytohormone activity*, "Sci. Works Lith. Inst. Hortic. Lith. Univ. Agric., Hortic. Vegetable Growing", **18** (3), 1999, 339-346.
22. Kucharski, J., Wyszowska, J., *Effect of adenine and Azotobacter sp. on radish yield and microbiological properties of soil*, "Sci. Works Lith. Inst. Hortic. Lith. Univ. Agric., Hortic. Vegetable Growing", **19** (3), 2000, 165-178.
23. Kucharski, J., Wyszowska, J., *Response of soil microorganisms and buckwheat plants to cytokinins*, "Rostl. Výroba", **46**, 2000, 527-532.
24. Kucharski, J., Wyszowska, J., Nowak, G., *Wpływ L-tryptofanu oraz kwasu 3-indolilooctowego na drobnoustroje glebowe i plonowanie marchwi*, "Acta Acad. Agric. Techn., Olsztyn, Agric.", No. 63, 1996, 47-57.
25. Kucharski, J., Wyszowska, J., Nowak, G., *Wpływ alkoholu izopentylowego i benzyloadeniny na plonowanie marchwi i aktywność drobnoustrojów glebowych*, "Acta Acad. Agric. Techn., Olsztyn, Agric.", No. 65, 1998, 9-19.
26. Kucharski, J., Wyszowska, J., Nowak, G., *Wpływ alkoholu izopentylowego, adeniny i benzyloadeniny na plonowanie bobiku i na aktywność drobnoustrojów glebowych*, "Zesz. Nauk. Akad. Rol." (Wrocław), No. 332, 1998, 19-30.
27. Kucharski, J., Wyszowska, J., Nowak, G., *Response of field bean plants and soil microorganisms to cytokinin precursors and benzyladenine*, "Pol. J. Soil Sci.", **32** (2), 1999, 89-95.
28. Kucharski, J., Wyszowska, J., Nowak, G., *Effect of L-tryptophan and indole-3-acetic acid on yield of field bean and soil microbial activity*, "Nat. Sci.", No. 5, 2000, 55-63.
29. Lang, E., in der Wiesche, C., Zadrazil, F., *Effect of the soil microbial community on the activities of ligninolytic enzymes of wood-rotting fungi*, in Dick, R.P. (Ed.), *Enzymes in the Environment: Activity, Ecology and Applications*, Abstr. Int. Conf. (Granada, Spain, 1999), 1999, p. 92.
30. Lin, E.W., Crowley, D.E., *Duration of lag phase of Pseudomonas fluorescens 2-79RL starved in isolation or in the presence of soil microorganisms*, "Soil Biol. Biochem.", **33**, 2001, 2005-2010.
31. Lynch, J.M., Naseby, D.C., *Soil enzymes as indicators of functional perturbations in the rhizosphere*, in Dick, R.P. (Ed.), *Enzymes in the Environment: Activity, Ecology and Applications*, Abstr. Int. Conf. (Granada, Spain, 1999), 1999, p. 41.
32. Malachowska-Jutcz, A., Mrozowska, J., Kozielska, M., Miksch, K., *Aktywność enzymatyczna w glebie skażonej związkami ropopochodnymi w procesie jej detoksykacji*, "Biotechnologia", No. 1, 1997, 79-91.
33. McGrath, R., Singleton, I., *Pentachlorophenol transformation in soil: a toxicological assessment*, "Soil Biol. Biochem.", **32**, 2000, 1311-1314.

34. Naseby, D.C., Lynch, J.M., *Impact of wild-type and genetically modified Pseudomonas fluorescens on soil enzyme activities and microbial population structure in the rhizosphere of pea*, "Molec. Ecol.", **7**, 1998, 617-625.
35. Naseby, D.C., Lynch, J.M., *Establishment and impact of Pseudomonas fluorescens genetically modified for lactose utilization and kanamycin resistance in the rhizosphere of pea*, "J. Appl. Microbiol.", **84**, 1998, 169-175.
36. Palma, R.M., de Caire, G.Z., de Cano, M.S., de Mulé, C.Z., *Changes in soil enzyme activities by cyanobacterial biomass and exopolysaccharide*, in Dick, R.P. (Ed.), *Enzymes in the Environment: Activity, Ecology and Applications*, Abstr. Int. Conf. (Granada, Spain, 1999), 1999, p. 22.
37. Perotti, E.B.R., Pidello, A., *Evolución del nitrógeno mineral del suelo en presencia de Azospirillum*, "Cie. Suelo", **8** (1), 1990, 41-46.
38. Perotti, E.B.R., Pidello, A., *Effect of Azospirillum brasilense inoculation on urease activity in soil and gamma-sterilized soil*, "Rev. Argent. Microbiol.", **31**, 1999, 36-41.
39. Samoilov, I.I., Kozlova, N.V., Rusinova, I.P., Kruglov, Yu.V., *Vliyaniye bakterizatsii na biologicheskuyu aktivnost' organo-mineral'nykh smesei*, "Tr. Vses. Nauchno-Issled. Inst. Sel'skokhoz. Microbiol.", **16**, 1960, 116-122.
40. Samosova, S.M., Fil'chenkova, V.I., Musina, G.Kh., Kiprova, R.R., Gubaidullina, T.S., *Izyskanie putei stimulyatsii biodegradatsii nefi v pochve*, "Tez. Dokl. Konf. 'Mikrobiologicheskie Metody Bor'by s Zagryazneniem Okruzhayuschei Sredy' (Pushchino, 1979)", 1979, 8-10.
41. Ueno, H., Miyashita, K., *Inductive production of chitinolytic enzymes in soil microcosms using chitin, other carbon sources, and chitinase-producing Streptomyces*, "Soil Sci. Plant Nutr.", **46**, 2000, 863-871.
42. Vázquez, M.M., Cesar, S., Azcón, R., Barea, J.M., *Arbuscular mycorrhizal fungi and microbial inoculation induced changes to bacterial population and soil enzyme activities in the rhizosphere soil of maize plants*, in Dick, R.P. (Ed.), *Enzymes in the Environment: Activity, Ecology and Applications*, Abstr. Int. Conf. (Granada, Spain, 1999), 1999, p. 49.
43. Zadrazil, F., Gonser, A., Lang, E., *Influence of incubation temperature on the secretion of extracellular ligninolytic enzymes of Pleurotus sp. and Dichomitus squalens into soil*, in Dick, R.P. (Ed.), *Enzymes in the Environment: Activity, Ecology and Applications*, Abstr. Int. Conf. (Granada, Spain, 1999), 1999, p. 104.

CONTRIBUTIONS TO THE STUDY OF VEGETATION IN SOME NEW FOREST RESERVES IN THE IAȘI COUNTY

ADRIAN OPREA*, CULIȚĂ SÂRBU** and IRINA GOIA***

SUMMARY. - The paper deals with the phytosociological aspects of some plots belonging to four forest areas in the Iași county. These forests are: the Bârnova-Repedea Wooded Massif, the Medeleni Forest (in the Forest Ward of Iași), as well as the Gheorghiuoia and Frumușica Forests (in the Forest Ward of Podu-Iloaiei). Four associations were identified. They are *Quercus robori-Carpinetum*, *Galio schultesii-Fagetum*, *Euonymo nanae-Carpinetum* and *Aro orientalis-Carpinetum*, all being representative for the Moldavian Central Plateau and the upper Prut Flood Plain. These stands host some rare species in Moldavia and are also seed reserves for this geographical sub-unit.

The present work is a survey of species and communities inhabiting some plots, belonging to four forest areas in the Iași county, following the suggestions of the Environmental Protection Agency and Forest Ward of the Iași county. These forests are: the Bârnova-Repedea Wooded Massif and the Medeleni Forest (in the Forest Ward of Iași), the Gheorghiuoia and the Frumușica Forest (in the Forest Ward of Podu-Iloaiei). The owner of the forests is Forestry Department and State Administration for the Management of Forests (Regia Autonomă Romsilva). All of these plots are in special attention of the Romanian Academy of Sciences, Nature Heritage Sub-commission (Iași branch). These stands are representative for the Moldavian Central Plateau and the upper Prut Flood Plain. These stands host some rare species in Moldavia and are also seed reserves for this geographical sub-unit. The identification of the associations followed some general publications on vegetation [2, 13] and other papers dealing with the studied area [1, 3, 4, 7, 9-12].

Study area. All forests studied are located in the north-eastern part of our country. Their features will be specified below****.

The *Poieni-Dobrovăț* forest belongs to the Bârnova-Repedea Wooded Massif, being located in the northern part of the Dobrovăț village. The silvic code of this forest is 6622; it belongs to the Forest Unit II Poieni and the protected plots are: UA 67 A, B; 68 A, B; 70 A, B. The density of this stand is between 0.95-1, the trees are 29-32 m high and 30 - 60 - 110 cm in diameter.

* Botanical Garden of the Al. I. Cuza University, Iași, Str. Dumbravă Roșie 7-9, 6600 Iași, Romania. E-mail: a_aoprea@yahoo.co.uk

** University of Agronomy and Veterinary Medicine, Iași, Str. M. Sadoveanu, 6600 Iași, Romania. E-mail: culita69@yahoo.com

*** Babeș-Bolyai University, Faculty of Biology and Geology, Str. Republicii 42, 3400 Cluj-Napoca, Romania. E-mail: igoia@bioge.ubbcluj.ro

****After the Environmental Protection Agency, Iași.

This wood represents a typical beech forest for the Moldavian Central Plateau, being of local scientific interest.

The investigated stand is situated in the Moldavian Central Plateau, at an altitude of 230-400 m a.s.l., on various slopes of 12-14 degrees of declivity, with a flat relief. Its soils are brown-eu-mesobasic, brown-luvic typical or moderately pseudogleyed soils.

One of the reasons for which this stand was selected is that it represents a 80-100 years old mixed forest with beech, hornbeam and lime, characteristic for the Moldavian Central Plateau. The occurrence of *Fagus orientalis* as well as *F. taurica*, besides *F. sylvatica*, mixed with *Tilia tomentosa* and often with *Quercus petraea*, give a particular specificity within the vegetation cover of our country.

The surface of the protected plots is of 144.7 ha.

As rare species, *Orchis purpurea*, *O. maculata*, *Cypripedium calceolus*, *Fagus orientalis*, *F. taurica* and *Ulmus laevis* should be mentioned. In the neighbourhood of this forest reserve (in Poiana Schitului), *Potentilla alba*, *Inula conyza*, *Orchis morio* and *Ranunculus polyphyllus* occur.

The *Medeleni Forest* is located on the territory of the Golăiești village, along the Prut River flood plain, at an altitude of 50-70 m a.s.l. The trees are 20-22 m high and 16-60 cm in diameter.

This wood belongs to the Forest Unit V Medeleni, with the following plots: UA 22 A, B; 23 A, B; 24 A; 25 A; 26 A, E; 30 B. This is a forest reserve of local scientific interest, having a surface of 102.6 ha. It is a flood plain forest, the whole area being under protection, where *Fraxinus angustifolia* and *Quercus pedunculiflora* are frequently found; the other frequent species are *Acer campestre*, *Ulmus minor* and others. The stand is 50-110 years old, being typical for the river flood plain in the Moldavia region.

The *Gheorghiițaia Forest* belongs to the Forest Unit V Gheorghiițaia, with the following protected plots: UA 28 A; 29 A; 30 B; 31 A, D, Distr. III Sinești, and UP VI Cenușa, with the following plots: UA 1 A, B, C; 24 A, C, D, E; 25 A; 40 D; 43 A; 45 A; 46 A; 47 A. The whole protected forest surface is 202.3 ha. This stand is situated on the territory of the Mădârjac village.

This wood is located in the northern part of the Moldavian Central Plateau, at an altitude of 180-270 m a.s.l., on flat surface or on slopes with 15-20 degrees of declivity; the soils are brown illuvial clay soils and brown luvic moderately pseudogleyed soils on the slopes.

This stand is a century-old mixed forest, with *Quercus robur*, *Q. petraea*, *Carpinus betulus*, *Tilia tomentosa*, *Fagus sylvatica*, and other deciduous broad-leaved species, specific to the Moldavian Central Plateau, and being 120-140 years old. The basic species are 30-35 m high and 50-70 cm in diameter, with high quality timber. On the other hand, this wood is a seed reserve, having a density of stand of 0.9, with trees which are 30-31 m high and 20-80 cm in diameter.

Among the rare species in this forest reserve, one should mention *Euonymus nana*, *Ulmus laevis*, *Callitriche cophocarpa*, *Chaerophyllum aureum*, *Veronica bachofenii* and *Arum orientale*.

The *Frumușica Forest* belongs to the Forest Unit IV Frumușica; the protected plots are as follows: UA 38 A, C, D; 39 A, B, D. This forest reserve is situated on the territory of the Mădârjac village. The surface of this protected forest area is 97.3 ha. The altitude is 190-260 m a.s.l., on various slopes, with a flat or steep declivity, with brown-luvic, moderately pseudogleyed soils.

This forest reserve has a local forestry character and is also of a scientific interest. This stand was proposed to be specially maintained because it is a century-old mixed forest, with *Quercus petraea*, *Q. robur*, *Carpinus betulus*, and other deciduous broad-leaved species (it is the so-called lime-oak mixed forest), typical to the Moldavian Central Plateau. Density of this stand is between 0.85-0.9; *Quercus petraea* and *Q. robur* have ages ranging between 130-140 years, the trees being over 30 m high and 20-80-110 cm in diameter.

In these natural forests, the following plant associations were identified:

Coenotaxonomical conspect

- Cl. *Quercus-Fagetum* Br.-Bl. et Vlieger 1937
 Ord. *Fagetalia sylvaticae* Pawl. in Pawl., Sok et Wall. 1928
 Al. *Symphyto-Fagion* Vida 1959
 Subal. *Lathyro hallersteinii-Carpinenion* Boșcaiu et al. 1982
1. Ass. *Quercus robori-Carpinetum* Soó et Pócs (1931) 1957
 Subal. *Galio schultesii-Carpinenion* Täuber 1991/92
 2. Ass. *Galio schultesii-Fagetum* (Burduja, Mihai et Sârbu 1972/73) Chifu et Ștefan 1994, subass. *fagetosum tauricae* (Chifu 1995) Chifu et al. 1999
 3. Ass. *Euonymo nanae-Carpinetum* (Borza 1937) Seghedin, Filipașcu et Boșcaiu 1977
 Subal. *Aro orientalis-Carpinenion* (Dobrescu et Kovács 1973) Täuber 1991/92
 4. Ass. *Aro orientalis-Carpinetum* (Dobrescu et Kovács 1973) Täuber 1991/92

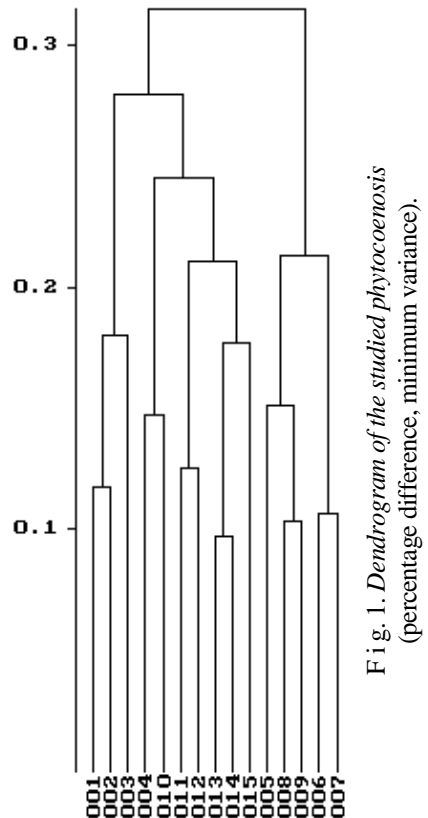


Fig. 1. Dendrogram of the studied phytocoenosis (percentage difference, minimum variance).

The dendrogram (Fig. 1) confirms the individuality of these four associations.

Presentation of the associations

1. Ass. *Quercus robori-Carpinetum* Soó et Pócs (1931) 1957 (= *Querceto-Carpinetum dacicum* Borza 1931 n.n. ex Pax 1943; *Querceto-Carpinetum transsilvanicum* Borza 1941; *Carpino-Quercetum roboris* Borza 1941; *Quercus robori-Carpinetum* Soó et Pócs (1931) 1957 subass. *dacicum* Schneider-Binder 1973)

- mesotrophic, xero-mesophilous hornbeam-oak grove forest.

This association grows on specially protected plots, in the Gheorghiuoia and Frumușica forests.

Habitat conditions. The association is situated along the valleys, at an altitude of 100-240 m a.s.l., on eastern and north-eastern slopes, with moderate declivities (1-15 degrees). Soils belong to the clay soil class, brown-luvic, slight to moderate pseudogleyic, eutrophic, having a medium potential trophicity and a moderate acidity. The climate is temperate-continental, having the average yearly temperature of 9.2 °C and annual precipitations of 570 mm.

Composition and structure. The tree layer is continuous, with *Quercus robur* (also *Q. petraea* and *Q. dalechampii*) as a dominant species as concerning its height and age, having a medium density of 100-350 trees per ha, with a medium diameter of 30-60 cm [5, 6].

In this association the hornbeam is well represented, with a density of 150-460 trees per ha, but with smaller diameters (3-24 cm).

Other species are: *Acer campestre*, *A. platanoides*, *Fraxinus excelsior*, *Ulmus minor*, *U. laevis*, *Cerasus avium*, *Sorbus torminalis*, *Tilia tomentosa*, etc.

The floristical composition of this association exhibits some species characteristic for subal. *Galio schultesii-Carpinenion*, as follows: *Tilia cordata*, *Lathyrus vernus*, *Ranunculus cassubicus*, *Stellaria hollostea* and others.

The overground biomass of the tree layer (total) is 428.47 t/ha, with a yearly productivity between 8.4 and 13.9 t/ha [6].

This is a deflected plant association from the climax oak-tree grove ones (Table 1).

Because in these two forests one can meet also a few thermophilous species (for instance *Quercus pedunculiflora*, *Corydalis *marschalliana* and others), it is rather difficult to include these phytocoenoses in the *Quercus robori-Carpinetum* Soó et Pócs (1931) 1957 association. We decided to keep the association mentioned above since there is no other coenotaxa comprising this kind of phytocoenoses, though there are some papers describing the same situation from the whole Moldavian Region [5, 8].

2. Ass. *Galio schultesii-Fagetum* (Burduja, Mihai et Sârbu 1972/73) Chifu et Ștefan 1994 (= *Carpino-Fagetum moldavicum* Burduja, Mihai et Sârbu 1972/73; *Carpino-Fagetum* auct. mold.)

- hilly beech forest, with mull flora of high productivity.

Table 1

Ass. *Quercus robori-Carpinetum* Soó et Pócs (1931) 1957

Sampling surface, m ²	400	400	400	400
Aspect	-	-	-	SE
Angle of slope (°)	-	-	-	10
Canopy	0.7-0.8	0.7	0.65-0.7	0.8
Tree height (m)	20-22	22	16-18	30
Tree diameter (cm)	16-60	20-60	20-40	10-90
Coverage of shrub layer (%)	30	30	50	30
Coverage of regenerative layer (%)	1	1	2	2
Coverage of herbaceous layer (%)	50	50	5	50
Sample number	1	2	3	4
<i>Quercus robur</i>	3	3	2	4
<i>Carpinus betulus</i>	+	+	+	1
<i>Galio schultesii-Carpinenion</i>				
<i>Cerasus avium</i>	+	-	+	-
<i>Stellaria holostea</i>	+	-	-	+
<i>Alno-Ulmion</i>				
<i>Viburnum opulus</i>	-	-	+	+
<i>Stachys sylvatica</i>	+	-	+	-
<i>Fagetalia</i>				
<i>Ajuga reptans</i>	+	-	-	+
<i>Asarum europaeum</i>	+	+	+	-
<i>Dentaria bulbifera</i>	+	-	-	+
<i>Euphorbia amygdaloides</i>	+	-	-	+
<i>Galium odoratum</i>	-	-	+	2
<i>Quercetea pubescenti-petraeae</i>				
<i>Acer campestre</i>	1	1	1	+
<i>Fraxinus angustifolia</i>	+	-	-	+
<i>Euonymus europaea</i>	+	+	+	+
<i>Ulmus minor</i>	-	-	+	+
<i>Brachypodium sylvaticum</i>	+	+	+	-
<i>Polygonatum latifolium</i>	+	-	-	+
<i>Pulmonaria officinalis</i>	-	+	+	+
<i>Schrophularia nodosa</i>	+	+	-	-
<i>Quercetea pubescenti-petraeae</i>				
<i>Acer tataricum</i>	+	-	+	-
<i>Quercus pedunculiflora</i>	+	+	+	+
<i>Viola hirta</i>	+	+	-	-
<i>Artemisietea et Stellarietea</i>				
<i>Arctium lappa</i>	-	+	+	+
<i>Ballota nigra</i>	+	+	-	-
<i>Torilis arvensis</i>	1	+	+	-
<i>Rhamno-Prunetea</i>				
<i>Sambucus nigra</i>	+	+	-	+
<i>Crataegus monogyna</i>	+	+	+	+
<i>Cornus sanguinea</i>	+	-	+	-

Table 1 (continued)

Ass. *Quercus robori-Carpinetum* Soó et Pócs (1931) 1957

<i>Galio-Urticetea</i>				
Aegopodium podagraria	+	+	-	2
Geum urbanum	+	-	+	-
Alliaria petiolata	+	+	-	-
Galium aparine	1	1	+	+
Rubus caesius	+	+	+	-
Urtica dioica	2	3	+	+

Sampling sites and date: 1, 2, 3 - Medeleni, 16. V. 2000; 4 - Gheorghitoaia, 17. V. 2000;

Species present in one sample: Ranunculus cassubicus +(4), Lathyrus vernus +(4), Campanula trachelium +(1), Tilia cordata +(2), Malus sylvestris +(1), Lysimachia nummularia +(2), Impatiens noli-tangere +(4), Glechoma hederacea +(1), Euphorbia serrulata +(1), Aristolochia clematitis +3, Anthriscus silvestris +(4), Scutellaria altissima +(1), Chaerophyllum aureum +(4), Isopyrum thalictroides +(4), Sanicula europaea +(4), Salvia glutinosa +(4), Paris quadrifolia +(4), Mercurialis perennis +(4), Maianthemum bifolium +(4), Geranium robertianum +(4), G. phaeum +(4), Galeobdolon luteum +(3), Corydalis * marschalliana +(4), Cardamine impatiens +(1), Allium ursinum 1(4), Rosa canina +(1), Daphne mezereum +(4), Tilia platyphyllos +(4), Ulmus glabra +(1), Viola reichenbachiana +(1), V. mirabilis +(4), Veronica hederifolia +(1), Ranunculus ficaria +(4), Prunella vulgaris +(4), Polygonatum multiflorum +(3), Hepatica nobilis +(4), Glechoma hirsuta +(4), Dryopteris carthusiana +(4), Convallaria majalis +(4), Bilderdykia dumetorum +(1), Astragalus glycyphyllos +(4), Asparagus tenuifolium +(3), Viburnum lantana +(3), Ligustrum vulgare +(3), Euonymus verrucosa +(4), Corylus avellana +(4), Pyrus pyraster +(3), Sorbus torminalis +(4), Cornus mas +(4), Stellaria media +(1), Solanum nigrum +(1), Polygonatum odoratum +(4).

Phytocoenoses of this association build up the fundamental vegetation cover in the plots proposed to be protected in the Bârnova-Repedeia forest massif, near the village of Poieni.

Total surface of this massif is about 13,000 ha.

Habitat conditions. The climate is temperate-continental, with cold winters (the lowest temperature below -30°C) and hot summers (with the highest temperatures of $+38^{\circ}\text{C}$); precipitations are below 600 mm/year; air humidity is relatively reduced. The altitude is lower than 400 m a.s.l.

Geology: the substratum is represented by clays, sandy clays, and limestone horizons of Sarmatian age.

Soils: brown clays, slightly to moderately pseudogleyed and brown luvisol moderately pseudogleyed.

Composition and structure. The plots that are typical for this forest massif show a high stand density (0.9-0.95), high tree diameters (1.3 m), through the almost total dominance of beech tree (all the tree species). In this plant association, as well as on the whole massif, one can remark a high frequency of *Fagus taurica* and *Fagus orientalis*, which accompany the *Fagus sylvatica*. *Fagus taurica* is a thermophilous species and occurs frequently on slopes with low declivity and strong insolation. In the same habitat, there are other thermophilous species: *Quercus dalechampii*, *Convallaria majalis* and others.

Table 2

Ass. *Galio schultesii*-Fagetum (Burduja, Mihai et Sârbu 1972/73) Chifu et Ștefan 1994, subass. *fagetosum tauricae* (Chifu 1995) Chifu et al. 1999

Sampling surface, m ²	1000	1000	1000	400	800	K%
Aspect	SE	E-SE	SE	SE	E-SE	
Angle of slope (°)	20	25	25	20	18	
Canopy	0.95-1	0.95-1	0.95	0.95	0.95	
Tree height (m)	29	28	28-30	30	30-32	
Tree diameter (cm)	30-60	30-60	30-60	20-60	20-60	
Coverage of regenerative layer (%)	2	3	3	2	2	
Coverage of herbaceous layer (%)	5-10	1	1	3	5	
Sample number	5	6	7	8	9	
<i>Fagus sylvatica</i>	2	1	+	2	3	
<i>Galium schultesii</i>	-	-	-	-	+	II
<i>Dif. subass.</i>						
<i>Fagus taurica</i>	4	5	5	4	3	V
<i>Fagus orientalis</i>	-	+	+	-	-	II
<i>Galio schultesii - Carpinenion</i>						
<i>Cerasus avium</i>	+	-	-	-	+	II
<i>Carpinus betulus</i>	+	+	-	+	+	IV
<i>Tilia cordata</i>	+	-	-	-	+	II
<i>Campanula trachelium</i>	-	-	-	+	+	II
<i>Symphyto-Fagion</i>						
<i>Carex pilosa</i>	-	-	+	+	+	III
<i>Alno-Ulmion</i>						
<i>Equisetum sylvaticum</i>	+	+	+	-	+	IV
<i>Stachys sylvatica</i>	+	-	-	+	+	III
<i>Fagetalia</i>						
<i>Acer platanoides</i>	+	+	+	+	1	IV
<i>Tilia platyphyllos</i>	+	+	-	+	-	III
<i>Ulmus glabra</i>	+	-	-	+	-	II
<i>Allium ursinum</i>	+	+	-	+	+	IV
<i>Asarum europaeum</i>	-	-	-	+	+	II
<i>Cardamine impatiens</i>	-	+	-	+	+	III
<i>Carex pendula</i>	-	+	-	-	+	II
<i>Carex silvatica</i>	+	+	-	+	-	III
<i>Dentaria bulbifera</i>	-	+	+	+	+	IV
<i>Euphorbia amygdaloides</i>	+	+	-	+	+	IV
<i>Galium odoratum</i>	1	+	+	+	-	IV
<i>Listera ovata</i>	-	-	-	+	+	II
<i>Salvia glutinosa</i>	+	-	-		+	III
<i>Sanicula europaea</i>	-	+	-	+	+	II
<i>Ouerco-Fagetea</i>						
<i>Acer campestre</i>	-	-	-	+	+	II
<i>Fraxinus excelsior</i>	+	+	+	+	+	V

Table 2 (continued)

Ass. *Galio schultesii-Fagetum* (Burduja, Mihai et Sârbu 1972/73) Chifu et Stefan 1994, subass. *fagetosum tauricae* (Chifu 1995) Chifu et al. 1999

<i>Cephalanthera damasonium</i>	-	-	-	+	-	I
<i>Cephalanthera longifolia</i>	-	-	-	+	+	II
<i>Convallaria majalis</i>	-	-	-	+	+	II
<i>Cypripedium calceolus</i>	-	+	-	-	+	II
<i>Dryopteris carthusiana</i>	+	+	+	-	-	III
<i>Lapsana communis</i>	-	-	-	+	+	II
<i>Mycelis muralis</i>	+	+	+	+	+	V
<i>Platanthera bifolia</i>	+	-	-	+	+	III
<i>Pulmonaria officinalis</i>	+	-	-	+	+	III
<i>Ranunculus ficaria</i>	-	-	-	+	+	II
<i>Viola reichenbachiana</i>	+	-	-	+	+	III
<i>Quercetea pubescenti-petraeae</i>						
<i>Viola hirta</i>	-	+	-	-	+	II
<i>Rhamno-Prunetea</i>						
<i>Clematis vitalba</i>	-	-	-	+	+	II
<i>Galio-Urticetea</i>						
<i>Aegopodium podagraria</i>	-	-	-	+	+	II
<i>Alliaria petiolata</i>	-	-	-	+	+	II
<i>Geum urbanum</i>	+	-	-	+	-	II
<i>Chaerophyllum temulum</i>	-	-	-	+	+	II
<i>Impatiens noli-tangere</i>	+	+	+	+	+	V
<i>Galium aparine</i>	+	-	+	+	+	IV
<i>Urtica dioica</i>	+	-	-	-	+	II

Sampling sites and date: 1-5 - Poieni-Dobrovăț, 18. V. 2000;

Species present in one sample: *Ranunculus cassubicus* +(5), *Stellaria hollostea* +(5), *Ulmus laevis* +(5), *Viburnum opulus* +(5), *Eupatorium cannabinum* +(2), *Glechoma hederacea* +(5), *Lysimachia nummularia* +(5), *Solanum dulcamara* +(1), *Acer pseudoplatanus* +(3), *Ajuga reptans* +(4), *Galeobdolon luteum* +(5), *Geranium robertianum* +(4), *Lilium martagon* +(5), *Maianthemum bifolium* +(5), *Mercurialis perennis* +(3), *Orchis purpurea* +(5), *Quercus dalechampii* +(5), *Cornus sanguinea* +(2), *Euonymus europaea* +(4), *Hedera helix* +(1), *Viburnum lantana* +(5), *Brachypodium sylvaticum* +(4), *Carex digitata* +(3), *Carex * pairaei* +(2), *Cephalanthera longifolia* +(1), *Moehringia trinervia* +(5), *Polygonatum latifolium* +(2), *Polygonatum multiflorum* +(5), *Prunella vulgaris* +(2), *Schrophularia nodosa* +(4), *Veronica hederifolia* +(5), *Vicia sepium* +(5), *Viola mirabilis* +(5), *Polygonatum odoratum* +(5), *Rumex obtusifolius* +(4), *Torilis arvensis* +(4).

From a phytogeographical point of view, the higher land is covered by pure beech groves (with all tree species), or in mixture with other species. The fields situated under the higher land are covered by oak tree groves, with sporadically disseminated beech.

The shrub layer is quite undeveloped; the herbs are equally undeveloped being more expressive during spring time, when one can distinguish various facies with *Anemone ranunculoides*, *A. nemorosa*, *Ranunculus ficaria*, *Isopyrum thalictroides*, *Adoxa moschatellina*, *Scilla bifolia* and *Allium ursinum*.

The orientation of the investigated plots is NE, E and SE, with moderate slopes (5-25 degrees). The beech trees are over 30 m high, showing great diameters (over 1.2 m) [6].

The mull flora is represented by *Galium odoratum*, *Actaea spicata*, *Galium schultesii* and *Allium ursinum* (Table 2).

3. Ass. ***Euonymo nanae-Carpinetum*** (Borza 1937) Seghedin, Filipașcu et Boșcaiu 1977 (= *Querceto-Carpinetum bessarabicum* Borza 1937; *Melampyro polonicae-Carpinetum podolico-moldavicum* (Szafer 1935) Soó 1964)

- Moldavian podzolic hornbeam forest, oligotrophic, on flood plains.

Phytocoenoses of this association were identified in the Gheorghiuțoia forest, on the flood plain of the Sacovăț rivulet.

Habitat conditions. Soils are alluvial-gleyic, on sands or sandy alluvia, ordinarily wet, flooded in spring time by waters of the Sacovăț rivulet, having a pluvial water supply.

Composition and structure. Density of stand is 0.7-0.8, with 32-34 m high *Quercus robur* trees. In the tree layer there are other species, too, like *Carpinus betulus*, *Acer campestre*, *Fraxinus excelsior*, *Tilia platyphyllos* and the rare *Ulmus laevis*.

The shrub layer is faintly represented, while the herb layer shows even a 70% coverage; among species with a higher AD, there is *Allium ursinum*, *Ranunculus repens*, *Impatiens noli-tangere*, *Aegopodium podagraria*, *Lycopus europaeus*, *Iris pseudacorus* and *Solanum dulcamara*. All of these species indicate wet substratum, on which the phytocoenoses are installed.

Table 3

Ass. ***Euonymo nanae-Carpinetum*** (Borza 1937) Seghedin, Filipașcu et Boșcaiu 1977

Sampling surface, m ²	400	400
Aspect	E	E
Angle of slope (°)	2	3
Canopy	0.7-0.8	0.7-0.8
Tree height (m)	32-34	30-32
Tree diameter (cm)	10-100	20-120
Coverage of scrub layer (%)	10	10
Coverage of herbaceous layer (%)	70	40
Coverage of regenerative layer (%)	5	5
Sample number	10	11
<i>Carpinus betulus</i>	+	1
<i>Euonymus nana</i>	+	+
<i>Galio schultesii-Carpinenion</i>		
<i>Cerasus avium</i>	+	-
<i>Tilia cordata</i>	-	+
<i>Lathyrus vernus</i>	+	-
<i>Ranunculus cassubicus</i>	+	-
<i>Stellaria holostea</i>	-	1
<i>Aro orientalis-Carpinenion</i>		
<i>Tilia tomentosa</i>	+	-
<i>Alno-Ulmion</i>		
<i>Ulmus laevis</i>	+	+
<i>Viburnum opulus</i>	+	-
<i>Anthriscus silvestris</i>	+	-

Table 3 (continued)

Ass. *Euonymo nanae-Carpinetum* (Borza 1937) Seghedin, Filipașcu et Boșcaiu 1977

Carex remota	-	+
Lysimachia nummularia	-	+
Ranunculus repens	+	+
Solanum dulcamara	+	+
Stachys sylvatica	-	+
<i>Fagetalia</i>		
Tilia platyphyllos	+	-
Ulmus glabra	+	+
Ajuga reptans	+	+
Allium ursinum	4	+
Asarum europaeum	-	+
Cardamine impatiens	+	+
Carex sylvatica	-	+
Dentaria bulbifera	+	+
Galeobdolon luteum	-	+
Galium odoratum	-	+
Geranium phaeum	-	+
Mercurialis perennis	+	1
Milium effusum	-	+
Paris quadrifolium	+	+
Pulmonaria officinalis	-	+
<i>Ouercio-Fagetea</i>		
Acer campestre	1	1
Fraxinus excelsior	+	1
Quercus robur	4	3
Ulmus minor	+	-
Corylus avellana	+	+
Euonymus europaea	+	-
Carex * pairaei	-	+
Polygonatum multiflorum	-	+
Ranunculus ficaria	-	+
<i>Phragmitetea</i>		
Alisma plantago-aquatica	-	+
Iris pseudacorus	+	-
<i>Rhamno-Prunetea</i>		
Sambucus nigra	+	-
Crataegus monogyna	+	+
Cornus sanguinea	+	+
<i>Galio-Urticetea</i>		
Geum urbanum	-	1
Aegopodium podagraria	+	+
Alliaria petiolata	-	+
Glechoma hederacea	-	+
Galium aparine	+	1
Rubus caesius	+	+
Impatiens noli-tangere	-	+
Urtica dioica	+	+
<i>Aliae</i>		
Cardamine pratensis	+	+
Lysimachia vulgaris	+	-
Stellaria media	+	-

Sampling sites and date: 1, 2 - Gheorghiuoia, 17.V.2000

The characteristic species for this association is *Euonymus nana*, a rare species in the Moldavian flora, and this is why this newly proposed forest reserve is obviously justified, beside the beautiful landscape existing there (Table 3).

4. Ass. *Aro orientalis-Carpinetum* (Dobrescu et Kovács 1973) Täuber 1991/92 (= *Quercus robori-Tilio-Carpinetum* Dobrescu et Kovács 1973)
- Moldavian podzolic hornbeam stands, mesophilous.

This association is somehow rare in our country (in comparison with the previous associations), but on the basis of its floristic composition and comparative ecological analyses the association seems to be well definite and clearly individualised.

Table 4

Ass. *Aro orientalis-Carpinetum* (Dobrescu et Kovács 1973) Täuber 1991/92

Sampling surface, m ²	400	400	400	400
Aspect	SV	SV	SV	SE
Angle of slope (°)	2-3	2-3	2-3	5
Canopy	0.85-0.9	0.9	0.8	0.9
Tree height (m)	30-34	30-32	25-28	30
Tree diameter (cm)	20-110	20-80	20-100	20-80
Coverage of shrub layer (%)	10	2	-	20
Coverage of regenerative layer (%)	2	3	3	2
Coverage of herbaceous layer (%)	70	95	10	50
Sample number	12	13	14	15
<i>Arum orientale</i>	+	+	+	+
<i>Carpinus betulus</i>	+	1	2	1
<i>Quercus robur</i>	4	2	2	2
<i>Aro orientalis- Carpinenion</i>				
<i>Corydalis * marschalliana</i>	+	+	-	+
<i>Lathyro hallersteinii-Carpinenion</i>				
<i>Cerasus avium</i>	+	+	-	+
<i>Tilia cordata</i>	1	2	1	-
<i>Campanula trachelium</i>	+	+	-	-
<i>Lathyrus vernus</i>	+	+	-	-
<i>Ranunculus cassubicus</i>	-	-	+	-
<i>Stellaria holostea</i>	1	-	+	-
<i>Alno-Ulmion</i>				
<i>Lysimachia nummularia</i>	-	+	+	-
<i>Ranunculus repens</i>	+	-	+	-
<i>Stachys sylvatica</i>	+	-	+	-
<i>Symphyto-Fagion</i>				
<i>Isopyrum thalictroides</i>	-	+	+	-
<i>Fagetalia</i>				
<i>Acer platanoides</i>	+	-	-	+
<i>Fagus sylvatica</i>	+	-	-	1
<i>Tilia platyphyllos</i>	+	-	+	+
<i>Ulmus glabra</i>	+	+	-	+
<i>Rosa canina</i>	-	+	+	-
<i>Ajuga reptans</i>	+	+	-	-
<i>Allium ursinum</i>	+	5	+	1
<i>Asarum europaeum</i>	+	+	+	+
<i>Cardamine impatiens</i>	+	+	+	-

Table 4 (continued)

Ass. <i>Aro orientalis-Carpinetum</i> (Dobrescu et Kovács 1973) Täuber 1991/92				
<i>Carex sylvatica</i>	+	-	+	-
<i>Corydalis solida</i>	+	-	+	+
<i>Dentaria bulbifera</i>	+	+	+	+
<i>Euphorbia amygdaloides</i>	+	+	-	+
<i>Galeobdolon luteum</i>	+	+	+	+
<i>Galium odoratum</i>	1	+	1	1-2
<i>Geranium robertianum</i>	-	+	+	-
<i>Maianthemum bifolium</i>	+	+	+	-
<i>Mercurialis perennis</i>	1	+	-	-
<i>Neottia nidus-avis</i>	-	-	+	+
<i>Paris quadrifolia</i>	+	+	+	-
<i>Sanicula europaea</i>	+	+	+	+
<i>Quercus-Fagetea</i>				
<i>Acer campestre</i>	+	+	+	+
<i>Fraxinus excelsior</i>	+	-	+1	-
<i>Corylus avellana</i>	+	-	-	+
<i>Euonymus europaea</i>	+	-	+	-
<i>Brachypodium sylvaticum</i>	+	-	+	-
<i>Convallaria majalis</i>	+	+	+	+
<i>Dryopteris filix-mas</i>	+	+	+	-
<i>Fragaria vesca</i>	+	-	+	-
<i>Geranium phaeum</i>	+	+	-	-
<i>Glechoma hirsuta</i>	+	+	-	-
<i>Lapsana communis</i>	-	+	+	-
<i>Mycelis muralis</i>	-	-	+	+
<i>Platanthera bifolia</i>	-	+	+	-
<i>Polygonatum multiflorum</i>	+	-	+	+
<i>Pulmonaria officinalis</i>	-	+	-	+
<i>Ranunculus ficaria</i>	+	1	1	+
<i>Schrophularia nodosa</i>	+	+	+	-
<i>Viola reichenbachiana</i>	-	+	+	-
<i>Rhamno-Prunetea</i>				
<i>Crataegus monogyna</i>	+	+	-	-
<i>Cornus sanguinea</i>	+	-	-	1
<i>Galio-Urticetea</i>				
<i>Geum urbanum</i>	+	+	+	-
<i>Alliaria petiolata</i>	+	-	+	-
<i>Impatiens noli-tangere</i>	-	+	+	-
<i>Chaerophyllum temulum</i>	+	-	+	-
<i>Glechoma hederacea</i>	+	+	-	-
<i>Galium aparine</i>	+	+	-	+
<i>Urtica dioica</i>	+	+	+	-
<i>Artemisietea et Stellarietea</i>				
<i>Arctium lappa</i>	+	+	+	-
<i>Stellaria media</i>	-	+	+	-
<i>Taraxacum officinale</i>	-	+	+	-
<i>Tussilago farfara</i>	-	+	+	-

Sampling sites and date: 1, 2, 3 - Frumușica, 11. V. 2000; 4 - Gheorghitoaia, 17. V. 2000;

Species present in one sample: *Acer tataricum* +(2), *Tilia tomentosa* +(4), *Carex pilosa* +(4), *Ranunculus cassubicus* +(3), *Sambucus nigra* +(1), *Aegopodium podagraria* 3(1), *Anthriscus silvestris* +(3), *Cirsium oleraceum* +(1), *Cruciata laevipes* +(1), *Petasites hybridus* +(1), *Scopolia camiolica* +(2), *Rubus caesius* +(3), *Lathraea squamaria* / *Fagus sylvatica* +(1), *Lilium martagon* +(1), *Quercus dalechampii* +(4), *Viburnum lantana* +(1), *Astragalus glycyphyllos* +(1), *Dryopteris carthusiana* +(4), *Hepatica nobilis* +(1), *Primula veris* +(1), *Prunella vulgaris* +(3), *Ranunculus auricomus* +(2), *Veronica hederifolia* +(3), *Cephalanthera damassonium* +(3).

Habitat conditions. It grows on rich, dark and brown-gray humiferous soils, with typical mull flora, with slightly acid to neutral pH (6.5-7). This is a climatic association.

Composition and structure. Phytocoenoses of this association are usually settled down in the lower part of slopes having a faint declivity and, sometimes, even on some plateaus, between 150-250 m a. s. l. Sometimes the phytocoenoses of this association are interfering with those of the flood plain association *Euonymo nanae-Carpinetum*. Characteristic species of this association are *Arum orientale* and *Tilia tomentosa*.

In the tree layer *Quercus robur* and *Carpinus betulus* are dominant.

The herb layer is well developed, some species being conspicuous: *Arum orientale*, *Corydalis cava* subsp. *marschalliana*, *Corydalis solida* and others (Table 4).

Conclusions. The Moldavian Central Plateau and the upper Prut Flood Plain are strongly influenced by human activities. As the surface of the forest areas decreases gradually, their structure becoming more and more vulnerable. The studied forests fulfill the conditions for possible botanical reservations, considering their rare species and representative features of the identified associations. Most of these forests have a high regenerative capacity, that is why they can be considered valuable seed reserves and natural spreading source of the autochthonous species on the neighbouring fields.

Our present study is the first part of studies which will be carried out with the aim to identify and indicate other important areas for conservation of biodiversity in the Moldavian Region.

REFERENCES

1. B â r c a, C., *Considerații geobotanice asupra pădurii Buciumeni-Tecuci*, "Stud. Comun., Muz. Ști. Nat. Bacău", 1969, 107-123.
2. C h i f u, T., *Contributions à la syntaxonomie de la végétation de la classe Carpino-Fagetea (Br.-Bl. et Vlieg. 1937) Jackus 1960 sur la territoire de la Moldavie (Roumanie)*, "An. Ști. Univ. "Al. I. Cuza" Iași, Ser. II-a, Biol. Veg.", **41**, 1995, 61-66.
3. C h i f u, T., S â r b u, I., Ș t e f a n, N., Ș u r u b a r u, B., *Contribuții la fitocenologia fâgetelor colinare și a cărpinetelor din Podișul Central Moldovenesc*, "Bul. Grăd. Bot., Univ. "Al. I. Cuza" Iași", **8**, 1999, 49-70.
4. C h i f u, T., Ș t e f a n, N., *Recherches phytocoenologiques dans les hêtraies collinaires du plateau de Suceava*, "An. Ști. Univ. "Al. I. Cuza" Iași, Ser. II-a, Biol. Veg.", **40**, 1994, 71-80.
5. C h i f u, T., Ș t e f a n, N., C o r o i, M., *Étude phytocoenologique et la biomasse de l'association Tilio tomentosae-Carpinetum Doniță (68) 70 du Plateau Centrale Moldave*, "An. Ști. Univ. "Al. I. Cuza" Iași, Ser. II-a, Biol. Veg.", **39**, 1993, 65-73.

6. Chifu, T., Ștefan, N., Coroi, M., Coroi, A.M., Huțanu, M., Parascan, C., *Biomasse et productivité annuelle aériennes de la strate arborescente des charmille du Plateau Centrale Moldave*, "An. Ști. Univ. "Al. I. Cuza" Iași, Ser. II-a, Biol. Veg.", **42**, 1996, 51-73.
7. Dobrescu, C., Bârcă, C., Lazăr, M., *Contribuții floristice și geobotanice referitoare la masivul forestier Bârnova-Repedea Iași (II)*, "An. Ști. Univ. "Al. I. Cuza" Iași, Ser. II-a, Biol. Veg.", **10** (2), 1964, 323-357.
8. Dobrescu, C., Eftimie, E., *Aspecte floristice și geobotanice cu privire la pădurea Uricani-Iași*, "An. Ști. Univ. "Al. I. Cuza" Iași, Ser. II-a, Biol. Veg.", **12** (1), 1966, 157-172.
9. Dobrescu, C., Kovács, A., *Contribuții la fitocenologia pădurilor de "Fagion" din Podișul Central Moldovenesc*, "Rev. Păd.", **11**, 1973, 592-599.
10. Mititelu, D., Chifu, T. (Coord.), *Cercetări ecologice în pădurea (Carpino-Fagetum) Domnița-Voinești (jud. Iași)*, "Stud. Comun., Muz. Ști. Nat. Bacău", 1976-1977, 361-434.
11. Mititelu, D., Monah, F., *Flora și vegetația rezervației forestiere "Lunca Zamostei" (Jud. Suceava)*, "Bul. Grăd. Bot." (Iași), **4**, 1993, 61-68.
12. Seghedin, T., Filipașcu, G., Boșcaiu, N., *Cercetări biocenologice în rezervația naturală Lunca Zamostei*, "Stud. Comun. Ocrot. Nat." (Suceava), 1977, 79-86.
13. Tăuiber, F., *Contribuții la sintaxonomia cârpinetelor carpato-dacice (Lathyro-Carpinenalia)*, "Contrib. Bot." (Cluj-Napoca), 1991-1992, 15-29.

ACCUMULATION OF PHOTOSYNTHETIC PIGMENTS AND PROTEINS IN THE LEAVES OF SOYBEAN PLANTS CULTIVATED ON MINE SPOILS

SILVIA ONAC^{*1}, VICTOR BERCEA^{**} and MIHAI TRIFU^{*2}

SUMMARY. – The influence of heavy metals from mine spoils (Cavnic, Baia Mare mining area, Romania) on the synthesis and accumulation of photosynthetic pigments and proteins in soybean leaves was investigated. Soybean plants (*Glycine max* cvs. Agat and Diamant) were grown under field conditions in the following variants: control (unpolluted soil), 50% spoils+50% unpolluted soil, 100% spoils. The accumulation of photosynthetic pigments and proteins in the leaves of soybean plants was estimated in various vegetation stages: the beginning of flowering, the beginning of pod genesis, and the stage of fruit ripening. The amount of photosynthetic pigments in leaves of both soybean cultivars grown in spoil variants decreased. The chlorophylls were more affected than the carotenoid pigments. The plants cultivated in 100% spoils accumulated a high amount of proteins in leaves. The Agat cv. plants contained more proteins in leaves than the Diamant cv. plants, not only for the spoil variants, but for control as well.

One of the most common visible symptoms of the heavy metal toxicity in plants is chlorosis, as a result of the decreasing content of chlorophylls in leaves, which may be caused by the inhibition of biosynthesis of these pigments or by their enzymatic degradation [3, 4]. Chlorosis may be a first indication of an insufficient detoxification of metals resulting in the impairment of the physiological processes in plants [8].

The objective of our study was to examine the effects of the heavy metals from mine spoils on the synthesis of photosynthetic pigments and proteins in the leaves of soybean plants.

Materials and methods. The plant used in the present study was soybean, *Glycine max* (L.) Merrill. The plants of two soybean cultivars, Agat and Diamant, created by the Agricultural Research Station, Turda, Romania, were cultivated under field conditions. The experiment was described in a previous paper [18] and lasted one vegetation cycle.

^{*1} Babeș-Bolyai University, Department of Plant Physiology, University Library "Lucian Blaga", 3400 Cluj, Romania. E-mail: sonac@bioge.ubbcluj.ro

^{*2} Babeș-Bolyai University, Department of Plant Physiology, 3400 Cluj, Romania

^{**} Biological Research Institute, 3400 Cluj, Romania

The accumulation of photosynthetic pigments and proteins in the leaves of soybean plants was estimated in different vegetation stages: the beginning of flowering, S1, the beginning of pod genesis, S2, and the stage of fruit ripening, S3. For determining the photosynthetic pigments, leaves located on the same level were used. Disc samples of 1.3 cm in diameter were sectioned from the middle limb of sampled leaves. The extraction of the pigments was performed in acetone. The leaf samples were ground with CaCO_3 and glass pearls and then the extract was clarified by under-pressure filtration. The identification of pigments was performed with a spectrophotometer (UNICAM SP1800) based on the specific absorption coefficient, at the following wavelengths: 663 nm (chlorophyll *a*), 645 nm (chlorophyll *b*) and 472 nm (carotenoids). The quantitative expression was based on Arnon's method [2]. The results were expressed in mg/g fresh matter. For determining the proteins, the samples used for the extraction of photosynthetic pigments were hydrolysed at 100°C for one hour in 0.1 N NaOH, after which Lowry [12] reaction was performed using the basic protein extract. The method consists of reducing the Folin-Ciocalteu reagent by the amino acids within the proteins. The total amount of proteins was measured with a spectrophotometer at the wavelength of 690 nm. The results were related to a standard curve and expressed in mg/g fresh matter.

Results and discussion. The evolution of the content of chlorophylls and carotenoids in the leaves of soybean plants, Agat cv., is shown in Fig. 1.

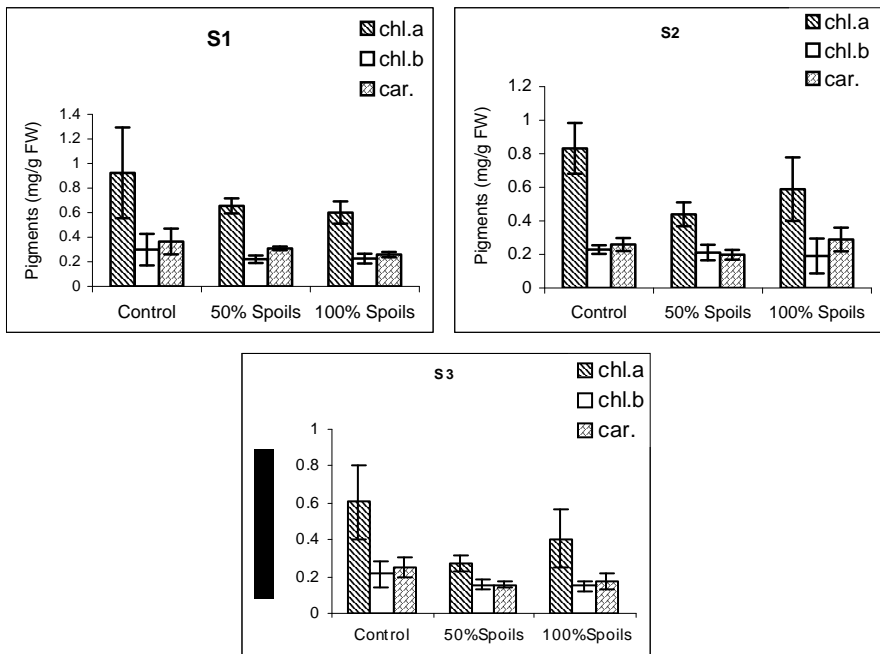


Fig. 1. Accumulation of chlorophylls and carotenoids in soybean leaves, Agat cv., in three vegetation stages: S1= the beginning of flowering, S2= the beginning of pod genesis, S3= fruit ripening (n=3).

The content of pigments decreased in all three cultivation variants by the end of the vegetation cycle, when the physiological senescence occurred, except for the carotenoids within the leaves of plants cultivated in 100% spoils, the amount of which increased in S2 compared to S1. The greatest decrease occurred in the case of chlorophyll *a* and carotenoids in the plants from the 50% spoil variant: by 60 and 50%, respectively, in S3 compared to S1.

When compared to the control (Fig. 2), the content of photosynthetic pigments (with the exception mentioned above) in the plants cultivated in spoil variants decreased in all three vegetation stages. In S1 the content of chlorophyll *a* in the leaves of plants from 50% spoils decreased by 29% of control, while in S2 and S3 this reduction is much marked, up to 55% in S3. In plants from 100% spoils the content of chlorophyll *a* also decreased as compared to control, but in a lower percentage (Fig. 2, A).

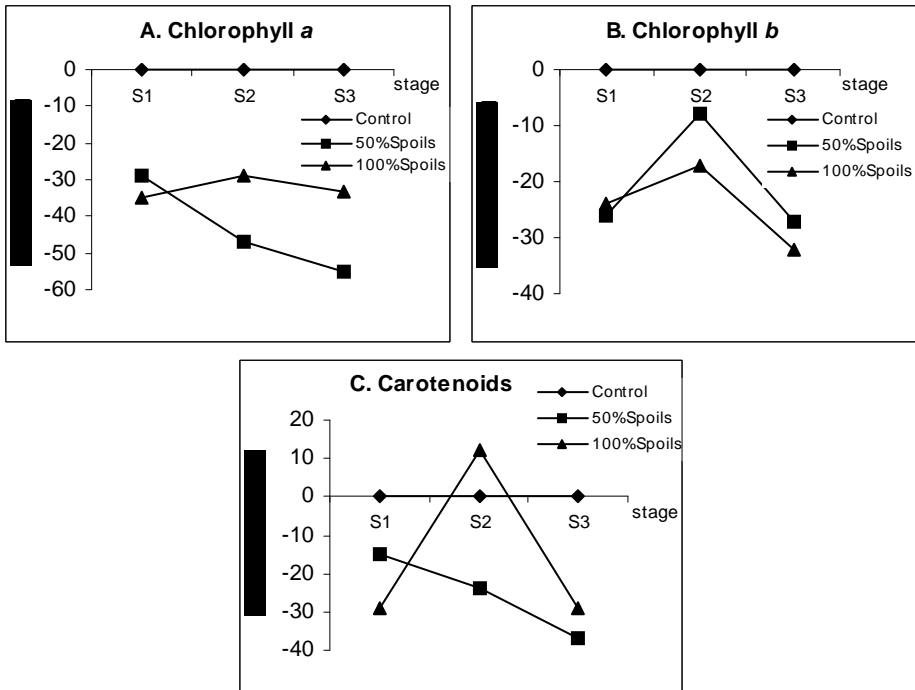


Fig. 2. The influence of heavy metals from spoils on the accumulation of chlorophylls and carotenoids (% of control) in the leaves of soybean plants, Agat cv., in three vegetation stages (S1, S2, S3 – for explanations see Fig. 1; n=3).

The content of chlorophyll *b* decreased in a similar way in the plants of both spoil variants, more in S1 and S3, and less in S2 (Fig. 2, B). As for the content of carotenoids (Fig. 2, C), it decreased progressively in plants from 50% spoils, by 15, 24, and 37% of control, in S1, S2, and S3, respectively, but in the plants from

100% spoils it diminished by 29% of control in S1, after which it increased by 12% in S2, and decreased again by 29% in S3.

Of the studied pigments, the greatest decrease was recorded for the chlorophyll *a* within the leaves of plants grown in 50% spoils, by half of control in S2 and S3. These results were in accordance with the morphological observations, since the leaves of Agat cv. plants cultivated in 50% spoils became chlorotic towards the end of June and many of them started to fall by the middle of August.

These modifications in the content of photosynthetic pigments were also reflected in their ratio (Table 1), the lowest values being recorded for the chlorophyll *a/b* ratio in the plants from 50% spoils in S2 and S3.

Table 1

The ratio between photosynthetic pigments in soybean leaves, Agat cv.

Variants	Vegetation stages					
	S1		S2		S3	
	Chl.a/b	Chls./Car.	Chl.a/b	Chls./Car.	Chl.a/b	Chls./Car.
Control	3.15	3.27	3.61	4.08	2.82	3.28
50% Spoils	3.00	2.83	2.18	3.30	1.75	2.78
100% Spoils	2.68	3.18	3.40	2.64	2.70	3.15

The evolution of the content of photosynthetic pigments in the leaves of soybean plants, Diamant cv., in the three vegetation stages, is shown in Fig. 3. In all cultivation variants the content of pigments decreased in S2 and S3 compared to S1 and slightly increased in S3 compared to S2, except for the 50% spoil variant, where the amount of chlorophylls remained almost at the same level in S2 and S3. Similarly to the plants of Agat cv., the content of chlorophyll *a* and carotenoids in the plants of Diamant cv. cultivated in the 50% spoil variant decreased mostly: 47% in S3 compared to S1 and 47% in S2 compared to S1, respectively.

The chlorophyll *a/b* and chlorophylls/carotenoids ratios in the case of Diamant cv. plants varied to a small extent (Table 2).

Table 2

The ratio between photosynthetic pigments in soybean leaves, Diamant cv.

Variants	Vegetation stages					
	S1		S2		S3	
	Chl.a/b	Chls./Car.	Chl.a/b	Chls./Car.	Chl.a/b	Chls./Car.
Control	3.50	3.47	3.16	3.35	3.10	3.49
50% Spoils	3.32	3.29	3.20	3.47	3.12	2.97
100% Spoils	3.63	3.13	3.23	3.04	2.91	3.29

In both cultivation variants with spoils the content of pigments decreased as compared to the control, in all three vegetation stages (Fig. 4). The amount of pigments in plants grown in 50% spoil variant decreased progressively from S1 to S3 (excepting the carotenoids), while in plants cultivated in 100% spoil variant it decreased in a higher percentage in S1 and in a smaller percentage in S2 and S3,

suggesting that after the first shock caused by an hostile environment, the plants managed to adapt and survive in this environment.

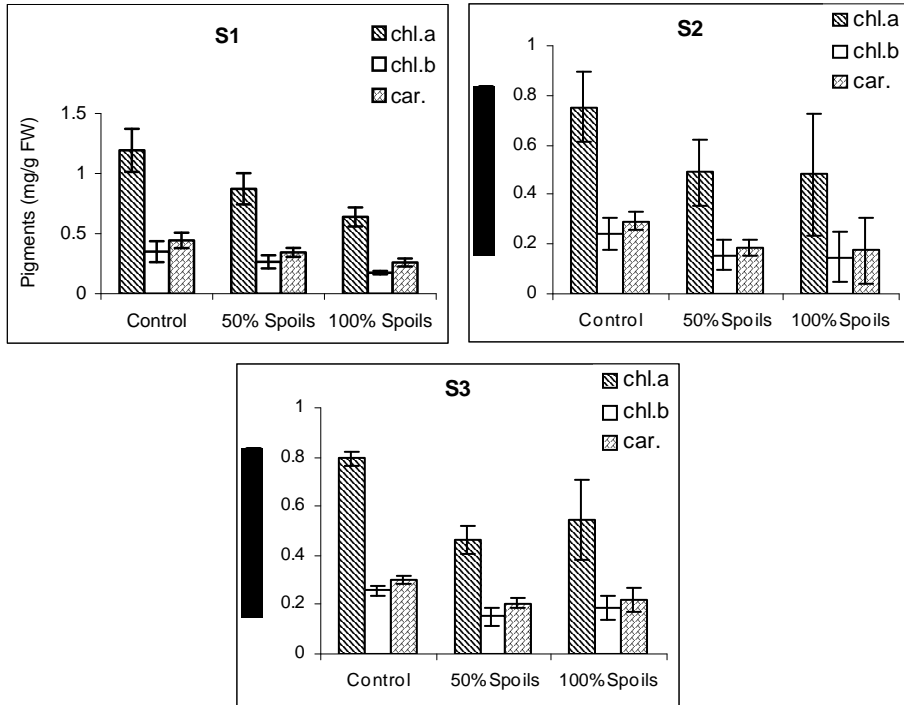


Fig. 3. Accumulation of chlorophylls and carotenoids in soybean leaves, *Diamant* cv., in three vegetation stages (S1, S2, S3 – for explanations see Fig. 1; n=3).

Leaf chlorosis, visible in plants cultivated in heavy metal polluted soils, may be the result of direct inhibition of chlorophyll synthesis by heavy metals or may be caused by the interaction between metals, such as Cd and Fe. Thus, Cd inhibits both the induction and function of root Fe(III) reductase responsible for reducing Fe(III) to Fe(II), the form in which roots absorb Fe [19, 23]. This leads to Fe deficiency, with many implications on plant physiology and metabolism, considerably affecting, among others, the photosynthetic apparatus by decreasing chlorophyll biosynthesis, disorganizing the chloroplast structure and even reducing Rubisco content in chloroplasts. The most probable major target of Cd/Fe interaction effects is the Calvin cycle [23].

Cu and Zn can displace Fe from chelate complexes which are important both inside the plant and in the soil [22]. Copper toxicity may induce iron deficiency. Excess concentration of Cu and Cd affects the chloroplast ultrastructure and inhibits the electron transport in both photosystem I and photosystem II. The inhibition of photosystems induces the production of toxic active oxygen species, causing lipid peroxidation, which results in the destruction of chlorophylls, carotenoids, and finally the chloroplast membranes [3, 7, 15]. Degradation of the inner structure of chloroplasts is similar to senescence response, Cd and Cu producing the destruction of acyl lipids in

thylakoid membranes [4, 14]. Cd, even when present in low concentrations, induces the production of ethylene, the typical senescence phytohormone [19].

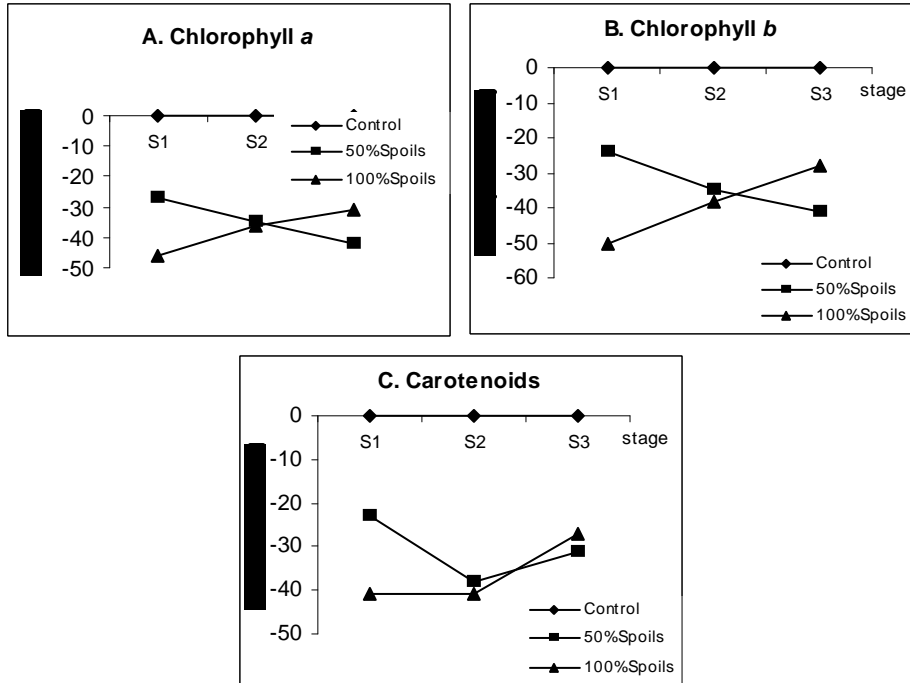


Fig. 4. The influence of heavy metals from spoils on the accumulation of chlorophylls and carotenoids (% of control) in the leaves of soybean plants, *Diamant cv.*, in three vegetation stages (S1, S2, S3 – for explanations see Fig. 1; n=3).

Zinc toxicity manifests itself also by inhibition of photosynthesis. It decreases Rubisco activity presumably because of the competition with magnesium and inhibits photosystem II activity by replacement of Mn in the water-splitting complex. Zinc toxicity leads to chlorosis, which may be an induced deficiency of Mg or Fe, as a consequence of the similar ion radius of these elements [15].

For both soybean cultivars the content of the analysed pigments (excepting the chlorophyll *b* in *Agat cv.* plants) in the leaves of plants cultivated in 50% spoils decreased as compared to the control, less than the content in the leaves of plants grown in 100% spoils in S1, after which it decreased progressively, so that by the end of August the decrease was more intense in plants from 50% spoils than in those from 100% spoils (Figs. 2 and 4).

Only one category of pigments in plants from spoil variants exceeded the control, namely the carotenoids in leaves of *Agat cv.* plants cultivated in 100% spoils, in S2, when their level was 12% higher than in the control (Fig. 2, C). Other authors reported that heavy metals caused the decrease of pigment contents, this effect being more pronounced on the chlorophylls than on the carotenoids [10, 11, 13].

S k ó r z y n s k a – P o l i t *et al.* [24] noticed an accumulation of carotenoids in all growth stages of the plant leaves treated with Cd, as a protection response of plants against the oxidative stress caused by heavy metals.

The content of proteins in leaves is a sensitive parameter in appreciating the physiological and metabolic state of plants under stress conditions [5]. Proteins are one of the final products of photosynthesis and soybean leaves contain a high amount of proteins, which migrate to the seeds as plants reach maturity [17].

In all the cultivation variants, the content of proteins in leaves of both soybean cultivars was illustrated by low values in S1. These values reached a maximum in S2 and decreased in S3, as a consequence of protein translocation to seeds (Fig. 5).

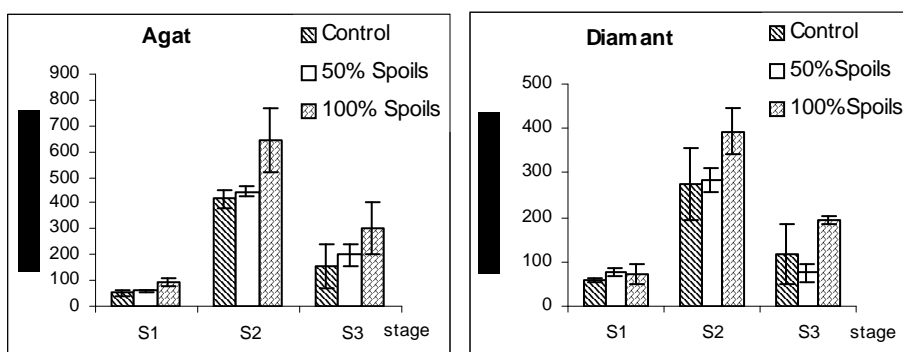


Fig. 5. Accumulation of proteins in soybean leaves, *Agat* and *Diamant* cvs., in three vegetation stages (S1, S2, S3 – for explanations see Fig. 1; n=3).

For *Agat* cv., the content of proteins in all the three vegetation stages was higher in the leaves of plants cultivated in spoil variants as compared to the control. High values were recorded in plants of 100% spoil variant, especially in S2.

In the case of *Diamant* cv., a progressive accumulation of proteins in the leaves was recorded in plants of 100% spoil variant as compared to the control. As for the 50% spoil variant, the content of proteins in leaves increased in S1 comparing to the control, but it decreased by the end of the vegetation period, so that in S3 it was lower than in the control. Unlike the *Agat* cv., the difference between the amount of proteins in the leaves of *Diamant* cv. plants from 100% spoil variant and that of control was much lower.

The increased amount of proteins in leaves of soybean plants cultivated in spoil variants could be caused by the action of heavy metals from spoils. Heavy metals induce in plants the synthesis of cysteine-rich peptides called phytochelatins, Cd being the strongest inducer and Zn the weakest [25]. Phytochelatins bind metals, keeping the intracellular availability of essential metals within certain limits and reducing the availability of nonessential metals [26]. The *Agat* cv. plants contained more proteins in leaves than the *Diamant* cv. plants, not only for the spoil variants, but for control as well.

The increase of protein or amino acid content in plants under the influence of heavy metals was reported by many authors [1, 9]. Heavy metals in excess cause the accumulation of proline in plants [6]. This amino acid was found to be present in the cell wall structural proteins, too [21]. The accumulation of proline is caused by the water deficit induced by heavy metals and it could contribute to the maintenance of water balance and possibly to the scavenging of hydroxyl radicals and metal chelation in the cytoplasm [6, 16, 20]. Also, heavy metals induce the synthesis of stress proteins, which might limit and repair the damages caused by metals to cell proteins and exert protective effects on membranes [19].

The high amount of proteins in the leaves of soybean plants before harvesting, when the plants are close to the end of developmental cycle, could indicate a low translocation to seeds.

Conclusions. 1. The amount of photosynthetic pigments in leaves of both soybean cultivars, Agat and Diamant, grown in spoil variants decreased considerably as compared to the control. In plants cultivated in 100% spoils the decrease was higher in younger stages of growth, while in plants from 50% spoils it was higher by the end of vegetation cycle. The chlorophylls were more affected than the carotenoid pigments.

2. The soybean plants, Agat and Diamant cvs., cultivated in 100% spoils accumulated a higher amount of proteins as compared to the control, possibly because of phytochelatin synthesis, as a defence response of plants against the stress caused by heavy metals from spoils. The high content of proteins in soybean leaves before harvesting could indicate a low translocation to seeds.

REFERENCES

1. Ali, G., Srivastava, P. S., Iqbal, M., *Morphogenic and biochemical responses of Bacopa monniera cultures to zinc toxicity*, "Plant Sci.", **143**, 1999, 187-193.
2. Arnón, D. I., *Copper enzymes in chloroplasts. Polyphenoloxidase in Beta vulgaris*, "Plant Physiol.", **24**, 1949, 1-15.
3. Barón, M., Arellano, J. B., López Gorgé, J., *Copper and photosystem II: A controversial relationship*, "Physiol. Plant.", **94**, 1995, 174-180.
4. Bazyński, T., *Interference of Cd²⁺ in functioning of the photosynthetic apparatus of higher plants*, "Acta Soc. Bot. Pol.", **55** (2), 1986, 291-304.
5. Chen, S. L., Kao, C. H., *Prior temperature exposure affects subsequent Cd-induced ethylene production in rice leaves*, "Plant Sci.", **104**, 1995, 135-138.
6. Costa, G., Morel, J.-L., *Water relations, gas exchange and amino acid content in Cd-treated lettuce*, "Plant Physiol. Biochem.", **32**, 1994, 561-570.
7. Droppa, M., Horváth, G., *The role of copper in photosynthesis*, "Crit. Rev. Plant Sci.", **9** (2), 1990, 111-123.

8. Ernst, W. H. O., Nelissen, H. J. M., ten Bookum, W. M., *Combination toxicology of metal-enriched soils: physiological responses of a Zn- and Cd-resistant ecotype of Silene vulgaris on polymetallic soils*, "Environ. Exp. Bot.", **43**, 2000, 55-71.
9. Fontes, R. L. F., Cox, F. R., *Zinc-binding peptides as a function of Zn and S in soybeans*, "Plant Soil", **155/156**, 1993, 435-436.
10. Greger, M., *Cadmium Effects on Carbohydrate Metabolism in Sugar Beet (Beta vulgaris)*, Ph.D. Thesis, Univ. Stockholm, 1989.
11. Krupa, Z., Öquist, G., Huner, N. P. A., *The effects of cadmium on photosynthesis of Phaseolus vulgaris - a fluorescence analysis*, "Physiol. Plant.", **88**, 1993, 626-630.
12. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A.L., Randall, R. J., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*, "J. Biol. Chem.", **193**, 1951, 265-275.
13. MacFarlane, G. R., Burchett, M. D., *Photosynthetic pigments and peroxidase activity as indicators of heavy metal stress in the grey mangrove, Avicennia marina (Forsk.) Vierh.*, "Marine Pollut. Bull.", **42** (3), 2001, 233-240.
14. Maksymiec, W., Russa, R., Urbanik-Sypniewska, T, Baszynski, T., *Effect of excess Cu on the photosynthetic apparatus of runner bean leaves treated at two different growth stages*, "Physiol. Plant.", **91**, 1994, 715-721.
15. Marschner, H., *Mineral Nutrition of Higher Plants*, 2nd ed., pp. 313-404, Acad. Press, London, 1995.
16. Mehta, S. K., Gaur, J. P., *Heavy-metal-induced proline accumulation and its role in ameliorating metal toxicity in Chlorella vulgaris*, "New Phytol.", **143**, 1999, 253-259.
17. Muntean, L. S., Borcean, I., Axinte, M., Roman, Gh.V., *Fitotehnie*, pp. 249-266, Ed. Did. și Pedag., București, 1995.
18. Onac, S., Trifu, M., *Accumulation of some heavy metals from mine spoils by soybean plants*, "Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Biol.", **47** (1), 2002, 61-70.
19. Sanità di Toppo, L., Gabrielli, R., *Response to cadmium in higher plants*, "Environ. Exp. Bot.", **41**, 1999, 105-130.
20. Schat, H., Sharma, S. S., Voijis, R., *Heavy metal-induced accumulation of free proline in a metal-tolerant and a nontolerant ecotype of Silene vulgaris*, "Physiol. Plant.", **101**, 1997, 477-482.
21. Showalter, A. M., *Structure and function of plant cell wall proteins*, "Plant Cell", **5**, 1993, 9-23.
22. Shuman, L. M., *Mineral nutrition*, in Wilkinson, R. E. (Ed.), *Plant-Environment Interactions*, pp. 149-182, Marcel Dekker, New York, 1994.
23. Siedlecka, A., Krupa, Z., *Interaction between cadmium and iron and its effects on photosynthetic capacity of primary leaves of Phaseolus vulgaris*, "Plant Physiol.", **34**, 1996, 833-841.
24. Skórzynska-Polit, E., Bednara, J., Baszynski, T., *Some aspects of runner bean plant response to cadmium at different stages of the primary leaf growth*, "Acta Soc. Bot. Pol.", **64** (2), 1995, 165-170.
25. Steffens, J. C., *The heavy metal-binding peptides of plants*, "Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.", **41**, 1990, 553-575.
26. Verkleij, J. A. C., Schat, H., *Mechanisms of metal tolerance in higher plants*, in Shaw, A. J. (Ed.), *Heavy Metal Tolerance in Plants: Evolutionary Aspects*, pp. 179-193, CRC Press, Boca Raton, 1990.

HEPATOTOXICITATEA VENINULUI DE ALBINE. STUDIU HISTOLOGIC ȘI ULTRASTRUCTURAL

ADRIAN FLOREA*, CONSTANTIN CRĂCIUN**, CONSTANTIN PUICĂ***,
PANTE GHERGHEL** și MARIUS C. OPREA*¹

SUMMARY. – Hepatotoxicity of the Honey Bee Venom. Histological and Ultrastructural Study. The honey bee (*Apis mellifera*) venom, a very potent anti-inflammatory and analgesic drug, has been used for a long time to cure certain arthritic affections and, in addition, nowadays its main ingredients are further tested as possible drugs for some other diseases. In order to investigate the possible hepatotoxicity of the bee venom, aqueous solutions made from pure, dry venom (collected by ourselves) were used for performing the treatments. Our results, including those from previous studies, show that rat envenomation with bee venom, under different experimental conditions, is followed, in a dose-dependent manner, by structural and ultrastructural changes in liver. While the low, 30 day-administered doses of bee venom, caused a lot of important – possibly reversible – changes in liver, including the activation of the mechanisms involved in the organism defense and the cellular detoxification, the higher (lethal) doses determined more severe – irreversible alterations. All those alterations produced in the liver of animals tested for the higher doses of the bee venom (hepatocellular necrosis, disseminated intravascular coagulation etc.), together with structural modifications and functional failure of other different tissues and organs, led to the death of some of the animals in a short time.

Veninul sintetizat de albine (*Apis mellifera*) este un amestec complex de cel puțin 18 substanțe organice și anorganice: peptide, proteine, aminoacizi, glucide, lipide, acizi [2, 5, 7, 17, 21, 22, 41, 43], majoritatea acestora având acțiune biochimică sau farmacologică [9, 21, 22, 35, 44]. Deși omul modern ajunge tot mai rar în contact cu acest produs natural, nu trebuie uitat faptul că veninul de albine este cunoscut și utilizat, în stare pură sau sub forma diverselor preparate, încă din antichitate, în ameliorarea unei game largi de afecțiuni, în special articulare [27, 29, 36], dar nu numai [4, 10]. Unul din primele efecte consemnate ale veninului de albine este capacitatea sa de permeabilizare a membranelor celulare și implicit

*Universitatea de Medicină și Farmacie “Iuliu Hațieganu”, Facultatea de Medicină, Catedra de Biologie Celulară și Moleculară, 3400 Cluj-Napoca, România. E-mail: aflorea@personal.ro

**Universitatea “Babeș-Bolyai”, Facultatea de Biologie-Geologie, Catedra de Fiziologie Animală, 3400 Cluj-Napoca, România

***Institutul de Cercetări Biologice, 3400 Cluj-Napoca, România

¹Universitatea de Medicină și Farmacie “Iuliu Hațieganu”, Facultatea de Medicină, student an V, 3400 Cluj-Napoca, România

producerea hemolizei [1, 3, 6, 15, 16], dar numeroasele investigații efectuate asupra acțiunii sale [4, 5, 14, 18, 22, 51] au condus cercetătorii spre experimentarea recentă, cu succes, a componentelor veninului de albine ca antibiotice [11, 23, 39], agenți antitumorali [25, 28, 35, 45] etc., existând deja de mult timp pe piață un număr mare de medicamente pe bază de venin de albine [8].

Principala proprietate pentru care veninul de albine este utilizat în terapie o reprezintă capacitatea sa de stimulare a sistemului nervos [34], endocrin și imunitar, manifestându-se ca un puternic antiinflamator și totodată analgezic [29, 45]; produce dilatarea vaselor de sânge și implicit stimularea metabolismului celular și eliminarea accelerată a produșilor nocivi. Important este și faptul că veninul de albine nu determină apariția de efecte secundare, bineînțeles cu excepția cunoscută a persoanelor hipersensibile la substanțele din compoziția sa [19, 20, 30, 33, 46, 52].

Rezultatele pozitive la tratamentele cu venin de albine apar în timp, ca urmare a administrării repetate a unor doze mici de venin, atent calculate și a unui tratament de o mai lungă durată. Există însă și situații în care veninul de albine nu ajunge în organismul uman sau animal în doze calculate. Accidental, în organism ajung uneori cantități mari sau foarte mari din acest produs biologic, iar impactul este semnificativ [4, 18]. În aceste situații, pe lângă durerea produsă [21, 22, 31, 40, 53], veninul manifestă și un pronunțat efect toxic [9, 21, 22, 32, 40, 50].

Scopul studiului realizat de noi a fost de a evidenția eventuale modificări structurale și ultrastructurale produse la nivelul ficatului, organ bine vascularizat, susceptibil la acțiunea veninului și, în același timp, responsabil pentru detoxifierea organismului, în urma administrării experimentale, repetate, de venin de albine, în doze relativ mici, pe o durată de 30 zile, respectiv modificările produse de doze foarte mari. Continuând alte cercetări efectuate de noi anterior [16], am urmărit de asemenea să estimăm gradul de toxicitate a acestui compus în corelație cu doza primită.

Materiale și metode. *Animale.* Experimentele s-au realizat în mai multe etape pe loturi de șobolani *albi Wistar* (în total 36 animale), crescuți în biobaza U.M.F. “Iuliu Hațieganu”, Cluj-Napoca, respectiv în biobaza Facultății de Biologie, U.B.B., Cluj-Napoca, fără restricții în ce privește hrana sau apa.

Veninul de albine. Am utilizat venin de albine pur cristalizat, recoltat de noi prin metoda stimulării abinelor cu impulsuri electrice [38]. În vederea injectării veninul a fost resuspendat într-o soluție izotonă (150 mM NaCl, 5,5 mM glucoză, 5 mM HEPES, la pH 7,4) și păstrat la frigider, ferit de acțiunea luminii. În cazul tratamentului subcronic soluția injectabilă s-a preparat în câte 3 etape, de fiecare dată doar pentru câte 10 zile, pentru a preveni eventuala alterare a veninului.

Tratament. Animalelor li s-a injectat dorso-lateral posterior, subcutan veninul de albine în diluții diferite. Două loturi de șobolani – S1 și S2 (6, respectiv 12 animale), au fost tratate subcronic, timp de 30 de zile cu o doză zilnică, echivalentă unei înțepături de albină, comparabilă cu doza terapeutică pentru om (400 μg/kg corp/zi).

La sfârșitul perioadei de tratament s-au recoltat organele și s-a realizat prelucrarea lor corespunzător tehnicilor histologice (pentru primul lot) și pentru microscopia electronică de transmisie (animalele din celălalt lot). Animalele din alte două loturi – L1 și L2 (3, respectiv 3 animale), au fost injectate cu o doză mare de venin de albine (LD_{50} – letală pentru 50% din subiecți), echivalentă cu cantitatea eliberată la un număr de 100 înțepături de albine (62 mg/kg corp), probele de țesut recoltate fiind prelucrate atât pentru realizarea de preparate histologice cât și pentru microscopie electronică. Doza letală a fost stabilită în jurul valorii de 60 mg venin/kg corp pe baza datelor din literatură [21, 22]. Pentru evidențierea eventualelor efecte, în paralel s-au recoltat și prelucrat probele hepatice de la loturi martor (MS1, MS2, ML1, ML2 – câte 3 șobolani), corespunzător fiecărui lot de animale tratate.

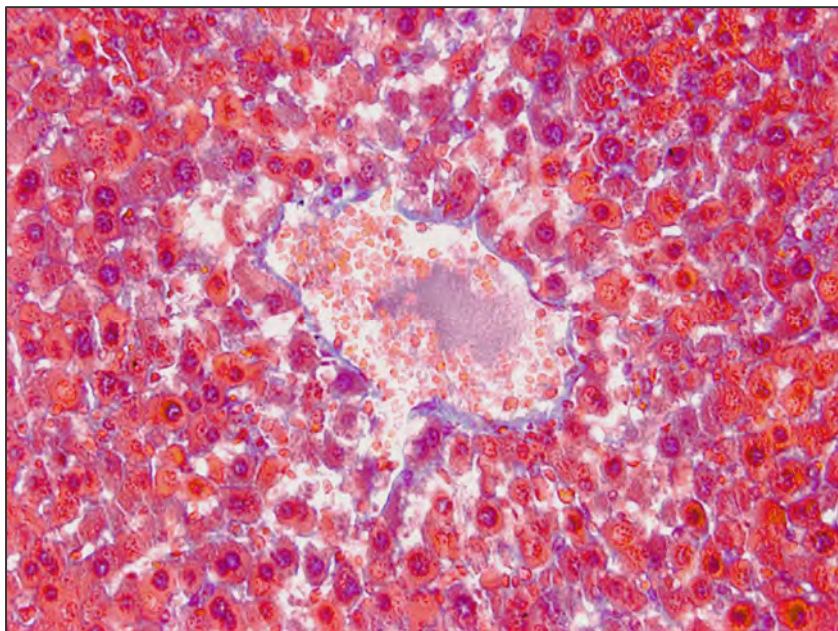
În timpul desfășurării tratamentului au fost observate modificări de comportament în cazul loturilor S1 și S2, la examinarea preparatelor observându-se că doza mai scăzută de venin de albine a provocat modificări, însă nu comparative cu cele observate la șobolani din loturile tratate cu doza mare. Pentru sacrificare, animalele au fost în prealabil anesteziate în atmosferă de cloroform. Menționăm că dintre animalele tratate cu doza mare, două au supraviețuit doar aproximativ o oră, la examinarea preparatelor, după recoltarea rapidă a probelor de țesut, observându-se modificări severe.

Histologie. Pentru realizarea preparatelor histologice, probele hepatice recoltate au fost fixate în fixator Bouin, deshidratate, incluse în parafină și apoi secționare la microtom. După etalarea pe lame și deparafinare, colorarea s-a făcut prin metoda Hurduc (pe bază de orange G, albastru de metil, xilidină și acid acetic glacial). Examinarea s-a realizat la un microscop Olympus BX51.

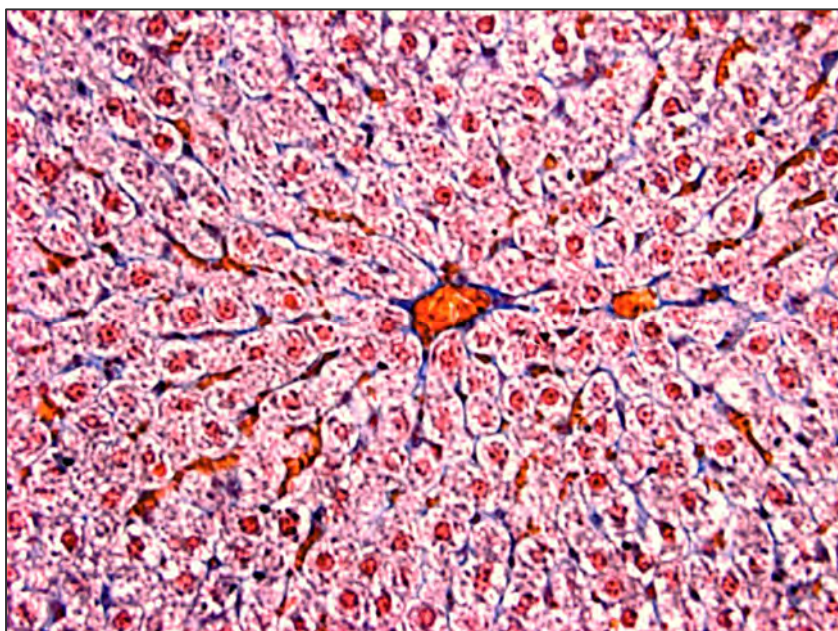
Microscopie electronică de transmisie. Probele hepatice recoltate în vederea studierii la microscopul electronic de transmisie au fost prefixate în soluție de glutaraldehidă 2,7%, postfixate în acid osmic 2%, spălate și deshidratate în acetonă, apoi incluse în Epon 812 și secționare la un ultramicrotom LKB-III. Secțiunile preluate pe grile electrolitice au fost contrastate cu acetat de uranil și apoi cu citrat de plumb [37]. Examinarea s-a realizat la un microscop electronic de transmisie Tesla BS500.

Rezultate și discuții. Pentru loturile martor (Fig.1.-MS1, Fig.3-6.-MS2, Fig.11.-ML1, Fig.13-16.-ML2), examinarea microscopică și electronomicroscopică a relevat o structură normală, caracteristică a parenchimului hepatic, respectiv aspecte specifice ale organizării subcelulare a hepatocitului [12, 24, 26, 42, 47, 49, 50].

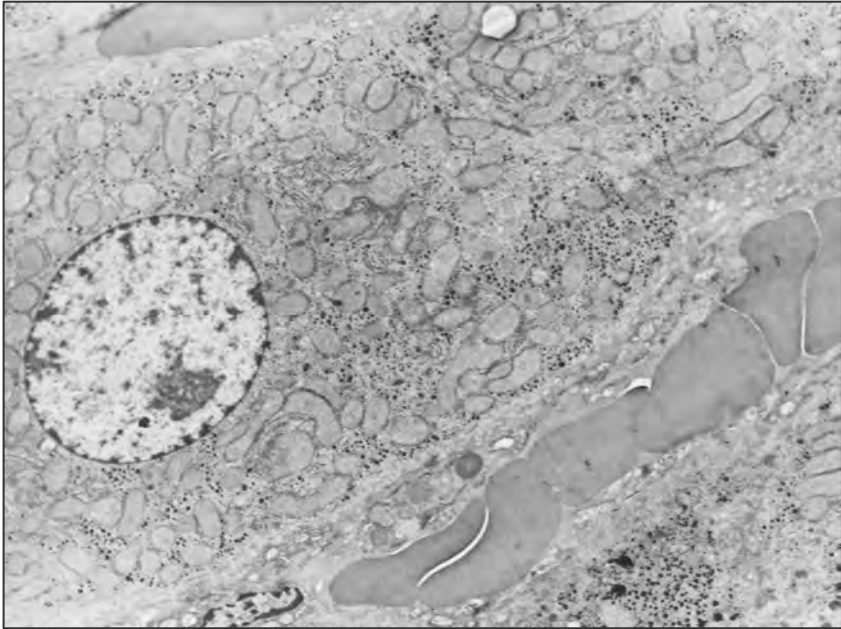
La examinarea histologică (Fig.2.-S1), sunt evidențiate modificări morfopatologice ale parenchimului hepatic, caracterizate prin distrofia generalizată, clară și granulară hepatocitară, precum și prin balonizarea unor hepatocite și a celulelor endoteliale Kupffer. Unele hepatocite sunt intens hipertrofiate, având un conținut cioplasmatic redus sau complet lipsite de conținut celular, nucleii picnotici fiind situați excentric. Se mai remarcă mici focare de necroză, hepatocitele fiind delimitate de infiltrate limfo-macrofagice.



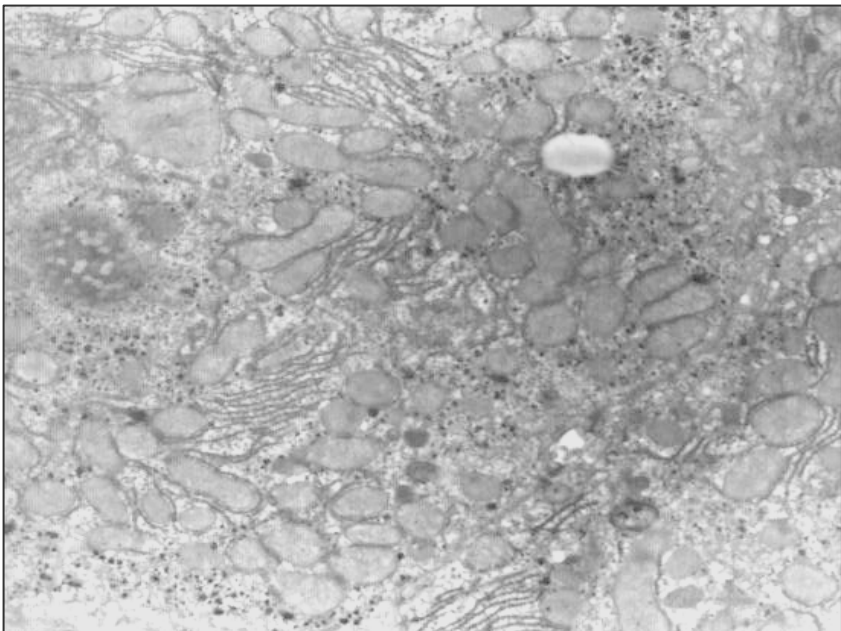
F i g. 1. Aspecte histologice ale ficatului, lotul MSI (ob.40×).



F i g. 2. Aspecte histologice ale ficatului, lotul S1 (ob.40×).



F i g. 3. Apecte ultrastructurale ale hepatocitului, lotul MS2 (6880 \times).



F i g. 4. Apecte ultrastructurale ale hepatocitului, lotul MS2 (8300 \times).

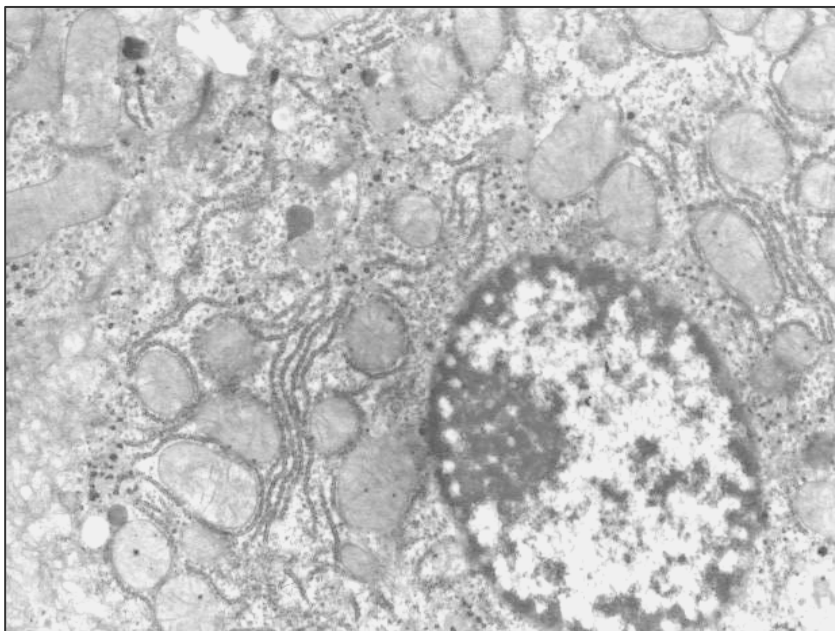


Fig. 5. Apecte ultrastructurale ale hepatocitului, lotul MS2 (11520×).

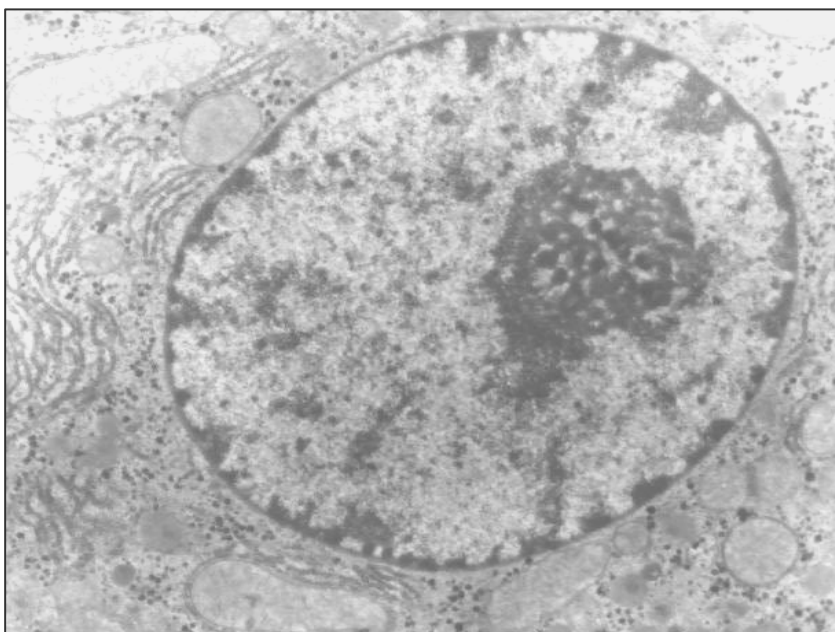
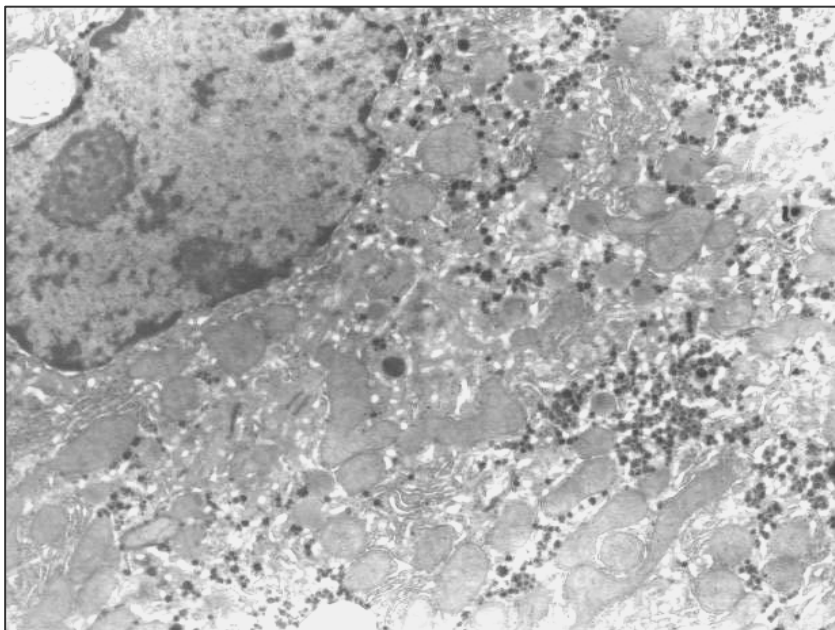


Fig. 6. Apecte ultrastructurale ale hepatocitului, lotul MS2 (13750×).

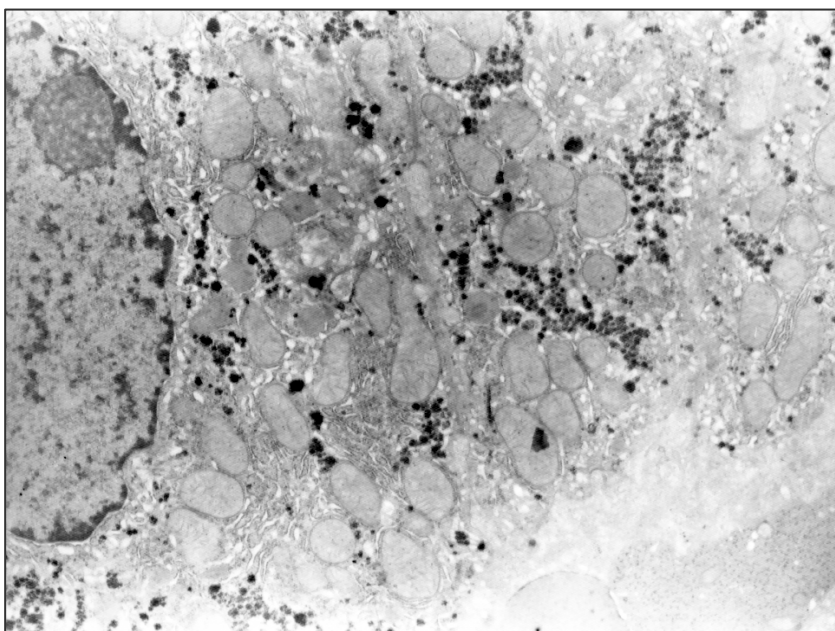
Pe imaginile electronomicroscopice (Fig.7-10.-S2) se poate de asemenea observa rarefierea citoplasmei; se constată modificarea formei nucleilor, care apar ovoidali, cu contur ușor neregulat, accentuarea polimorfizării mitocondriilor, dilatarea reticulului endoplasmic rugos, proliferarea și dilatarea reticulului endoplasmic neted, alterarea microvililor și creșterea numărului de trombocite în capilarele sinusoide. Mai este evidențiată o ușoară congestie vasculară, iar pe unele secțiuni s-a observat distrugerea endoteliului capilar și extravazarea hematiilor, mai ales în zonele cu hepatocite distruse. În urma administrării dozelor mici de venin de albine, apar leziuni în endoteliul capilar, conducând la discontinuități prin care veninul administrat în dozele ulterioare ajunge în contact direct cu hepatocitele, astfel explicându-se focarele de necroză zonale. Acest fapt determină infiltrarea macrofagelor, atrase în vederea îndepărtării detritusurilor celulare. Mobilizarea celulelor albe poate fi și o consecință a prezenței constante în organismul animalelor, pentru o perioadă mai mare de timp, a componentelor veninului de albine, unele fiind recunoscute pentru activitatea antigenică. Modificările intracelulare observate denotă și o afectare a activității metabolice a hepatocitelor, sugerată prin ușoara alterare a nucleului și a unor organite, proliferarea și activitatea crescută a reticulului endoplasmic neted nefiind capabile să facă față chiar la dozele mici de venin de albine dar repetate o perioadă mai lungă de timp. O posibilă cale de evitare a acestor probleme, în cazul administrării terapeutice a veninului de albine la subiecții umani, ar putea fi realizarea unui tratament subcronic, având însă intercalate perioade de pauză.

Pe secțiunile efectuate prin ficatul animalelor din loturile tratate cu doza letală se observă la microscopul optic (Fig.12.-L1) că tratamentul acut cu veninul de albine a indus modificări morfologice ale arhitecturii parenchimului hepatic, caracterizate, în general, printr-o ușoară hipertrofie hepatocitară, asociată cu aspecte de intumescență distrofică granulară hepatocitară discretă. Modificările cele mai evidente sunt reprezentate prin congestia semnificativă a capilarelor sinusoide, localizată îndeosebi în aria de vecinătate a venei centrolobulare. Vena portă este dilatată, iar în jurul capilarelor sinusoide apar focare hemoragice asociate cu infiltrate inflamatorii. Se mai observă mici focare de necroză celulară zonală, centrolobulară, dispuse la periferia lobulilor, unde parenchimul hepatic apare fin disecat.

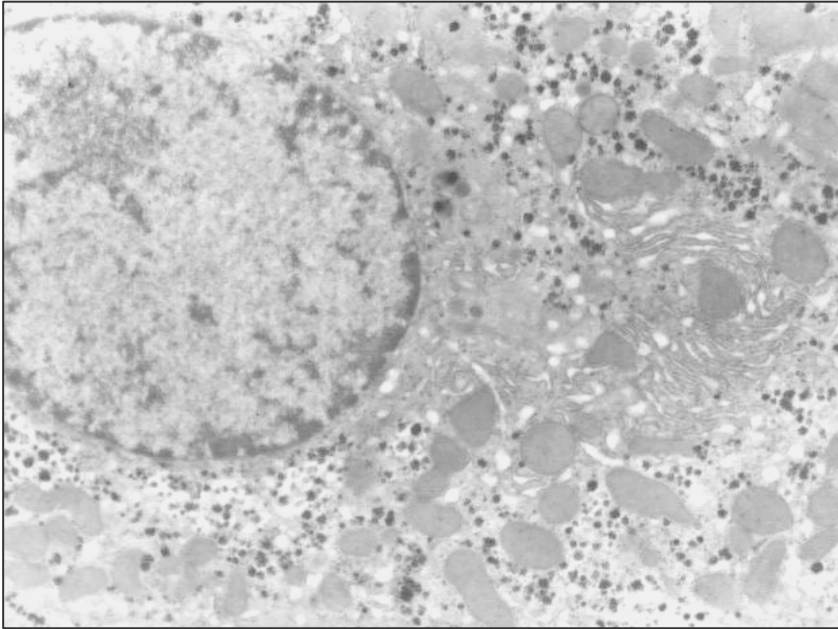
La examinarea electronomicroscopică a secțiunilor obținute din probele prelevate de la lotul L2 (Fig.17-20) se observă o dilatare accentuată a capilarelor și congestie vasculară; are loc mobilizarea în număr mare a leucocitelor – macrofagele sunt foarte încărcate cu lizosomi și detritusuri celulare – precum și a trombocitelor. Se observă, de asemenea, endoteliul capilarelor distrus în zonele de congestie și alterări zonale ale hepatocitelor – ruperea plasmalemei și eliberarea organitelor; un procent mare de microvili sunt distruși. În spațiul Disse endoteliul este distrus, practic lipsește acest spațiu. Hepatocitele au citoplasma rarefiată, cu puțin glicogen și lipide; se observă reducerea reticulului endoplasmic, dar totodată apariția de mici vezicule – ca urmare a fragmentării acestui organit, iar mitocondriile au matricea rarefiată și crestele dilatate și, pe alocuri, distruse. Aceste aspecte indică faptul că distrugerea



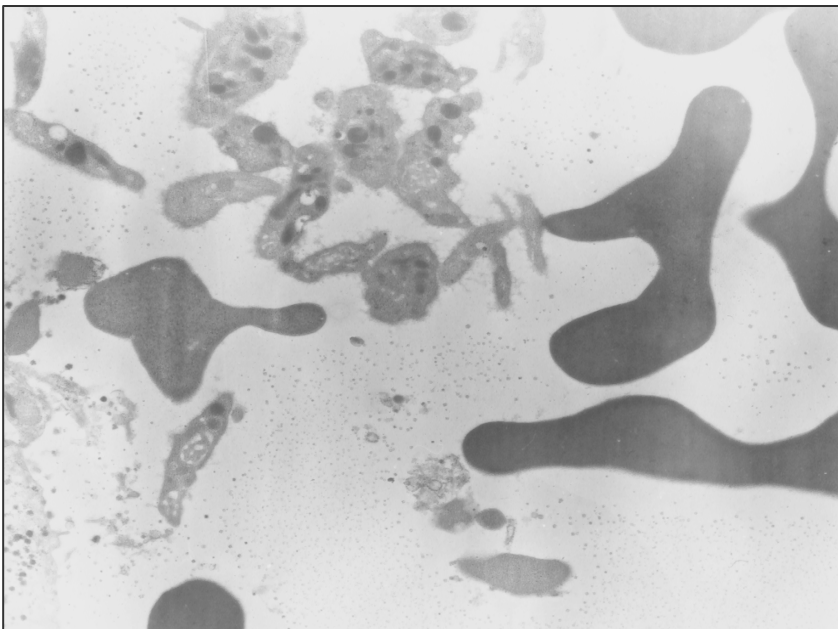
F i g. 7. Apecte ultrastructurale ale hepatocitului, lotul S2 (9800×).



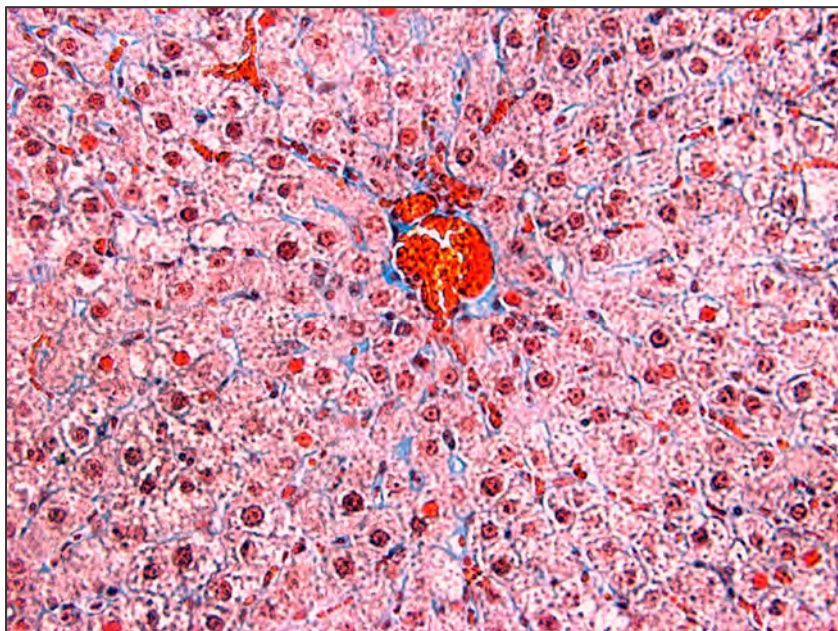
F i g. 8. Apecte ultrastructurale ale hepatocitului, lotul S2 (9800×).



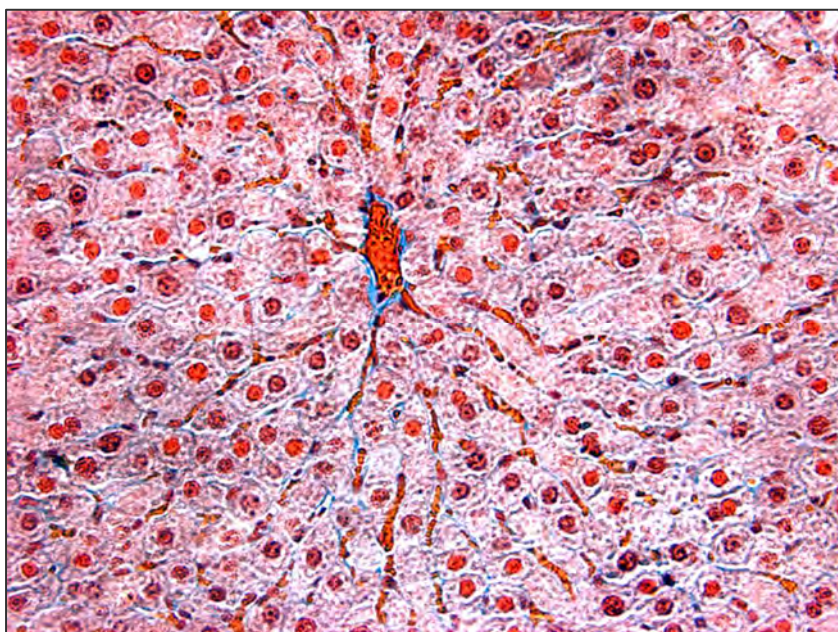
F i g. 9. Apecte ultrastructurale ale hepatocitului, lotul S2 (11520×).



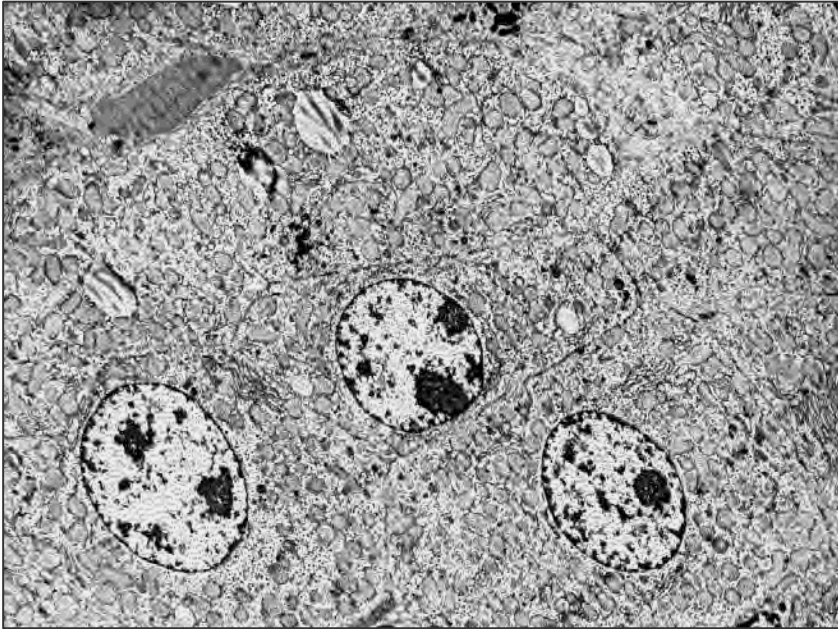
F i g. 10. Apecte ultrastructurale, vas sanguin, lotul S2 (3250×).



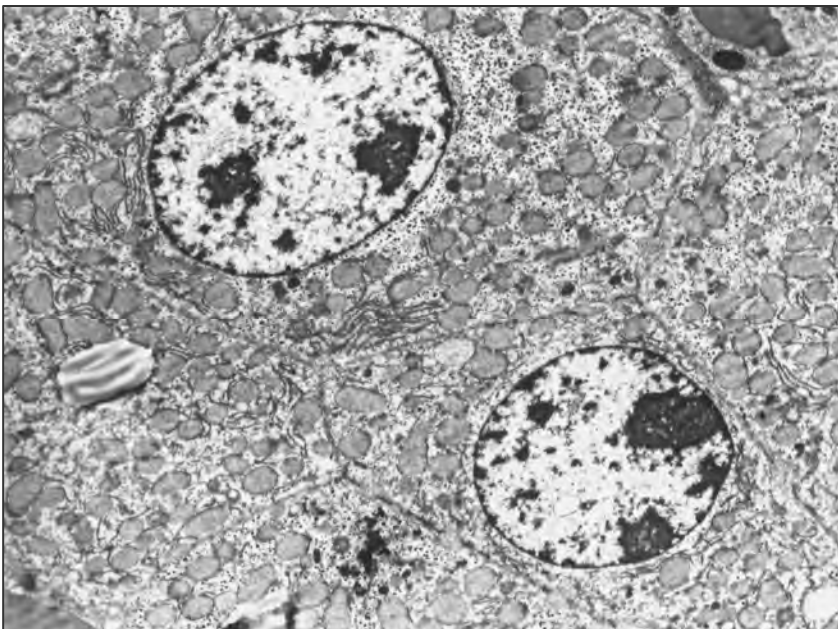
F i g. 11. Aspecte histologice ale ficatului, lotul M1 (ob.40×).



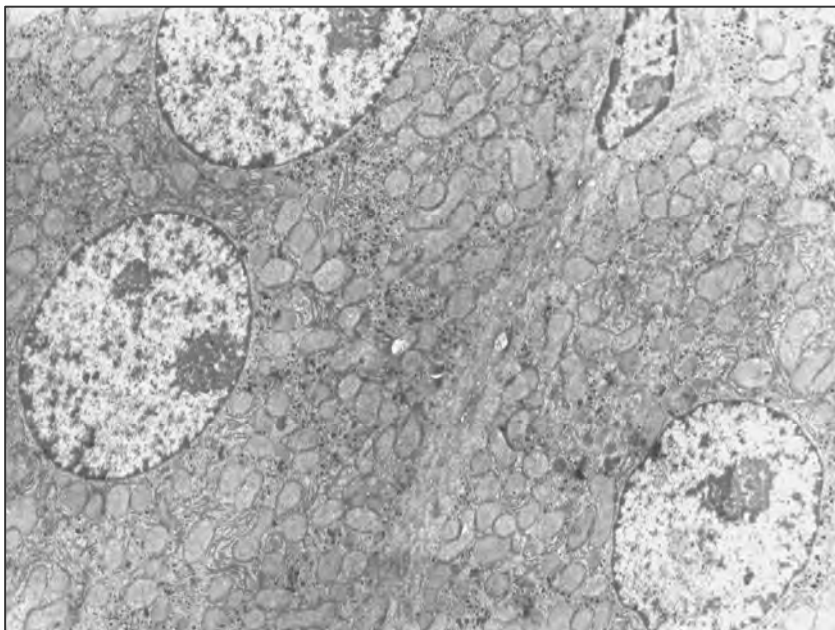
F i g. 12. Aspecte histologice ale ficatului, lotul L1 (ob.40×).



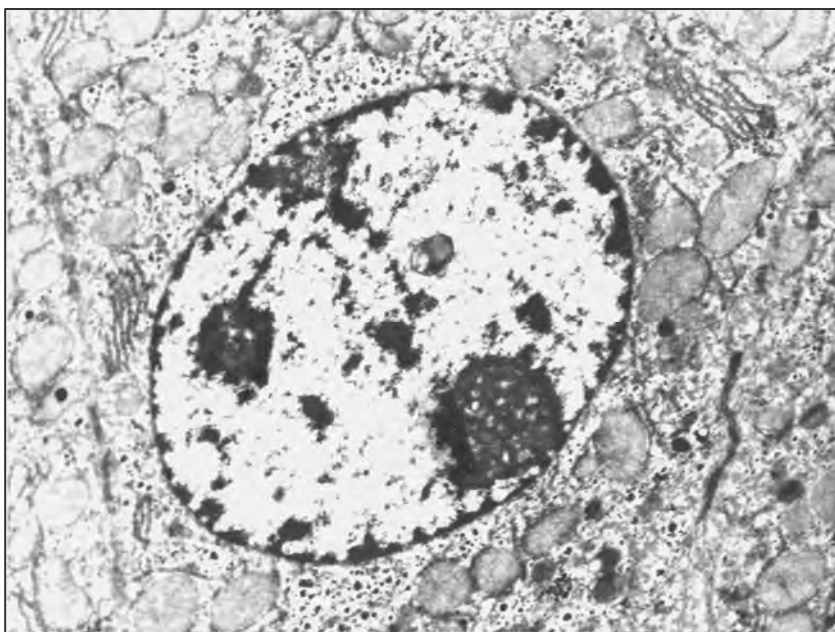
F i g. 13. *Apecte ultrastructurale ale hepatocitului, lotul ML2 (2420×).*



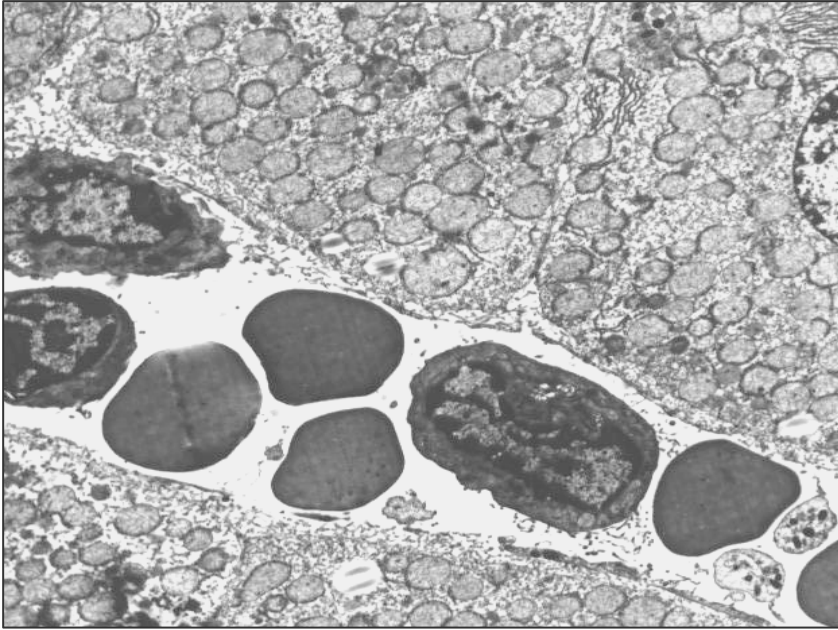
F i g. 14. *Apecte ultrastructurale ale hepatocitului, lotul ML2 (3250×).*



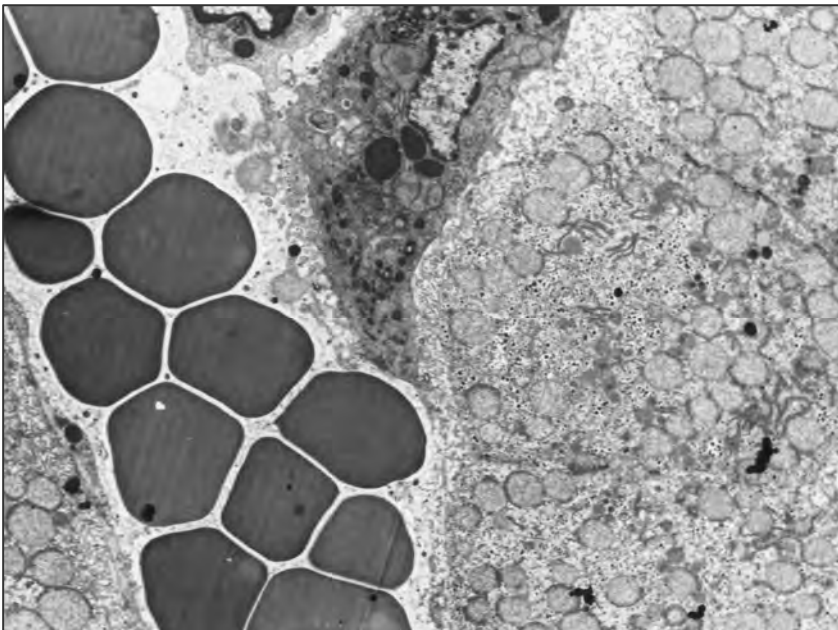
F i g. 15. *Apecte ultrastructurale ale hepatocitului, lotul ML2 (3250×).*



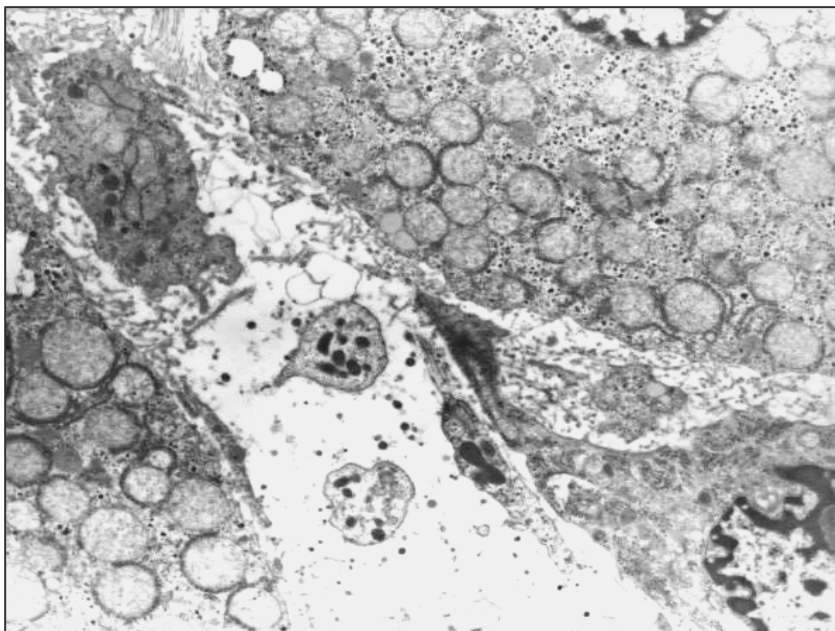
F i g. 16. *Apecte ultrastructurale ale hepatocitului, lotul ML2 (6880×).*



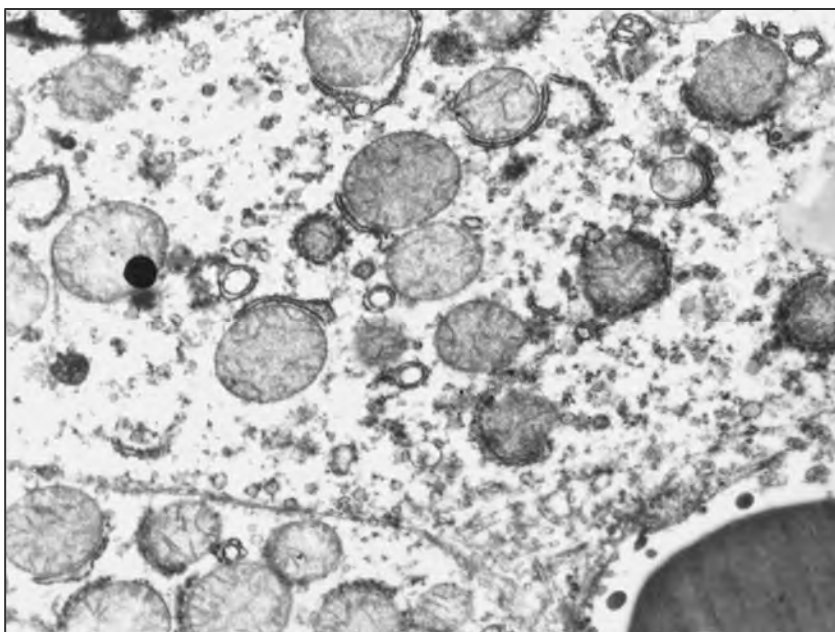
F i g. 17. Apecte ultrastructurale ale hepatocitului, lotul L2 (6150×).



F i g. 18. Apecte ultrastructurale ale hepatocitului, lotul L2 (6570×).



F i g. 19. Apecte ultrastructurale ale hepatocitului, lotul L2 (8300×).



F i g. 20. Apecte ultrastructurale ale hepatocitului, lotul L2 (9800×).

pe arii mai extinse a endoteliului capilar a permis veninului de albine să ajungă în concentrații mai mari la hepatocite, determinând liza acestora. În celulele rămase intacte, efectul veninului este evidențiat la nivelul organitelor cu activitate metabolică intensă, în special a mitocondriilor, iar cantitatea redusă de reticul endoplasmic neted poate fi explicată prin distrugerea sa sub efectul litic combinat al melitinei și fosfolipazei A₂ conținute de venin. Moartea animalelor de experiență, ca urmare a administrării dozelor mari de venin de albine – dar și a oamenilor expuși unui număr mare de înțepături de albine [18] – survine însă datorită efectului conjugat al componentelor veninului de albine asupra mai multor organe și sisteme. Astfel, au mai fost notate: hemoliza intravasculară, rbdomioliza, edemul pulmonar, disfuncții renale și neurologice; o cantitate mare de venin de albine ajunsă în organism poate provoca paralizia mușchilor din sistemul respirator [44].

Testele biochimice arată creșterea nivelului seric al creatin-kinazei, lactat-dehidrogenazei, aspartat-aminotransferazei, anemie și depleție plachetară. Hiperpotasemia și nivelurile ridicate de uree și creatinină confirmă disfuncțiile renale acute, de obicei provocate prin necroza tubulară [4]. Victima înțepăturilor își pierde viața în general datorită disfuncțiilor renale și complicațiilor cardiace [53].

Concluzii. Se poate afirma că veninul de albine, administrat în doze relativ mici și repetate, produce modificări importante la nivelul ficatului, dar este foarte probabil ca acestea să nu afecteze ireversibil ficatul, organ recunoscut pentru capacitatea sa de regenerare. Astfel, în urma tratamentului apare o creștere semnificativă a permeabilității membranelor celulare și au fost, de asemenea, stimulate reacțiile de detoxifiere și răspunsul imun. Rezistența acestui organ la acțiunea veninului de albine *in vivo* și *in vitro*, precum și acțiunea hepatoprotectoare a unor substanțe, constituie obiectul unui alt studiu aflat în derulare.

Modificările drastice în structura și funcțiile ficatului se instalează doar odată cu creșterea considerabilă a dozei. În doze mari, veninul de albine distruge membranele celulare, iar capacitatea de detoxifiere este depășită, reacțiile determinate de componentele veninului ducând rapid la moartea animalului. Rezultatele experimentelor noastre sunt în concordanță cu datele din literatura de specialitate referitoare la răspunsul ficatului la diferiți agenți chimici [12, 13, 47, 48], respectiv la veninul de albine [4, 16, 18] și indică o corelare între doza de venin administrată și efectele determinate. De asemenea, există o corelare strânsă cu modificările observate de noi la nivelul altor țesuturi și organe (date încă nepublicate).

BIBLIOGRAFIE

1. Alder, G. M., Arnold, W. M., Bashford, C. L., Drake, A. F., Pasternak, C. A., Zimmermann, U., *Divalent cation-sensitive pores formed by natural and synthetic melittin and by Triton X-100*, "Biochim. Biophys. Acta", **1061**, 1991, 111-120.

2. Artemov, N. M., *Veninul de albine ca produs al apiculturii*, în *Al XX-lea Congres al Apimondiei*, p. 467, Apimondia, București, 1965.
3. Artemov, N. M., *Efectul veninului de albine asupra permeabilității capilarelor și asupra cantității albuminelor din sânge*, în *Al XXII-lea Congres al Apimondiei*, p.361-365, Apimondia, București, 1969.
4. Azevedo-Marques, M. M., Cupo, P., Hering, S. E., Costa, R., Ferreira, D. B., *Clinical-laboratory and therapeutic aspects of envenomation caused by africanized bees*, "J. Ven. Anim. Tox.", **5** (2), 2001, 154-171.
5. Banks, B. E. C., Shipolini, R. A., *Chemistry and pharmacology of honey-bee venom*, în Piek, T. (Ed.), *Venoms of the Hymenoptera: Biochemical, Pharmacological and Behavioural Aspects*, p.329-416, Acad. Press, Orlando, 1986.
6. Blondelle, S. E., Houghten, R. A., *Probing the relationships between the structure and hemolytic activity of melittin with a complete set of leucine substitution analogs*, "Peptide Res.", **4**, 1991, 12-18.
7. Bucherl, W., Buckley, E., *Venomous animals and their venoms*, p.2-38, 63-85, Acad. Press, New York, 1971.
8. Buia, L., *Medicamente pe bază de venin de albine*, în *Apiterapia azi*, p.76-77, Ed. Apimondia, București, 1989.
9. Chauvin, R., *Action du venin sur l'homme*, în Chauvin, R. (Ed.), *Traité de biologie de l'abeille*, p.160-161, Masson, Paris 1968.
10. Cherbuliez, T., *Bee venom therapy and safety*, "Bee Informed", **4** (3), 1997, 10-11.
11. Cleveland, J., Montville, T. J., Nes, I. F., Chikindas, M. L., *Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation*, *Review article*, "Int. J. Food Microbiol.", **71**, 2001, 1-20.
12. Crăciun, C., *Electron microscopy investigations on rat hepatocytes, in acute allyl alcohol intoxication and after Trofopar treatment*, în *Pathological Models in Toxicological Studies*, p.252-271, M.Ch.I., Industrial Head-Office for Medicinal Drugs and Cosmetics, Bucharest, 1985.
13. Crăciun, C., Crăciun, R. A., Tarba, C., *Unele aspecte privind intoxicația alcoolică a ficatului și efectul reparator al Trofoparului*, "Rev. Med. Orădeană", **2**, 1995, 91-96.
14. Derevici, A., *Constatări privind efectele provocate de către veninul de albine în sângele iepurilor*, "Apicult. România", (3), 1991, 27.
15. Diaz-Achirica, P., *Permeabilization of the mitochondrial inner membrane by short cecropin-A-melittin hybrid peptides*, "Eur. J. Biochem.", **224**, 1994, 257-263.
16. Florea, A., Crăciun, C., Toader-Radu, M., Crăciun, V., Gherghel, P., *Ultrastructural changes induced by the bee venom in the hepatocyte and the isolated liver rat mitochondria*, în Crăciun, C., Ardelean, A. (Eds.), *Current Problems and Techniques in Cellular and Molecular Biology*, p.217-222, Mirton, Timișoara, 1997.
17. Forster, K. A., *Chimie, pharmacologie et effet thérapeutique du venom d'abeille*, în *Al XXII-lea Congres al Apimondiei*, p.403, Apimondia, București, 1969.
18. França, F. O. S., Benvenuti, L. A., Fan, H. W., Dos Santos, D. R., Hain, S. H., Picchi-Martins, F. R., Cardoso, J. L. C., Kamiguti, A. S., Theakston, R. D. G., Warrell, D. A., *Severe and fatal mass attacks by "killer" bees (Africanized honey bees – Apis mellifera scutellata) in Brazil: clinicopathological studies with measurement of serum venom concentration*, "Quart. J. Med.", **87**, 1994, 269-282.
19. Freizer, A., *Allergy to the bee stings*, "Am. Bee J.", **11**, 1964, 406-407.

20. Gupta, S., O'Donnel, A., *Management of bee sting anaphylaxis*, "Med. J.", **149**, 1988, 602-604.
21. Habermann, E., *Chimie, pharmacologie et toxicologie du venin*, în Chauvin, R. (Ed.), *Traité de biologie de l'abeille*, p.363-387, Masson, Paris, 1968.
22. Habermann, E., *Bee and wasp venoms. The biochemistry and pharmacology of their peptides and enzymes are reviewed*, "Science", **177** (4046), 1972, 314-322.
23. Hancock, R. E. W., Chappelle, D. S., *Peptide antibiotics (Minireview)*, "Antimicrob. Agents Chemother.", **43** (6), 1999, 1317-1323.
24. Häusinger, D., Scliess, F., *Cell volume and hepatocellular function*, "J. Hepatol.", **22**, 1995, 94-100.
25. Johnstone, S. A., Gelmon, K., Mayer, L. D., Hancock, R. E., Bally, M. B., *In vitro characterization of the anticancer activity of membrane-active cationic peptides. I. Peptide-mediated cytotoxicity and peptide-enhanced cytotoxic activity of doxorubicin against wild-type and p-glycoprotein over-expressing tumor cell lines*, "Anti-Cancer Drug Design", **15**, 2000, 151-160.
26. Kanamura, S., Kanai, K., Watanabe, J., *Fine structure and function of hepatocytes during development*, "J. Electron Microsc. Techn.", **14**, 1990, 92-105.
27. Kang, S. S., Pak, S. C., Choi, S. H., *The effect of whole bee venom on arthritis*, "Am. J. Chinese Med.", **30** (1), 2002, 73-84.
28. Killion, J. J., Dunn, J. D., *Differential cytolysis of murine spleen, bone-marrow, and leukemia cells by melittin reveals differences in membrane topography*, "Biochem. Biophys. Res. Commun.", **139** (1), 1986, 222-227.
29. Kwon, Y. B., Lee, H. J., Han, H. J., Mar, W. C., Kang, S. K., Yoon, O. B., Beitz, A. J., Lee, J. H., *The water-soluble fraction of bee venom produces antinociceptive and anti-inflammatory effects on rheumatoid arthritis in rats*, "Life Sci.", **71**, 2002, 191-204.
30. Liebers, V., Sander, I., van Kampen, V., Raulf-Heimsoth, M., Rozynek, P., Baur, X., *Overview on denominated allergens*, "Clin. Exp. Allergy", **26**, 1996, 494-516.
31. Mackler, B.F., Kreil, G., *Honey bee venom melittin: correlation of nonspecific inflammatory activities with amino acid sequences*, "Inflammation", **2**, 1977, 55-65.
32. Marsc, R., *The toxicity of bee venom*, "Glean. Bee Cult.", **12**, 1964, 733-740.
33. Mureșan, D., *Studiu asupra modificărilor imunologice din alerggia la înțepăturile de albine*, "Apicult. România", (5), 1982, 25-26.
34. Oh, M. M., Power, J. M., Thompson, L. T., Disterhoft, J. F., *Apamin increases excitability of CA1 hippocampal pyramidal neurons*, "Neurosci. Res. Commun.", **27** (2), 2000, 135-141.
35. O'Neill, G., *A sting in the tail for cancerous cells*, "Ecos", **n90**, 1996, 5.
36. Partheniu, A., *Veninul de albine în tratamentul reumatismului, astmului bronșic, urticării și altor boli*, "Apicult. România", (3), 1957, 26.
37. Ploaie, P. G., Petre, Z., *Introducere în microscopia electronică cu aplicații în biologia celulară și moleculară*. Ed. Acad. Rom., București, 1979.
38. Popescu, N., *Unele măsuri necesare pentru menținerea purității și calității veninului de albine*, "Apicult. România", (1), 1990, 13-14.
39. Porter, E. A., Weisblum, B., Gellman, S. H., *Mimicry of host-defense peptides by unnatural oligomers: antimicrobial β -peptides*, "J. Am. Chem. Soc.", **124**, 2002, 7324-7330.

40. Schmidt, J. O., *Toxicology of venoms from the honeybee genus Apis*, "Toxicon", **33**, 1995, 917-927.
41. Schmidt, J. O., *Bee products: Chemical composition and application*, în Mizrahi, A., Lensky, Y. (Eds.), *Bee Products*, p.15-26, Plenum Press, New York, 1996.
42. Schmucker, D. L., *Hepatocyte fine structure during maturation and senescence*, "J. Electron Microsc. Techn.", **14**, 1993, 106-115.
43. Shipolini, R. A., *Biochemistry of bee venom*, în Tu, A. T. (Ed.), *Handbook of Natural Toxins. Vol. 2, Insect Poisons, Allergens, and Other Invertebrate Venoms*, p.49-85, Dekker, New York, 1984.
44. Simics, M., *The effect of bee stings on the human body*, "Bee Informed", **1** (4), 1994, 6.
45. Somerfield, S. D., Stach, J. L., Mraz, C., Gervais, F., Skamene, E. T., *Bee venom melittin blocks neutrophil O_2^- production*, "Inflammation", **10** (2), 1986, 175-182.
46. Stoenescu, M., *Copilul alergic*, p.7-24, 131-134, Ed. Med., București, 1991.
47. Tarba, C., Crăciun, C., Roșioru, C., Petrescu, I., Gherghel, P., Crăciun, V., *Functional and ultrastructural effects of clofibrilic acid addition to isolated mitochondria and perfused liver of rat and guinea pig*, "Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Biol.", **46** (1), 2001, 61-76.
48. Tarba, C., Roșioru, C., Crăciun, C., Popescu, C., Crăciun, V., *Metabolic and ultrastructural effects recorded in isolated mitochondria and perfused liver following the subchronic treatment of rats and guinea pigs with clofibrilic acid*, "Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Biol.", **46** (1), 2001, 77-89.
49. Tanikawa, K., *Ultrastructural aspects of the liver and its disorders*, p.5-27, Igaku Sohjin, Tokyo, 1968.
50. Uchiyama, Y., *Rhythms in morphology and function of hepatocytes*, "J. Gastroenterol. Hepatol.", **5**, 1990, 321-333.
51. Urechia, C. I., Manta, N., *Acțiunea veninului de albine asupra echilibrului biochimic*, "Bull. Acad. Méd. Roum.", 1937, 323-327.
52. Vaillant, J., *Immunologie et allergie aux venoms d'hyménoptères*, "Santé l'Abeille", **131**, 1937, 27-31.
53. Vetter, R. S., Visscher, P. K., *Bites and stings of medically important venomous arthropods*, "Int. J. Dermatol.", **37**, 1998, 481-496.

ATENUAREA MODIFICĂRILOR STRUCTURALE ȘI METABOLICE INDUSE DE EXCESUL GLUCOCORTICOIDIC PRIN ADMINISTRAREA DE PROPRANOLOL

ERIKA KIS* și CONSTANTIN CRĂCIUN**

SUMMARY. – **Attenuation of the Glucocorticoid Excess-Induced Structural and Metabolic Disorders by Propranolol.** It has been established that topical glucocorticosteroids, widely used for dermatological treatments, have a high rate of transcutaneous penetration and once absorbed into systemic circulation they produce unwanted secondary systemic side effects. As resulted from our preliminary experiments, a short-term epicutaneous treatment with Fluocinolone-acetonid N in various age groups of young rats induces structural and ultrastructural modifications of hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. Alteration of HPA axis functions was accompanied by metabolic disorders, characteristic for steroid-diabetogenic state. Some of the structural modifications of HPA axis, according to our recent observations, are reducible by *in vivo* β -adrenoreceptor blockage with Propranolol.

Starting from the above findings, we investigated, in parallel with the HPA axis reactions, the modifications of some metabolic parameters in prepubertal and pubertal rats, after a short-term epicutaneous treatment with Fluocinolone-acetonid N ointment, applied alone or associated with Propranolol.

Funcțiile organismului sunt reglate prin două mari sisteme de control: sistemul nervos, prin intermediul căruia are loc o transmitere rapidă a mesajelor și sistemul endocrin, prin care mesajele ajung mai lent, dar manifestă un efect de durată. Între aceste sisteme de reglare fundamentale există corelații morfofuncționale, sistemul nervos controlează activitatea sistemului endocrin, care la rândul lui influențează dezvoltarea și activitatea sistemului nervos. Controlat de sistemul nervos central și la rândul său influențând activitatea nervoasă superioară, sistemul endocrin exercită multiple și complexe funcții care contribuie la menținerea homeostaziei mediului intern, necesară pentru buna funcționare a proceselor biochimice celulare.

* Universitatea "Babeș-Bolyai", Catedra de Zoologie, 3400 Cluj-Napoca, România.

E-mail: ekis@hasdeu.ubbcluj.ro

** Universitatea "Babeș-Bolyai", Catedra de Fiziologie Animală, 3400 Cluj-Napoca, România

Menținerea homeostaziei organismului animal și uman necesită o adaptare comportamentală, vegetativă și endocrină continuă pentru contracararea cât mai eficientă a efectelor negative ale factorilor externi și interni, care tind să modifice permanent echilibrul organismului. Răspunsul major al organismului față de acțiunea factorilor de stres este activarea axului hipotalamo-hipofizo-corticosuprarenalian (HHC), care constă în eliberarea rapidă de corticoliberină, respectiv adrenocorticotropină (ACTH), urmată imediat de creșterea concentrației plasmatică de glucocorticoizi. Alterarea morfofuncțională a axului HHC determină dereglarea echilibrului hormonal, datorită faptului că, prin intermediul hipotalamusului și al hipofizei, glucocorticoizii pot influența și activitatea altor glande endocrine periferice, nu numai a suprarenalei. Acest dezechilibru hormonal, la rândul lui, determină modificarea metabolismului intermediar, ceea ce duce la dereglări funcționale ale întregului organism.

Excesul de cortizol la om determină efecte catabolice (hipotrofia musculaturii proximale a membrelor, subțierea tegumentară, fragilitate vasculară, osteoporoză), gluconeogenetice și antiinsulinice (hiperglicemie, scăderea toleranței la glucoză sau diabet zaharat secundar) de inhibare asupra eliberării și acțiunii periferice a hormonului de creștere. Produce, de asemenea inhibarea eliberării de gonadotropi, psihoze maniaco-depresive și imunosupresie.

Dermocorticoizii sunt larg utilizați în tratamentele dermatologice datorită proprietăților lor antiinflamatoare și antiproliferative. Efectele topice benefice sunt bine cunoscute, dar efectele secundare locale și sistemice de risc, cauzate prin absorbția transcutană a acestora, sunt mai puțin elucidate, ceea ce limitează utilizarea lor și constituie un argument pentru continuarea cercetărilor.

Fluocinolon cremă și unguent, respectiv Fluocinolon-acetonid N cremă și unguent, sunt larg utilizate în țara noastră datorită acțiunilor antiinflamatoare, antipruritice și antialergice. Cu toate că normalizează procesul de keratinizare, există date experimentale care arată că utilizat un timp mai îndelungat, chiar și în cantități minime, produce efecte secundare locale. Chiar prospectele care însoțesc medicamentele contraindică utilizarea acestor produse la gravide sau, dacă totuși se utilizează, apare indicația să fie aplicate pe o suprafață de mică întindere, în cantitate nu prea mare și pe o durată limitată.

Din studiile noastre anterioare [8, 9], efectuate pe șobolani tineri de vârste diferite, rezultă că blocarea receptorilor β -adrenergici cu Propranolol atenuază acțiunile nocive ale excesului glucocorticoidic endogen asupra morfologiei axului HHC, realizat prin tratamentul cu dermocorticoizi.

Cu toate că acțiunea permisivă a glucocorticoizilor în efectele endocrino-metabolice diabetogene ale adrenalinei endogene este clarificată din mai multe puncte de vedere la șobolanul alb, se cunoaște foarte puțin în ceea ce privește implicațiile activării receptorilor β -adrenergici de către adrenalina circulantă în procesele endocrino-metabolice induse de excesul glucocorticoidic de origine endogenă sau exogenă.

Pornind de la aceste considerente și de la observațiile noastre recente [2-5, 7, 10, 11, 13, 14], conform cărora absorbția transcutană a unor glucocorticoizi superpotenți halogenați sau nehalogenați determină apariția unor efecte sistemice secundare

adverse, de risc, în lucrarea de față am investigat influența blocării receptorilor β -adrenergici cu Propranolol asupra mecanismului de acțiune endocrino-metabolică a unguentului Fluocinolon-acetonid N.

Material și metode. Experiențele au fost efectuate pe șobolani Wistar prepuberi (30 de zile) și puberi (60 de zile) care au fost tratați timp de 3 zile consecutive cu unguentul Fluocinolon-acetonid N pe fondul blocării receptorilor β -adrenergici. Doza zilnică de 50 mg unguent/100 g g.c. a fost aplicată prin ungerea pielii în zona inguinală pe o suprafață de 1,5 cm². Blocarea receptorilor β -adrenergici s-a efectuat cu o soluție farmaceutică de Propranolol, administrată subcutan în doză zilnică de 50 μ g/100 g g.c., concomitent cu tratamentul fluocinolonidic.

Animalele de experiență au fost repartizate în următoarele loturi:

lotul M₁ – animale prepubere netratate-martor;

lotul M₂ – animale pubere netratate-martor;

lotul FC₁ – animale prepubere tratate cu Fluocinolon-acetonid N;

lotul FC₂ – animale pubere tratate cu Fluocinolon-acetonid N;

lotul PR+FC₁ – animale prepubere tratate cu Fluocinolon-acetonid N pe fondul administrării de Propranolol;

lotul PR+FC₂ – animale pubere tratate cu Fluocinolon-acetonid N pe fondul administrării de Propranolol.

La 24 de ore după sistarea tratamentului de mai sus și în urma unei inaniții de 16-18 ore, animalele au fost sacrificate prin decapitare și exsanguinare.

Fragmentele de hipotalamus, adenohipofiză și corticosuprarenală prelevate au fost prelucrate în vederea efectuării studiilor histologice. Evidențierea neuronilor secretori din hipotalamus s-a efectuat cu metoda de colorare Kluver-Barerra [15], celulele adenohipofizare au fost identificate cu metoda de colorare H u r d u c și colab., redată în [15], corticosuprarenala a fost colorată cu hematoxină-eozină [15].

Cantitatea de glucoză sanguină a fost determinată enzimatic cu God-Perid-Glucose Kit. Colesterolul seric a fost dozat cu micrometoda fotocolorimetrică a lui Z l a t k i s și colab. [16], cantitatea acizilor grași liberi (AGL) din serul sanguin a fost determinată cu ajutorul metodei lui C h e r n i c k și N o v a k [1], trigliceridele totale și lipidele totale serice au fost dozate cu Kit-Boehringer. Fosfataza alcalină a fost determinată cu ajutorul metodei lui B e s s e y – L o w r y, redată în [6]. Fosfataza acidă s-a determinat prin metoda B e r g m e y e r, redată în [6]. Transaminazele au fost determinate colorimetric [6].

Rezultate și discuții. *Studiu structural al axului HHC.* Examinarea activității neurosecretorie a nucleului paraventricular (NPV) la lotul M₁ și M₂ a relevat un aspect normal al neuronilor atât în zona parvocelulară cât și în cea magnocelulară. Neuronii se află în diferite faze ale activității secretorii, granulele de neurosecreție fiind moderat răspândite în pericarionul neuronal, precum și de-a lungul prelungirilor neuronale (Fig. 1).

La lotul FC₁ și FC₂, atât neuronii parvocelulari cât și cei magnocelulari apar modificați. În primul rând, se observă o ușoară creștere a numărului neuronilor activi din zona parvocelulară. Aceștia prezintă o încărcare mai puternică a pericarionului cu granule de secreție (Fig. 2).

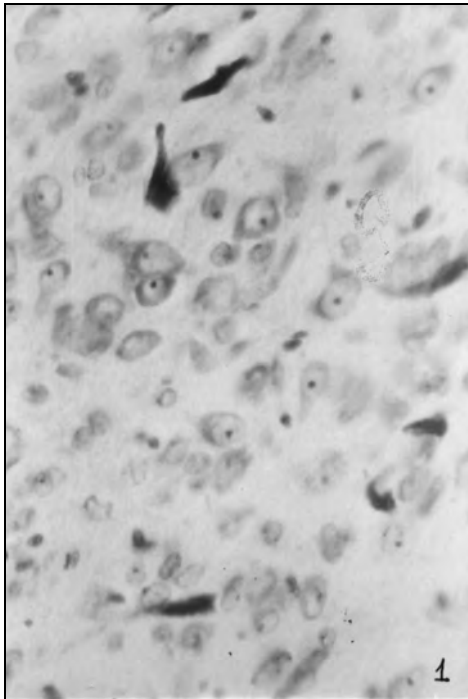


Fig. 1. Nucleul paraventricular la lotul martor (x 400).

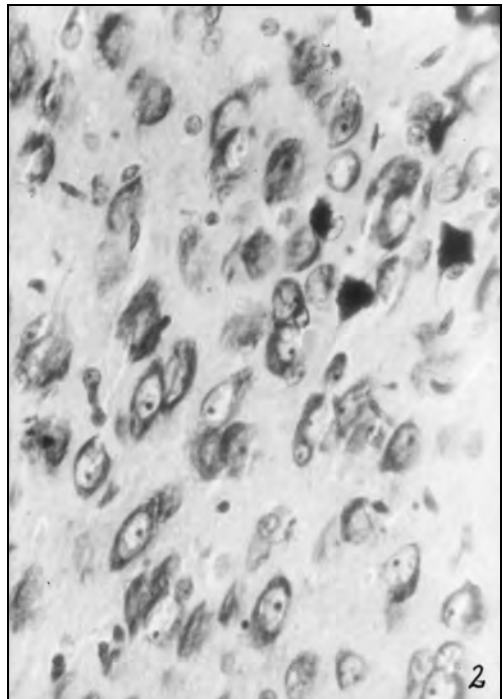


Fig. 2. Nucleul paraventricular la lotul tratat cu Fluocinolon-acetonid N (x 400).

La lotul PR+FC₁ și PR+FC₂, NPV prezintă un aspect apropiat lotului martor. Neuronii secretori se află în diferite faze ale activității secretorii. Numărul neuronilor activi este mai mare comparativ cu martorii, dar mai redus comparativ cu loturile tratate cu Fluocinolon-acetonid N (Fig. 3).

Adenohipofiza la lotul M₁ și M₂ (Fig. 4) prezintă aspectul citoarhitectonic normal caracteristic glandei, principalele tipuri celulare - respectiv celulele acidofile sunt colorate în diferite nuanțe de roșu-cărămiziu, celulele bazofile prezintă nuanțe de albastru sau albastru-violic, celulele gama sunt de culoare albastru-azur, iar celulele cromofobe sunt incolore. La animalele normale există un raport specific între celulele adenohipofizare, constant într-o anumită fază a dezvoltării ontogenetice sau în diferite faze ale activității diurne sau sezoniere.

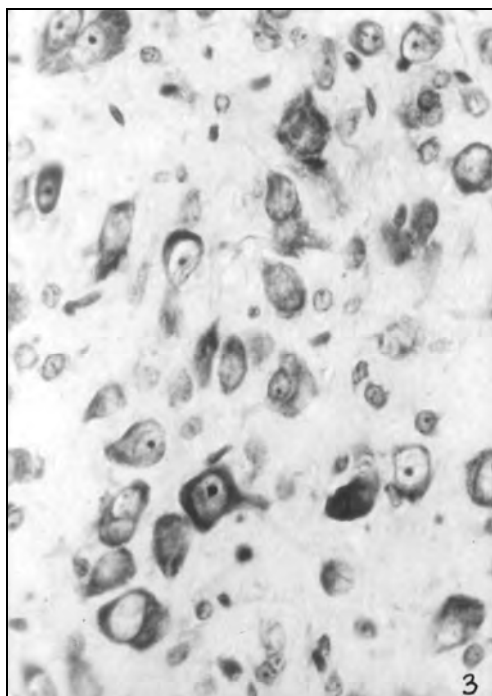


Fig. 3. Nucleul paraventricular la lotul tratat cu Fluocinolon-acetonid N pe fondul administrării de Propranolol (x 400).

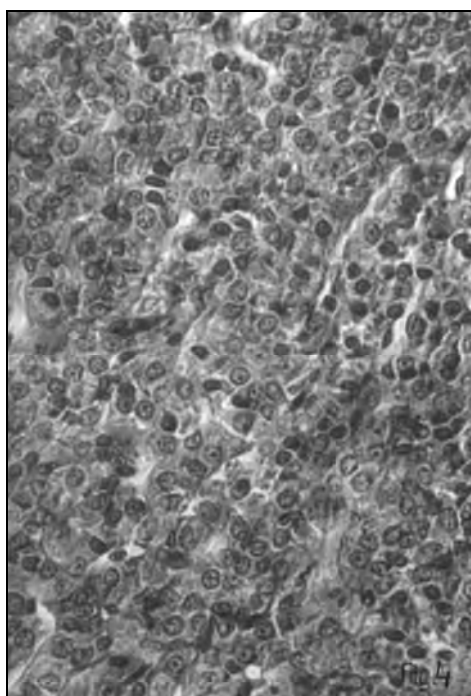


Fig. 4. Adenohipofiza la lotul martor (x 200).

Examenul histologic al adenohipofizei la loturile FC₁ și FC₂ relevă modificări structurale atât ale celulelor acidofile cât și ale celor bazofile, în comparație cu loturile de control. Apare un număr mare de celule bazofile balonizate, citoplasma lor având o structură spumoasă, puternic vacuolizată, caracteristică celulelor Crooke (Fig. 5). Celulele acidofile, mai ales celulele somatotrope prezintă o structură modificată, (roșu-cărămiziu), fiind ușor hipertrofiate.

Adenohipofiza la loturile PR+FC₁ și PR+FC₂ prezintă un aspect apropiat loturilor martor, dispar celulele Crooke (Fig. 6), ceea ce arată că agentul β-blocant atenuază efectul excesului glucocorticoidic provocat prin administrare de dermo-corticoizi. Cu toate acestea, se observă o ușoară bazofilie.

Corticosuprarenala la lotul M₁ și M₂ prezintă aspectul normal caracteristic glandei (Fig. 7).

La loturile FC₁ și FC₂, suprarenala prezintă o corticală mult redusă în comparație cu loturile martor. În zona glomerulară apar celule hiperplazice, iar zona fasciculată prezintă o structură compactă, mult mai accentuată comparativ cu loturile martor. Ea este mai îngustă în comparație cu martorul, spațiile intercelulare lipsesc. Spongicietele caracteristice acestei zone lipsesc (Fig. 8), ceea ce sugerează o inhibare completă a procesului de sinteză a glucocorticoizilor.

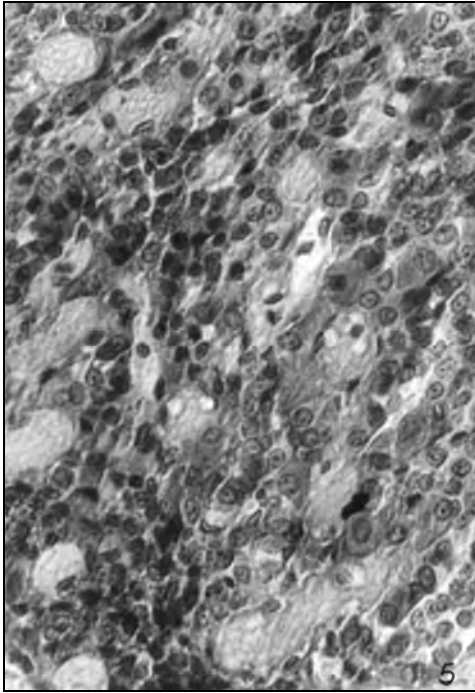


Fig. 5. Adenohipofiza la lotul tratat cu Fluocinolon-acetonid N (x 200).

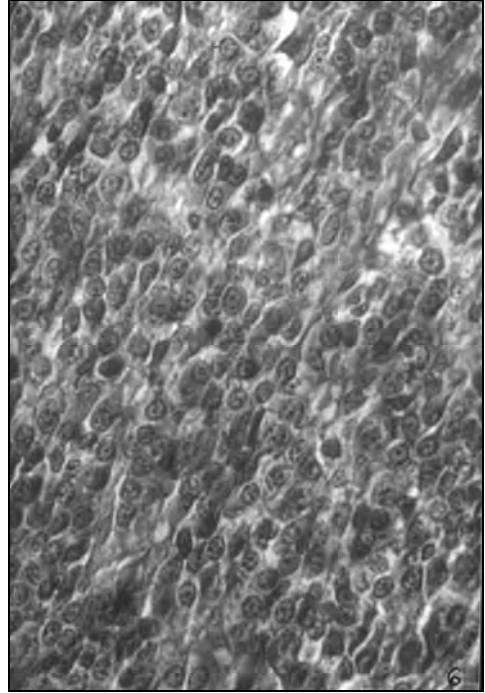


Fig. 6. Adenohipofiza la lotul tratat cu Fluocinolon-acetonid N pe fondul administrării de Propranolol(x 200).

La loturile PR+FC₁ și PR+FC₂, suprarenala prezintă un aspect apropiat de cel înregistrat la loturile martor. În zona fasciculată sunt prezente spongocitele (Fig. 9).

Rezultatele studiului biochimic. Rezultatele noastre, în consens cu cele din literatură [2-5, 7-14], arată că dermocorticoizii absorbiți transcutan, la șobolani, produc un exces glucocorticoidic caracteristic stării de diabet steroidic, manifestat prin creșterea glicemiei, a lipemiei, respectiv a colesterolemiei. Aceste modificări metabolice au la bază modificări endocrine profunde datorate alterării funcționării axului HHC.

Din analiza statistică a datelor obținute la șobolanii Wistar masculi prepuberi și puberi (Tabel 1) rezultă că tratamentul topic cu dermocorticoizii Fluocinolon-acetonid N determină o hiperglicemie semnificativă atât la șobolanii prepuberi cât și la cei puberi. La șobolanii prepuberi (FC₁) glicemia crește cu 31,94%, la puberi (FC₂) cu 117,46 %. Blocarea receptorilor β-adrenergici cu Propranolol atenuează semnificativ efectul hiperglicemiant steroid-diabetogen al tratamentului cu Fluocinolon-acetonid N, reducând considerabil nivelul glicemiei cu 14,74 % la prepuberi, respectiv cu 19,71% la puberi.

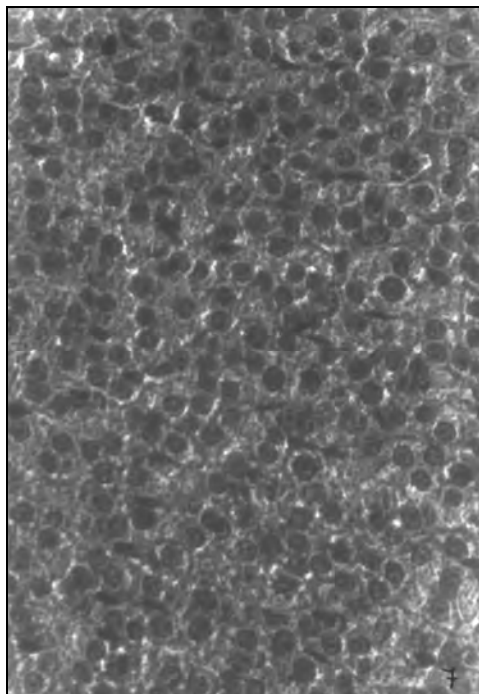


Fig. 7. Corticosuprarenala la lotul martor (x 200).

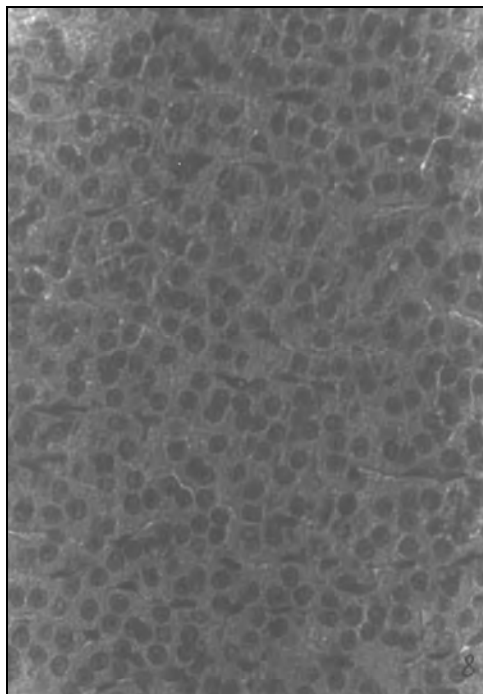


Fig. 8. Corticosuprarenala la lotul tratat cu Fluocinolon-acetonid N (x 200).

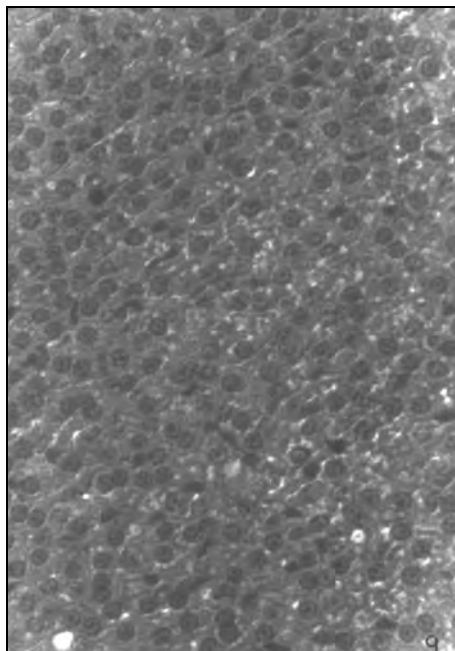


Fig. 9. Corticosuprarenala la lotul tratat cu Fluocinolon-acetonid N pe fondul administrării de Propranolol (x 200).

Hiperglicemia indusă de tratamentul topic cu Fluocinolon-acetonid N la șobolanii albi este rezultanta hiperproducției hepatice de glucoză, a intensificării gluconeogenezei și glicogenezei hepatice, a rezistenței musculare față de acțiunea insulinei [12-14].

Creșterea glicemiei reflectă o insulinerezistență tisulară puternică, indusă de excesul glucocorticoidic de natură exogenă, efect ce este atenuat de tratamentul cu Propranolol (Fig. 10).

Tabel 1

Glicemia la loturile martor și tratate

Loturi	Glicemie (mg%)
M ₁	72 ± 2,10
FC ₁	95 ± 2,04
a	31,94
PR+ FC ₁	81 ± 1,35
a	12,50%
b	-14,74%*
M ₂	63 ± 2,10
FC ₂	137 ± 2,37
a	117,46%*
PR+FC ₂	110 ± 1,09
a	74,60%*
c	-19,71%*

a–Valori raportate la loturile martor.

b–Modificări ale lotului PR+ FC₁ raportate la lotul FC₁.

c–Modificări ale lotului PR+ FC₂ raportate la lotul FC₂.

* Asteriscul reprezintă valori semnificative (P<0,001).

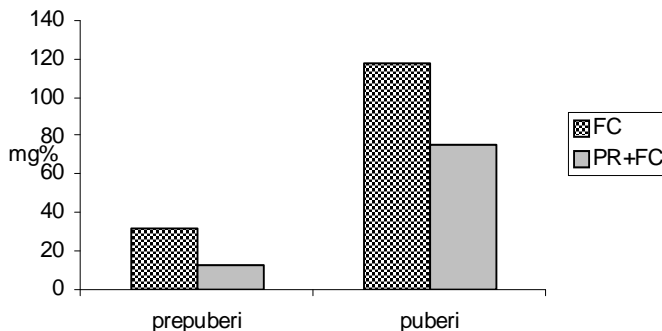


Fig. 10. Histograma modificării procentuale a glicemiei la loturile tratate față de martori.

Analizând Tabelul 2 și, respectiv, Fig. 11 se observă că tratamentul dermocorticoidic determină o hipercolesterolemie semnificativă. La prepuberi (FC₁), crește nivelul colesterolului seric cu 26,47 %, iar la puberi (FC₂) cu aproximativ 28%. Administrarea Propranololului reduce considerabil concentrația colesterolului sanguin, cu 18,02 % și cu 17, 2 %, față de loturile tratate cu Fluocinolon-acetonid N.

Tabel 2

Cantitatea colesterolului total seric, acizilor grași liberi, trigliceridelor și lipidelor totale serice la loturile martor și tratate

Loturi	Indici metabolici			
	Colesterol mg/100 ml ser	AGL μEq/l ser	Trigliceride serice mM/lser	Lipide totale serice mg%
M ₁	136 ± 2,20	554 ± 34,90	0,69 ± 0,03	450 ± 18,70
FC ₁	172 ± 4,15	1233 ± 70,50	3,96 ± 0,04	912 ± 41,30
a	26,47%**	122,56%**	473,91%**	102,66%**
PR+ FC ₁	141 ± 2,30	805 ± 31,50	1,82 ± 0,18	580 ± 18,70
a	3,67%	45,31%**	163,77%**	28,89%**
b	-18,02%**	-34,71%**	-54,04%**	-36,40%**
M ₂	218 ± 3,89	379 ± 16,30	0,65 ± 0,04	356 ± 15,83
FC ₂	279 ± 8,19	801 ± 15,20	2,20 ± 0,13	562 ± 19,75
a	27,98%**	111,87%**	276,78%**	57,86%**
PR+FC ₂	231 ± 4,15	510 ± 12,80	1,12 ± 20,10	405 ± 13,50
a	5,96%	34,56%**	72,30%**	13,76%*
c	-17,20%**	-36,48%**	-49,09%**	-27,93%**

a-Valori raportate la loturile martor.

b-Modificări ale lotului PR+ FC₁ raportate la lotul FC₁.

c-Modificări ale lotului PR+ FC₂ raportate la lotul FC₂.

* Valori semnificative (P<0,05).

** Valori foarte semnificative (P<0,001).

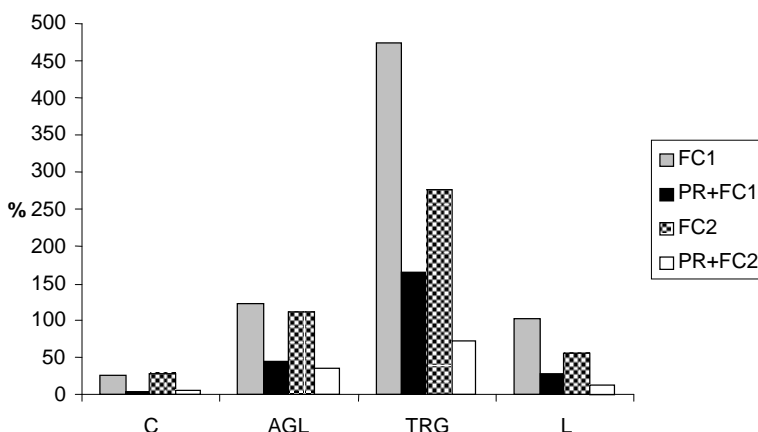


Fig. 11. Histograma variației procentuale a concentrației serice de colesterol (C), acizi grași liberi (AGL), trigliceride (TRG) și lipide totale (L) la loturile tratate față de loturile martor.

Creșterea colesterolului seric este asociată cu creșterea concentrației acizilor grași liberi (AGL), a trigliceridelor, precum și a lipidelor totale serice (Tabel 2, Fig.11). La prepuberi, AGL crește cu 122,56%, trigliceridele cu 473,91%, lipidele totale cu 102,66%. La puberi, AGL crește cu 111,87%, trigliceridele cu 276,78%, iar lipidele totale cu 57,86% față de martori. Sub efectul blocării receptorilor β -adrenergici cu Propranolol se reduce semnificativ concentrația AGL, cu 34,71% la prepuberi și cu 36,48% la puberi față de valorile obținute la loturile tratate cu Fluocinolon-acetonid N.

Simultan cu reducerea nivelului crescut al AGL se micșorează semnificativ concentrația sanguină a trigliceridelor și a lipidelor totale. Sub acțiunea tratamentului cu Propranolol, concentrația trigliceridelor scade cu 54,04% și cu 49,09%, iar a lipidelor totale cu 36,40% și, respectiv, cu 27,93% față de valorile obținute la loturile supuse tratamentului cu Fluocinolon-acetonid N.

Nivelul crescut al AGL seric este un factor important de potențare a insulinoresistenței periferice și, în special, a mușchiului striat, la nivelul căruia consumul preferențial de AGL față de glucoză intensifică gradul hiperglicemiei, caracteristic diabetului noninsulinodependent [13].

Conform datelor din literatură [3, 5,11], concomitent cu intensificarea degradării rezervelor lipidice și creșterea lipemiei, excesul glucocorticoidic provocat de tratamentul fluocinolonolic determină o creștere a cantității de lipide în timus.

Din rezultatele sinoptice (Tabel 3) reiese că sub acțiunea tratamentului fluocinolonolic se intensifică degradarea proteinelor, observație sugerată de creșterea activității transaminazelor serice, precum și a fosfatazelor. La prepuberi ASAT și ALAT cresc cu 12,32% și, respectiv, cu 9,85 %. La puberi, activitatea acestor enzime este mai puternică (Fig. 12), ceea ce explică și modificările structurale intense de la acest lot. În timp ce la prepuberi doar la ASAT am înregistrat o modificare semnificativă, la puberi am înregistrat o creștere semnificativă atât a activității ASAT cât și a activității ALAT. ASAT crește cu 24,41 %, ALAT cu 94,10 %. De asemenea, intensa activitate a acestor enzime explică și procesele de atrofiere observate la suprarenale, timus și splină [2-5,11, 12].

Tabel 3

Activitatea transaminazelor și fosfatazelor la loturile martor și tratate

Loturi	Enzime (mU/ml ser)			
	ASAT	ALAT	Fosfataza acidă	Fosfataza alcalină
M ₁	284 ± 10,60	19,18 ± 1,91	33,74 ± 1,39	296 ± 16,21
FC ₁	312,12 ± 3,40	21,07 ± 1,26	65,72 ± 1,23	427 ± 11,50
a	12,32%*	9,85%	94,78%**	44,26%**
PR+FC ₁	234,87 ± 7,34	15 ± 1,09	36,24 ± 1,32	351 ± 0,14
a	-17,29%*	-21,79%	7,40%	18,58%*
b	-26,64%**	-28,80%*	-44,86%**	-17,80%**
M ₂	172,09 ± 11,50	15,75 ± 0,83	47,14 ± 2,03	111 ± 6,37
FC ₂	214,06 ± 4,75	30,57 ± 1,53	78,50 ± 1,65	235 ± 5,45
a	24,41%*	94,10%*	66,53%**	111,72%**
PR+FC ₂	195,33 ± 9,47	18,55 ± 2,50	45,06 ± 2,08	105 ± 3,70
a	13,16%	17,77%	-4,41%	-5,40%
c	-8,72%	-39,31%**	-42,60%**	-55,32%**

* Valori semnificative ($P < 0,05$).

** Valori foarte semnificative ($P < 0,001$).

a-Valori raportate la loturile martor.

b-Modificări ale lotului PR+ FC₁ raportate la lotul FC₁.

c- Modificări ale lotului PR+ FC₂ raportate la lotul FC₂.

Sub acțiunea tratamentului cu Propranolol (Tabel 3) se reduce hiperactivitatea transaminazelor ASAT și ALAT, ASAT cu 26, 64% la prepuberi și cu 8,72% la puberi, ALAT cu 28,80 % la prepuberi și, respectiv, cu 39,31% la puberi.

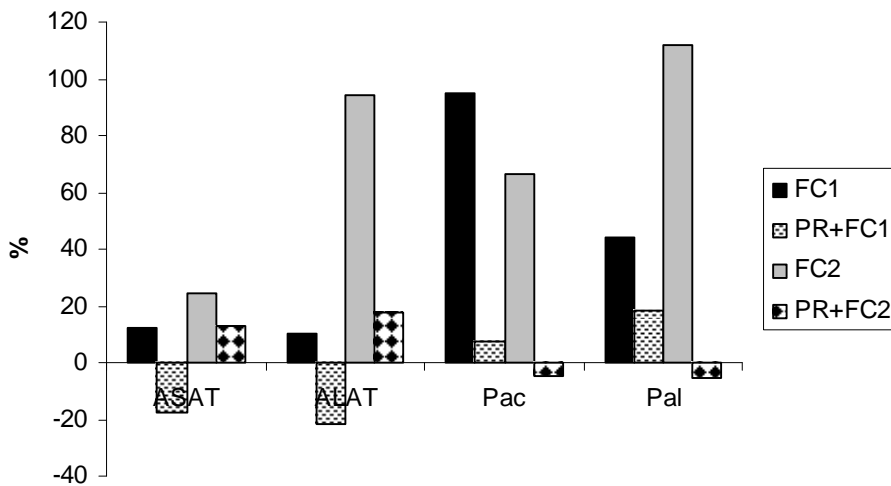


Fig. 12. Histograma activității enzimelor ASAT, ALAT, fosfataza acidă (Pac), fosfataza alcalină (Pal) la loturile tratate față de martori.

Paralel cu aceste modificări am înregistrat la loturile tratate cu Fluocinolon-acetonid N intensificarea activității fosfatazelor. Fosfataza acidă crește la prepuberi cu 94,78%, la puberi cu 66,53 %. Fosfataza alcalină crește la prepuberi cu 44,26 %, la puberi cu 111, 72%.

Intensificarea activității fosfatazelor explică și fenomenele de degenerescență observate la celulele STH și GTH [7], precum și la celulele din zona fasciculată [4]. Atât în hipofiză cât și în corticosuprarenală apar zone intense de liză și vacuolizare a organitelor cu rol în elaborarea și eliberarea granulelor de secreție.

Sub efectul blocării receptorilor β -adrenergici cu Propranolol, hiperactivitatea fosfatazei acide serice indusă de Fluocinolon-acetonid N se reduce cu 44,86% la prepuberi și cu 42,6% la puberi, iar a fosfatazei alcaline serice se micșorează cu 17,80% la prepuberi și, respectiv, cu 55,32% la puberi, față de valorile obținute la loturile tratate cu Fluocinolon-acetonid N (Fig. 12).

Concluzii. 1. Excesul glucocorticoidic indus experimental determină modificări morfofiziologice ale axului HHC care interferează cu activitatea receptorilor β -adrenergici.

2. Propranololul reduce semnificativ modificările structurale și metabolice induse de Fluocinolon-acetonid N.

3. Pe fondul blocării receptorilor β -adrenergici cu Propranolol la șobolanii masculi Wistar de 30 și 60 de zile, efectul hiperglicemiant și hiperlipidic al tratamentului epicutan cu Fluocinolon-acetonid N unguent se reduce substanțial, dependent de vârsta indivizilor.

4. Propranololul reduce hiperactivitatea transaminazelor, fosfatazelor alcalină și acidă din serul sanguin, cauzată de absorbția transcutană a unguentului Fluocinolon-acetonid N.

5. Activarea receptorilor β -adrenergici de către adrenalina circulantă este un factor permisiv de potențare în acțiunile sistemice adverse diabetogene și endocrinometabolice de risc cauzate de tratamentul cu Fluocinolon-acetonid N.

BIBLIOGRAFIE

1. Chernik, S., Novak, M., *Effect of insulin on FFA mobilization and ketosis in fasting pregnant rats*, "Diabetes", **19**, 1970, 563.
2. Crăciun, C., Ardelean, A., Madar, I., Tarba, C., Șildan, N., Crăciun, V., Fărcaș, T., *Ultrastructural studies of the secondary effects induced at the level of thymus by topic application of Fluocinolone-acetonid N in prepuberal rats*, în Crăciun, C., Ardelean, N. (Eds.), *Current Problems and Technique in Cellular and Molecular Biology*, p. 176-186, Mirton, Timișoara, 1997.
3. Crăciun, C., Frățila, S., Ardelean, A., Madar, I., Crăciun, V., *Ultrastructural and biochemical studies concerning the action of some topical dermocorticoids on prepubertal rat thymuses, before and simultaneously with the β -adrenoreceptors blocking*, în Crăciun, C., Ardelean, N. (Eds.), *Current Problems in Cellular and Molecular Biology*, p. 209-248, Risoprint, Cluj-Napoca, 1999.
4. Crăciun, C., Kis, E., Sandu, V.-D., Pașca, C., Puică, C., Crăciun, V., Madar, I., *Comparative studies of the adrenal cortex structure and ultrastructure in mature rats treated with topical dermocorticosteroids*, "Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Biol.", **46** (1), 2001, 91-98.
5. Crăciun, C., Miclăuș, V., Crăciun, V., *Comparative study of thymus ultrastructure, thymolysis and blood-serum lipids in prepubertal rats, treated with topical corticosteroids*, în Crăciun, C., Ardelean, N. (Eds.), *Current Problems in Cellular and Molecular Biology*, p. 200-217, Risoprint, Cluj-Napoca, 1998.
6. Cucuianu, M., Rus, H. G., Niculescu, D., Vonica, A., *Biochimie. Aplicații clinice*, Ed. Dacia, Cluj-Napoca, 1991.

7. Kis, E., Crăciun C., Pașca, C., Sandu, V.-D., Crăciun, V., Madar, I., *Comparative studies of the ultrastructure of somatotrope, gonadotrope and corticotrope cells in mature rats treated with topical dermocorticosteroids*, "Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Biol.", **46** (1), 2001, 99-109.
8. Kis, E., Puică, C., Pașca, C., Sandu, V.-D., Madar, I., *Attenuation of the Fluocinolone-acetonid N induced histological alteration of hypothalamic-pituitary-adrenal axis by Propranolol in white Wistar rats*, "Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Biol.", **44** (1-2), 1999, 127-134.
9. Kis, E., Sandu, V.-D., Pașca, C., *Efectul antiglucocorticoid al Propranololului*, "Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Biol.", **46** (2), 2001, 83-97.
10. Madar, I., Giurgea, R., Borda, D., Ramona, I., Borșan, M., *Comparative data on the "in vivo" effects of Hydrocortison-17-butyrate and Clobetasol-propionate upon the thymus in prepubertal young rats*, în Crăciun, C., Ardelean, A. (Eds.), *Current Problems in Cellular and Molecular Biology*, p.221-225, Risoprint, Cluj-Napoca, 1997.
11. Madar, I., Giurgea, R., Ramona, I., Borda, D., *Age-related role of beta-adrenoreceptor activity during Clobetasol-induced thymolysis in male young rats*, în Crăciun, C., Ardelean, A. (Eds.), *Current Problems in Cellular and Molecular Biology*, p.254-262, Risoprint, Cluj-Napoca, 1998.
12. Madar, I., Rusu V. M., Șildan N., Ilonca, A., *Attenuation of the stress-induced hyperglycemia, thymolysis, adrenal hypertrophy and liver adenylate-cyclase activity by Propranolol in immature and mature young rats*, "Rev. Roum. Biol., Biol. Anim.", **34** (1), 1989, 15-19.
13. Madar, I., Șildan, N., Borșan, M., Ilyés, I., *Effects of epicutaneous treatment with Fluocinolone unguent on glycemia, insulinemia and muscular sensitivity to insulin in various age-groups of Wistar rats*, în Crăciun, C., Ardelean, A. (Eds.), *Current Problems and Technique in Cellular and Molecular Biology*, p.301-304, Mirton, Timișoara, 1996.
14. Madar, I., Șildan, N., Ilyés, I., Crăciun, C., Frățilă, S., Găvan, N., Crăciun, A. R., *Age-related thymolytic and hyperglycemic effects of some percutaneously absorbed topical corticosteroids in rats*, în Crăciun, C., Ardelean, A. (Eds.), *Current Problems and Technique in Cellular and Molecular Biology*, p.305-310, Mirton, Timișoara, 1996.
15. Mureșan, E., Găboreanu, M., Bogdan, A. T., Băbă, A. I., *Tehnici de histologie normală și patologică*, Ed. Ceres, București, 1974.
16. Zlatkis, A., Zak, B., Boyle, A. J., *A new method for the direct determination of serum cholesterol*, "J. Lab. Clin. Med.", **41**, 1953, 486-492.

NEFROTOXICITATEA NUROFENULUI SURPRINSĂ LA NIVEL STRUCTURAL ȘI ULTRASTRUCTURAL LA ȘOBOLANUL ALB WISTAR

CRISTINA PAȘCA*, CONSTANTIN CRĂCIUN** și
MIHAELA IOANA DRIHA***

SUMMARY. – **Nephrotoxicity of Nurofen as Assessed at Structural and Ultrastructural Levels in White Wistar Rats.** Nurofen, an antiinflammatory drug widely used in the therapy of many diseases in humans, has a lot of side effects which, often, are so grave that the health of the treated person can be seriously disturbed. Unfortunately, these side effects are not completely known. Our investigations demonstrated that Nurofen, administered in a dose of 250 mg/kg body weight for 35 days, has a significant nephrotoxicity, which could be clearly noticed after 10 days of treatment and which got worse constantly and progressively during the whole experimental period. All the histopathological and ultrastructural alterations induced by this drug had not an irreversible character, a natural recovery phenomenon of the kidney being possible after the end of the treatment.

By light microscopy studies, we could distinguish many histological modifications: an obvious glomerular stasis which affected wide areas and which was correlated with a swelling of the mesangial structures, the appearance of many lobulated glomerules in which we notice the presence of a rich PAS+ material placed at the level of the mesangium and Bowman space, a zonal interstitial nephritis. Besides, a few of altered glomerules were affected by caryopycnosis, atrophy and sclerosis processes. Zonally, both in cortex and medulla, an obvious disseminated intravascular coagulation phenomenon could be observed.

Ultrastructurally, we could observe that the modifications induced by the treatment with Nurofen affected especially the cells at the level of proximal convoluted tubule. Thus, most nuclei of these nephrocytes had an abnormal shape and appeared pycnotic, retracted, hyperchromatic, with a peculiar disposition of the chromatin. The cytoplasm was seriously altered, more exactly it was intensely vacuolised, having wide lysis areas which were disposed apically. Among the cellular organelles the most sensitive in this treatment seemed to be the lysosomes - which were identified in an increased number, and the mitochondria – which, in most cases, became spherical, being swollen and greatly altered, vacuolised, having a matrix and cristae seriously disturbed. Zonally, the nephrocytes had an obvious tendency to get a cuboidal or even squamous, flat shape, simultaneously losing their brush border or getting some polymorphous, swollen and seriously vacuolised microvilli. As a consequence of these grave alterations, in a few areas the apical pole of the nephrocytes appeared completely destroyed, the cytoplasm, nucleus and organelles being eliminated inside the lumina of the proximal convoluted tubule.

* *Universitatea "Babeș-Bolyai", Facultatea de Biologie și Geologie, Catedra de Zoologie, 3400 Cluj-Napoca, România. E-mail: cpasca@biolog.ubbcluj.ro*

** *Universitatea "Babeș-Bolyai", Facultatea de Biologie și Geologie, Catedra de Fiziologie animală, 3400 Cluj-Napoca, România*

*** *Universitatea "Babeș-Bolyai", Facultatea de Biologie și Geologie, 3400 Cluj-Napoca, România*

Nurofenul (Ibuprofenul, Padudenu, Brufenul, Motrinul, Rufenu) este un medicament antiinflamator nesteroidian care aparține clasei derivaților acidului propionic. Substanța activă a acestui produs medicamentos este ibuprofenul (acidul izobutilfenil-propionic), care a fost sintetizat în anul 1969 de către cercetătorii companiei „Boots” din Anglia [7].

Inițial, Nurofenul a fost sintetizat ca rezultat al unei necesități stringente generate de multiplele probleme asociate tratamentului cu corticosteroizi, tratament indicat în cazul artritei reumatismale și pentru evitarea iritației gastro-intestinale și intolerabilității generale tipice medicamentelor antiinflamatoare existente pe piață la momentul respectiv. După obținerea lui, acest medicament a fost rapid acceptat și asimilat pe piața farmaceutică internațională, deoarece, spre deosebire de produsele medicamentoase omoloage, efectul său terapeutic s-a dovedit a fi mult mai puternic și, în plus, este asociat cu reacții adverse mai moderate. Apărea astfel posibilitatea înlocuirii eficiente a aspirinei cu un produs cu o valoare terapeutică similară, dar fără dezavantajele majore ale acesteia [7].

Nurofenul este un produs medicamentos cu acțiune rapidă și eficiență împotriva: durerilor de cap, migrenelor, durerilor dentare, durerilor menstruale, nevralgiilor, durerilor reumatice, durerilor de spate, durerilor musculare, primelor simptome de răceală sau gripă, stărilor febrile, vasospasmelor post-hemoragie subarahnoidiană anevrismală, osteoartritelor, periartritelor, artrozelor, spondilitei anchilopoitice, spondilozelor, bolilor acute musculo-scheletice (bursite, tendinite, tenosinovite, epicondilitate, fibrozite, miozite), bolii Alzheimer, fibrozei cistice [3, 4, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 30]. Mai recent, el este folosit și în prevenirea cancerului de colon [14].

Din păcate, potrivit datelor din literatură, cu toate progresele înregistrate în domeniul terapiei cu produse medicamentoase antiinflamatoare (fie ele steroidiene sau nesteroidiene), administrarea lor în doze terapeutice este încă însoțită de multiple și semnificative insuccese datorate efectelor secundare exercitate asupra organismului gazdă, efecte materializate în apariția unor leziuni reversibile sau chiar ireversibile la nivelul unor organe vitale, care pot compromite sănătatea individului supus tratamentului. Aceste considerente explică interesul deosebit manifestat la ora actuală pe plan mondial pentru cercetarea vastă a reacțiilor adverse ale terapiei cu medicamente antiinflamatoare cu un spectru terapeutic extrem de larg și diversificat.

Material și metodă. Cercetările s-au efectuat pe șobolani albi Wistar, adulți, masculi, cu o greutate medie de 190 ± 10 grame. Animalele de experiență au fost întreținute în condiții optime de laborator, asigurându-li-se îngrijirea și hrana corespunzătoare și apă *ad libitum*. S-a lucrat pe 8 loturi constituite din câte 8 indivizi:

- loturile martor M₁-M₄ – constituite din șobolani sănătoși, netratați cu medicament;
- loturile T₁, T₂ și T₃ - constituite din șobolani sănătoși, tratați zilnic cu o doză terapeutică de 250 mg Nurofen / kg corp, administrată *per os*, prin gava, în trei prize (una înainte de masă și două după masă); șobolanii au fost sacrificați după 10, 20, respectiv, 35 de zile de tratament, pentru realizarea unor investigații structurale și ultrastructurale;
- lotul T₄ – constituit din șobolani tratați similar loturilor T₁-T₃, doar că după cele 35 de zile de tratament a urmat o perioadă de 10 zile în care nu li s-a mai administrat nici un medicament, asigurându-li-se doar o întreținere și o hrănire corespunzătoare.

Sacrificarea animalelor s-a făcut dimineața, la 16 ore de inaniție, după o anestezie profundă cu eter etilic, prin decapitare și exsangvinizare. Imediat după sacrificare s-au recoltat fragmente de rinichi, care au fost imediat prelucrate conform tehnicilor uzuale, astfel încât să fie posibilă realizarea în condiții optime a investigațiilor de microscopie optică și electronică [5, 16, 22, 24].

Rezultate și discuții. Investigațiile structurale și ultrastructurale întreprinse de noi au condus la concluzia că Nurofenul, în condițiile experimentului nostru, exercită o acțiune toxică destul de pregnantă asupra rinichiului șobolanului alb Wistar, concentrată preponderent asupra componentei celulare renale, dar, într-o mai mică măsură, și asupra celei vasculare. Modificările induse de acest antiinflamator nesteroidian sunt deja clar decelabile după primele 10 zile de tratament, după care se accentuează în mod progresiv, constant, atingând un maximum de amploare la finele celor 35 de zile de tratament. Însă, trebuie subliniat că aspectele alterative și degenerative evidențiate atât la nivel structural cât și ultrastructural au extindere limitată, zonală, nu interesează rinichiul în întregul său și nu îmbracă aspecte ireversibile, făcând posibilă desfășurarea unor procese naturale de refacere în timp a organului în condițiile întreruperii administrării Nurofenului chiar și în absența unei medicații adjuvante protectoare sau regeneratoare la nivel renal.

Modificări structurale induse de Nurofen la nivelul rinichiului

Față de lotul martor, cu un aspect histologic renal normal, la lotul T₁ (sacrificat după doar 10 zile de tratament), s-au putut observa la microscopul optic o serie de modificări care afectează preponderent structurile corticalei și mai puțin pe cele ale medularei renale. Unii dintre corpusculii renali se remarcă printr-o stază sanguină glomerulară asociată cu prezența câtorva celule inflamatorii în ansele capilare, precum și cu un edem mesangial și apariția de structuri proteice la nivelul spațiului capsular Bowman (Fig. 1). Semnificativ afectați se dovedesc a fi nu doar glomerulii, ci și tubii uriniferi, mai ales în porțiunea lor contortă proximală, ale căror celule prezintă semne evidente de distrofie granulo-vacuolară clară, care în unii tubi este asociată cu o tubulonefroză cu edem și tumefierea celulelor și chiar cu procese de citoliză de intensitate variabilă, care concură zonal la detașarea urmată de deversarea în lumenul tubului a celulelor epiteliului tubular. Toate aceste procese distructive concură la apariția în interiorul unor tubi a unui însemnat material granular proteic (Fig. 2). În medulară, modificările sunt mult mai discrete, mai evidentă fiind o stază urinară moderată zonală.

Dacă la lotul T₁ modificările histopatologice aveau o dispoziție zonală, la lotul T₂ – sacrificat după 20 de zile de tratament cu Nurofen, se înregistrează o extindere și totodată o amplificare a acestora, mai exact apare o edemație mesangială accentuată, o stază glomerulară generalizată corelată și cu o stază interstițială, care concură la conferirea unui aspect lobulat al majorității corpusculilor renali (Fig. 3). Staza este asociată cu semne clare de coagulare intravasculară diseminată (Fig. 4), vizibilă și în vasele mici ale medularei renale (Fig. 5).

Edemul mesangial este confirmat și de reacția PAS care, în plus, evidențiază și o îngroșare a membranei bazale glomerulare, mai ales a foței parietale a capsulei Bowman. Integritatea marginii în perie, care după 10 zile de tratament nu părea a fi afectată, la acest lot apare serios alterată, în numeroși tubi ea fiind complet distrusă zonal. În plus, în anumite regiuni, se constată apariția de infiltrate inflamatorii abundente.

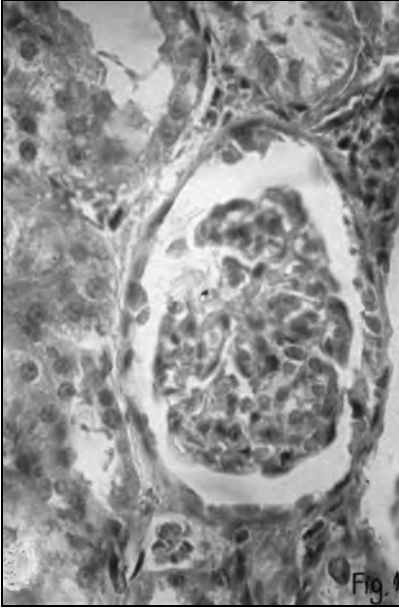


Fig. 1. Stază glomerulară și edem mesangial discret; stază și prezența câtorva formațiuni proteice în spațiul capsular Bowman (x 1280).

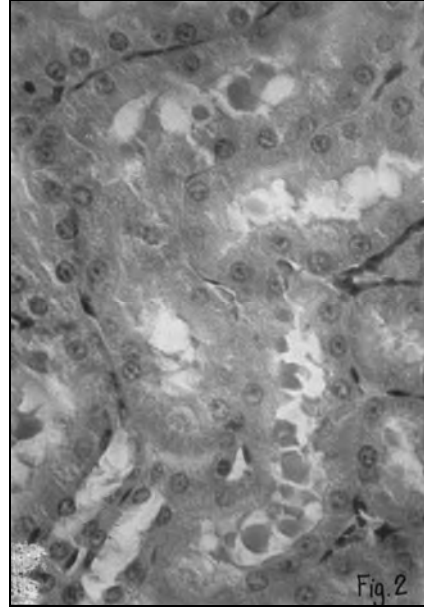


Fig. 2. Tubulonefroză cu edemațierea și tumefierea celulelor epiteliale ale tubilor uriniferi; citoliză zonală și prezența de structuri proteice în lumenul tubilor (x 1280).

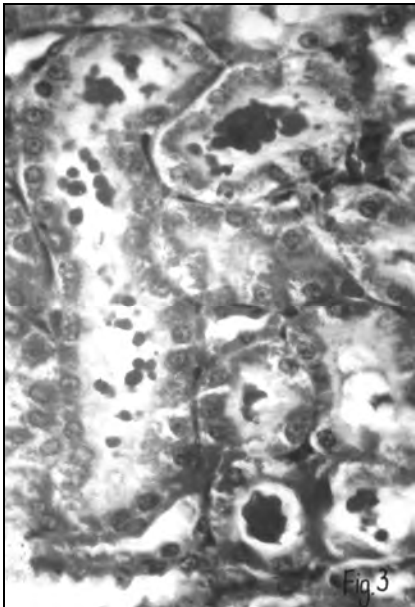


Fig. 3. Material proteic abundent în lumenul tubilor uriniferi (x 1280).

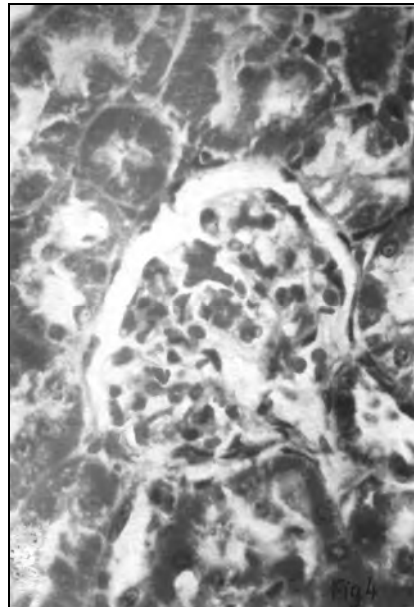


Fig. 4. Stază sanguină și fenomene de coagulare intravasculară diseminată în ansele glomerulare ale nefronului (x 1280).

După 35 de zile de tratament (lotul T₃), acțiunea nefrototoxică a Nurofenului pare a fi mult accentuată, fapt demonstrat de creșterea ca amploare și extindere a aspectelor histopatologice înregistrate la lotul sacrificat anterior. Astfel, corpusculii renali cu aspect lobulat cresc sub raport numeric și, în plus, se constată că unii corpusculi prezintă o marcantă atrofie de compresiune și fenomene de cariopicnoză, ajungându-se chiar la sclerizarea zonală a unor glomeruli renali cu deformarea conturului lor și dobândirea unui aspect vestigial (Fig. 6). Totodată, se constată fenomene sclerotice și la nivelul arteriolei aferente și o nefrită interstițială limfohistiocitară în focar.

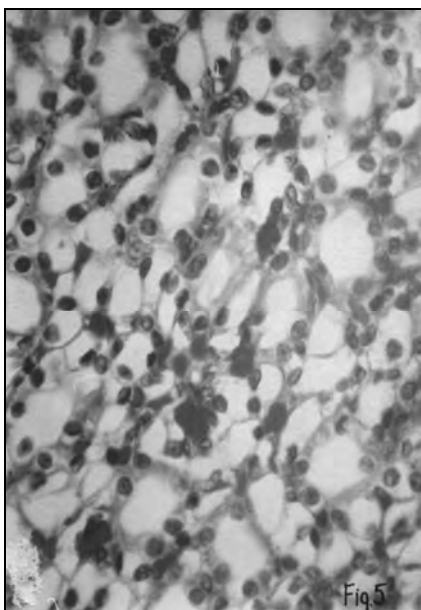


Fig. 5. Coagulare intravasculară diseminată în vasele mici din medulara renală (x 1280).

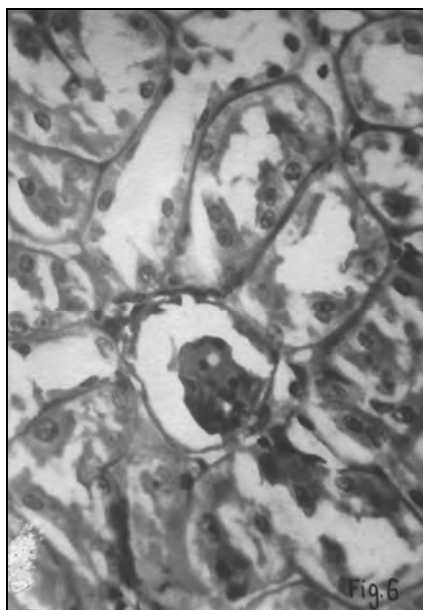


Fig. 6. Material PAS+ prezent la nivelul mesangiului unor glomeruli atrofiați, cu aspect vestigial; margine în perie semnificativ alterată (x 1280).

Tubii uriniferi, preponderent cei din corticală, continuă să prezinte o serie de aspecte histopatologice tipice tubulonefrozei de tip fibrinoid (Fig. 7), distrofiei granulare și chiar necrozării punctiforme a nefrocitelor. În lumenul unor tubi uriniferi se remarcă apariția unui material hialin ce încorporează celulele epitelului tubular, detașate de pe membrana bazală.

La lotul T₄, la care după cele 35 de zile de tratament cu Nurofen a urmat o perioadă de 10 zile fără tratament, se constată o refacere semnificativă a structurii rinichiului. Mai exact, staza sanguină din ansele glomerulare scade, la fel și edemul mesangial; nu se mai înregistrează fenomene de coagulare intravasculară diseminată nici în corticală și nici în medulară, numărul de corpusculi renali cu material proteic extravazat în spațiul capsular Bowman scade, la fel și cantitatea acestui material. Epiteliul tubilor uriniferi este în bună parte refăcut și doar zonal prezintă semne ale unei distrofii granulare, în timp ce staza urinară și nefrita interstițială limfohistiocitară dispar. În ansamblu, aspectul histologic se apropie de cel al lotului martor.

Modificări ultrastructurale induse de Nurofen la nivelul rinichiului

Rezultatele studiilor electrono-microscopice concordă cu aspectele histopatologice înregistrate prin investigații de microscopie optică. S-a putut constata că, în condițiile experimentului nostru, Nurofenul exercită un efect toxic renal moderat, concretizat atât în alterarea componentelor aparatului de ultrafiltrare glomerulară, dar și a tubilor uriniferi, în principal în porțiunea lor contortă proximală, care, după cum se știe, sunt profund implicați în procesele de reabsorbție tubulară. Modificările ultrastructurale sunt deja decelabile după doar 10 zile de tratament, după care se accentuează progresiv în următoarele 25 de zile de administrare a medicamentului.

Acțiunea nefrototoxică a acestui antiinflamator nesteroidian pare să intereseze în principal componenta celulară și mai discret pe cea vasculară renală. Toate aceste modificări le raportăm la lotul martor la care am constatat un aspect histologic normal al tuturor componentelor nefronului (corpusculul renal și tubul urinifer).

La nivelul corpusculilor renali, acest medicament induce o hipertrofie semnificativă consecutivă, pe de o parte, stazei sanguine din ansele capilare glomerulare și, pe de altă parte, edemației mesangiale (Fig. 8). Cele mai drastice modificări ultrastructurale au fost semnalate la nivelul nefrocitelor tubilor contorți proximali, modificări care interesează majoritatea componentelor celulare: nucleul, citoplasma, anumite organite celulare, precum și membrana celulară.

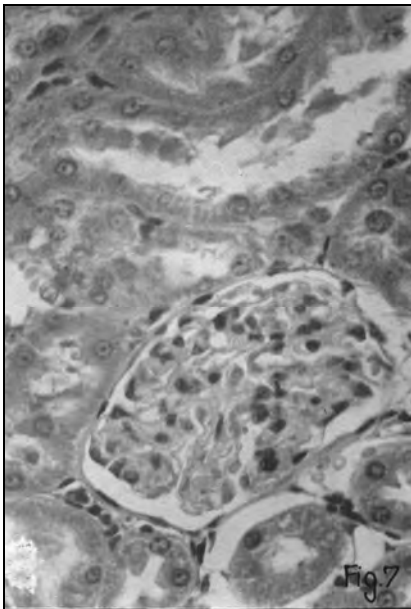


Fig. 7. Ușoară stază în ansele glomerulare, edem mesangial moderat cu septarea glomerulului și tubulonefroză de tip fibrinoid în unii tubi uriniferi (x 12600).

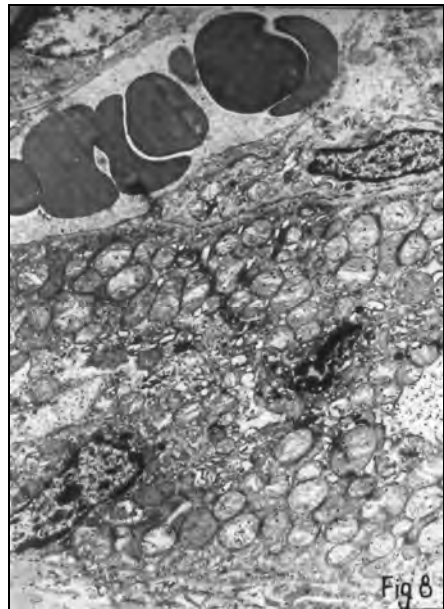


Fig. 8. Stază vasculară la nivelul corticalei renale și mitocondrii polimorfe, cu matrice și cristae rarefiate (x 6720).

Astfel, sensibilitatea nucleului s-a materializat într-o tendință clară de deformare a sa, el dobândind un contur neregulat (Fig. 9-11), având o cromatină condensată și dispusă anormal, în timp ce spațiul nuclear intermembranar apare edemațiat (Fig. 12). Unii nuclei devin hiperchromi și manifestă o tendință clară de picnozare (Fig. 10).

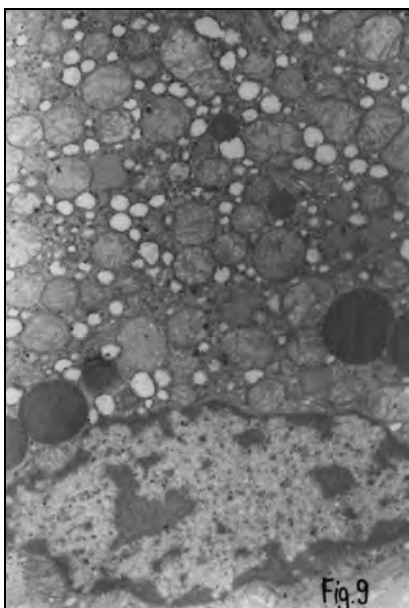


Fig. 9. Nucleu cu contur neregulat, creșterea numărului de lizosomi și vezicularea reticulului endoplasmic din unele nefrocite (x 12600).

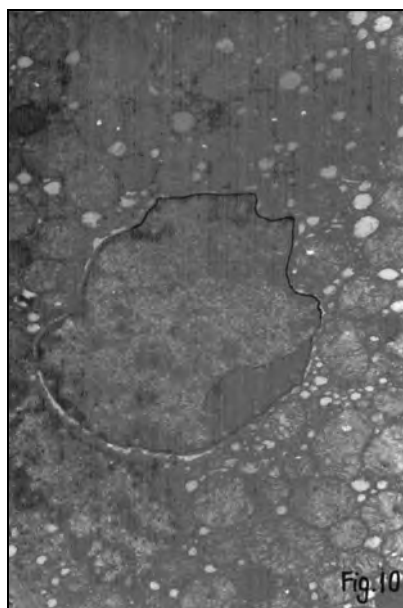


Fig. 10. Nucleu hiperchrom cu tendință de picnozare și spațiu intermembranar nuclear edemațiat (x 12600).

Citoplasma nefrocitelor mai drastic afectate apare intens vacuolizată datorită în principal veziculării reticulului endoplasmatic rugos (Fig. 9, 12, 13) și, în plus, se remarcă apariția unor mari zone de liză intracelulară dispuse cu predilecție apical (Fig. 14). Tot în citoplasma apicală a nefrocitelor din numeroși tubi proximali apar concentrații de lipide.

Dintre organele celulare sensibile la acțiunea Nurofenului alături de RER despre care am amintit în cele de mai sus, s-a constatat și o creștere a numărului de lizosomi (Fig. 9) și o modificare a structurii mitocondriilor care devin sferice, iar în unele nefrocite se balonizează puternic și prezintă o matrice și criste rarefiate, dezorganizate, manifestând o tendință clară de vacuolizare (Fig. 11, 15).

Membrana celulară nu scapă nici ea acțiunii toxice a tratamentului cu Nurofen, în sensul că se constată instalarea unor procese degenerative diferite ca amploare, gravitate și extindere, pornindu-se de la o dilatare apicală a microvililor, care dobândesc un aspect polimorf pe fondul unei vacuolizări citoplasmice (Fig. 12, 16) și evoluând până la distrugerea parțială sau chiar totală a marginii în perie, corelată cu aplatizarea nefrocitelor, cu distrugerea polului lor apical, cu migrarea nucleului și organelor celulare dinspre polul bazal către cel apical, urmată de deversarea conținuturilor celulare în lumenul tubilor, unde

materialul deversat se acumulează progresiv și se organizează sub forma unor conglomerate care obturează lumenul tubular, perturbând astfel tranzitul urinar (Fig. 17). Se remarcă modificări nu doar în zona apicală, ci și în cea bazală a unor nefrocite, în sensul că pliurile parabazale, în care sunt adăpostite mitocondriile apar dilatate, edemațiate.

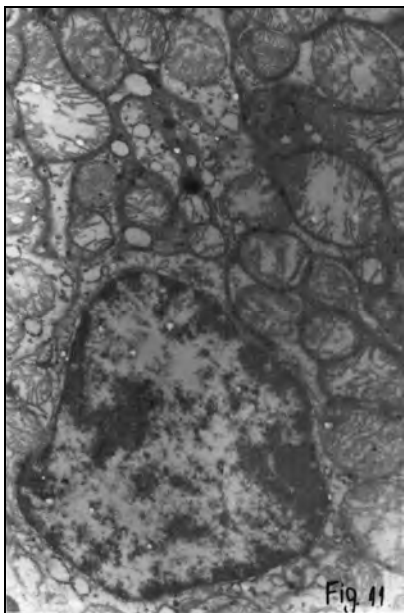


Fig. 11. Mitocondrii balonizate, polimorfe, cu matricea și cristele rarefiate și nucleu cu contur neregulat (x 12600).

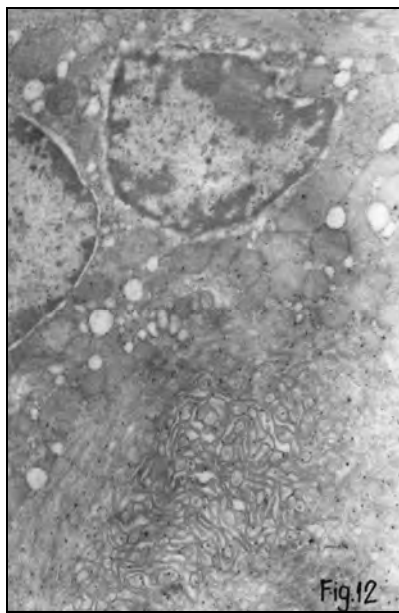


Fig. 12. Microvili ai bordurii în perie balonizați, cu vacuolizări și cu un aspect polimorf, vezicularea reticulului endoplasmic și edemațierea spațiului intermembranar nuclear (x 12600).

La ora actuală este cunoscut că, în general, medicamentele antiinflamatoare nonsteroidice sunt potențial nefrottoxice. Având capacitatea de a inhiba ciclooxigenazele, ele blochează sinteza prostaglandinelor și la nivel renal. Toate antiinflamatoarele nesteroidiene pot produce insuficiență renală acută, în principal la organismele cu concentrații serice crescute de angiotensină II, noradrenalină, ADH, prin inhibiția sintezei de prostaglandine vasodilatatoare (PGE_2 , PGD_2 , PGI_2). Astfel de situații se întâlnesc în insuficiența cardiacă congestivă, ciroza hepatică cu ascită, depleția volemică indusă prin diuretice, restricția sodică, sindromul nefrotic. Sunt predispuse la insuficiență renală și organismele în vârstă, cu boli reno-vasculare, lupus eritematos diseminat, gută [10].

Nurofenul se elimină complet din organism pe parcursul a aproximativ 24 ore de la administrare. Eliminarea se face în principal *pe cale renală* (54-64%), dintre care 10-20% sub formă nemodificată și 44% sub forma unor metaboliți glucuronici conjugați. Restul de 36-46% de medicament care au „scăpat” filtrului de epurare renal sunt excretate prin fecale (bilă). Doar o mică parte a medicamentului se elimină din organism *sub formă netransformată* [9].

NEFROTOXICITATEA NUROFENULUI

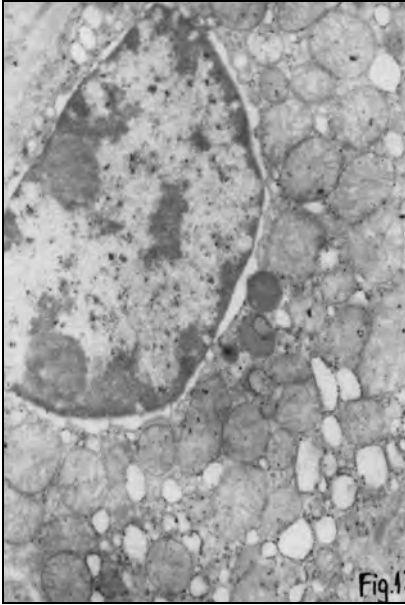


Fig. 13. Vacuolizarea citoplasmei nefrocitelor, nucleu cu contur neregular, cu hiper cromatoză corticală și cu edemațierea spațiului intermembranar nuclear (x 16800).

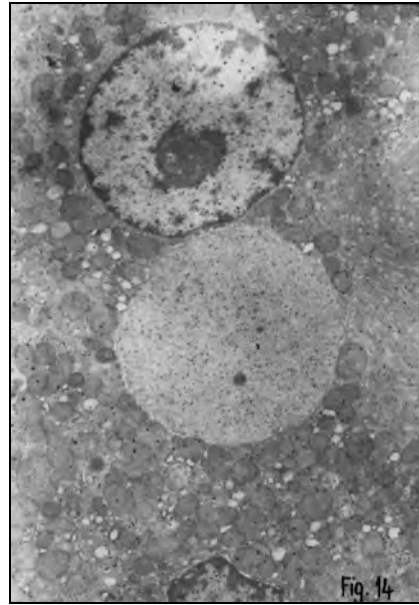


Fig. 14. Zone extinse de liză intracitoplasmatică la nivelul unor nefrocite (x 6930).

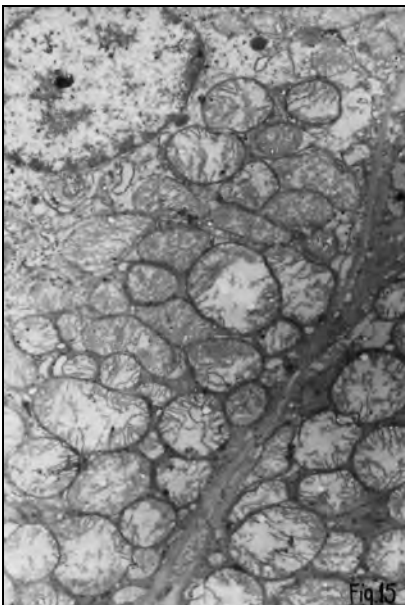


Fig. 15. Mitocondrii sferice, balonizate, cu matricea și cristele rarefiate și tendință spre vacuolizare (x 8400).

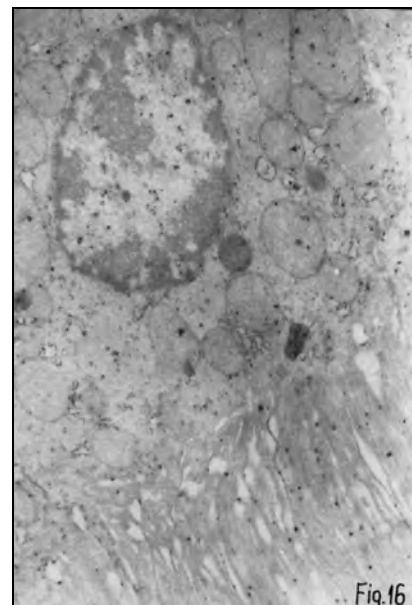


Fig. 16. Dezorganizarea bordurii în perie a nefrocitelor, microvili balonizați, cu vacuolizări și cu un aspect polimorf (x 16800).

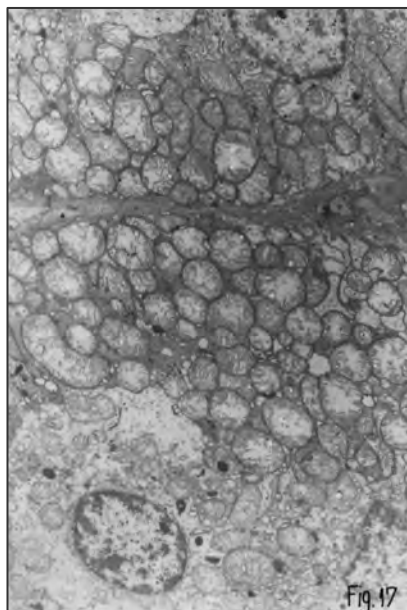


Fig. 17. Balonizarea și alterarea ultrastructurii mitocondriilor, distrugerea marginii în perie, dezorganizarea polului apical al nefrocitelor urmată de deversarea conținutului celular în lumenul tubului urinifer (x 4630).

renale preexistente adeseori pot surveni ischemii renale pe fondul inhibării sintezei de prostaglandine, cunoscut fiind faptul că acestea joacă un rol esențial în menținerea homeostaziei prin echilibrarea balanței vasoconstricție-vasodilatație în organism [11, 20]. Rareori se poate instala chiar și oliguria [32].

Nurofenul acționează ca un inhibitor preferențial al ciclooxigenazei 1, ceea ce explică apariția unor reacții adverse renale mai puțin drastice decât în cazul produselor medicamentoase inhibitoare ale ciclooxigenazei 2 (de exemplu etodolacul). Rezultatele obținute în cazul unor studii experimentale de laborator coroborate cu cele obținute în clinică au arătat că Nurofenul nu afectează foarte puternic hemodinamica renală, excreția netă de electroliți sau de albumină. Acest medicament nu modifică nivelul arginin-vasopresinei, însă conduce la o reducere a concentrației plasmatice a reninei, ceea ce sugerează că ciclooxigenaza 1 este implicată în eliberarea reninei. În plus, s-a constatat că Nurofenul scade excreția de litiu prin creșterea reabsorbției sale tubulare și perturbă semnificativ recuperarea sodiului și apei la nivelul tubilor proximali. El poate determina și o hiperkaliemie. De asemenea, Nurofenul reduce excreția de α -glutation- S-transferază, enzimă implicată în formarea complexelor cu glutationul – un tripeptid cu cisteină prezent în majoritatea celulelor mamiferelor și care contribuie la desfășurarea mecanismelor de protecție față de efectul toxic exercitat de radicalii liberi ai oxigenului [11, 27, 28].

În cercetările lor, Mann și colab. [18] au constatat că nefrototoxicitatea Nurofenului este dependentă de doza administrată și de vârsta organismului supus tratamentului, cei mai sensibili fiind copiii și vârstnicii, la care pot să apară destul de frecvent atât alterări

Din cele menționate anterior deducem că biotransformarea și, implicit, activarea Nurofenului este corelată cu activitatea hepatică, iar excreția lui ca atare sau sub forma conjugatilor glucuronici este strict dependentă de funcția renală [9]. Modificând farmacocinetica acestui produs medicamentos și/sau a principiilor sale active se poate, pe de o parte, altera eficacitatea sa terapeutică și, pe de altă parte, se pot exacerba efectele sale secundare [6]. Astfel, s-a constatat că afecțiunile hepatice, precum și cele renale (în principal fibroza cistică) pot conduce la perturbări importante ale farmacocineticii Nurofenului [9].

Se pare că bolile renale influențează puternic excreția și, implicit, acțiunea Nurofenului, de un mare interes fiind determinările clearance-ului glomerular (cu insulină, creatină și tiosulfat), care pot semnala existența și gradul unei posibile alterări funcționale renale. Totodată, trebuie avut în vedere și faptul că proteinele plasmatice în condiții normale nu traversează bariera ultrafiltrantă glomerulară și, prin urmare, prin urină va fi eliminată doar fracțiunea liberă, nelegată a medicamentului.

Astfel, s-a constatat că la persoanele cu afecțiuni

funcționale, cât și structurale renale acute, cu un caracter tranzitoriu, de tipul nefritei interstițiale acute, necrozei papilare, sindromului nefrotic, insuficienței renale cronice corelate cu perturbarea proceselor de filtrare a apei și electroliților și cu apariția edemelor. Durata tratamentului cu Nurofen pare a fi și ea strâns corelată cu gradul de toxicitate renală exercitată de acest medicament. Astfel, tratamentele ce depășesc 3-4 săptămâni conduc la o diminuare semnificativă a activității ATP-azelor Na^+ - și K^+ -dependente de la nivelul corticalei renale, la o creștere a conținutului fosfolipidic din aceeași zonă, precum și la o creștere a greutateii rinichilor, toate acestea corelându-se cu sporirea marcantă a creatinei și ureei serice [12, 18, 31].

Aspectele structurale și ultrastructurale semnalate în cadrul investigațiilor noastre sunt în deplină concordanță cu datele din literatură. Ele reflectă clar că Nurofenul, administrat zilnic, în doze terapeutice, timp de 35 de zile (perioadă nu foarte îndelungată pentru un tratament cu o medicație antiinflamatoare), exercită o acțiune nefrotoxică moderată. Aceasta este decelabilă atât microscopo-optic cât și electronomicoscopic încă după primele 10 zile de tratament și se accentuează progresiv pe întreaga durată de administrare a medicamentului. Din fericire, procesele alterative și degenerative, deși semnificative, nu ating nici o amploare și nici o extindere care să aibă un caracter ireversibil, permițând desfășurarea pe parcursul a 10 zile, după încetarea tratamentului cu Nurofen, a unor fenomene regenerative naturale în absența oricărei medicații protectoare și/sau regeneratoare renale.

Așa cum deja am menționat în cele de mai sus, modificările histopatologice și ultrastructurale înregistrate în cadrul experimentului nostru concordă cu cele semnalate în literatură de către diferiți cercetători care au abordat tangențial sau direct nefrotoxicitatea antiinflamatoarelor nesteroidiene. Însă, unele aspecte renale semnalate de noi au caracter de element de noutate, nefiind regăsite în materialul bibliografic destul de bogat consultat de noi.

Potrivit rezultatelor noastre, Nurofenul afectează profund atât *aparatură de ultrafiltrare glomerulară* (unde se constată instalarea: stazei sanguine, corelată cu fenomene de coagulare intravasculară diseminată, în ansele capilare glomerulare, sclerozării arteriolei aferente, îngroșării membranei bazale a foițelor capsulei Bowman și edemației mesangiale intra- și extraglomerulare), dar și *tubii uriniferi* (preponderent în porțiunea lor contortă proximală), materializată în dezorganizarea structurală de intensitate diferită a nefrocitelor din epiteliul tubular (alterarea până la picnozare a nucleului, vacuolizarea citoplasmatică preponderent apical, apariția zonală a unor bogate depozite lipidice intracitoplasmatică, creșterea numărului de lizosomi, balonizarea mitocondriilor cu rarefierea matricei și cristelor, dilatarea apicală a microvililor și chiar distrugerea parțială sau chiar totală a bordurii în perie cu deversarea constituentilor celulari în lumenul tubului urinifer pe care îl obținează, dilatarea pliurilor parabazale ale nefrocitelor ce adăpostesc mitocondrii cu o structură profund alterată). Toate aceste procese alterative și degenerative au implicații profunde asupra proceselor de reabsorbție tubulară, care, în mod fiziologic, sunt extrem de intense în tubii contorți proximali și esențiale în formarea urinei.

Conform datelor din literatură, între cauzele distrofiilor renale se enumeră o serie de stări toxice, cauzate de substanțe cu cale de eliminare predominant renală, așa cum este și cazul Nurofenului. S-a constatat că în funcție de capacitatea de selectivitate

a absorbției toxicului, nefronul va fi afectat în mod diferit. Dintre aceste substanțe enumerăm: nitriții, sărurile de mercur sau uraniu, cantarina, iodurile, alcaloizii, unele pesticide etc. Acestea pot produce hiperemii și chiar hemoragii glomerulare. De asemenea, se pot induce distrofii granulo-grase și necroze tubulare în cazul intoxicațiilor cu săruri de crom sau mercur. În general, acțiunea toxicelor este generatoare de distrofii și necrobioze sau necroze tubulare [2].

Aspectul distrofiei granulo-grase (semnalate și în cadrul experimentului nostru) se materializează în prezența de picături lipidice sau a unei citoplasme granulare. În cazul în care sunt extrem de numeroase, picăturile lipidice pot să străbată polul apical al nefrocitului și să constituie în cele din urmă, la nivelul lumenului, niște cilindri adipoși (aceștia nu au fost observați pe secțiunile renale investigate de noi). Dacă acțiunea nefrotoxică este brutală și/sau persistentă, leziunile devin ireversibile apărând necrobioza și necrozarea ulterioară a unor extinse suprafețe de epiteliu tubular [2, 15].

Se pare că tratamentul cu Nurofen induce o dismetabolie de tip glico-protidic, mai exact hialinoza. Localizarea materialului hialin este de obicei la nivelul nefrocitelor sub forma unor granule sferice, inițial bazofile, apoi, pe măsură ce evoluează, ele devin oxifile și pot dobândi dimensiuni de ordinul câtorva micrometri. Și granulele hialine pot evada prin polul apical contribuind la constituirea unor cilindri hialini [2] (așa cum s-a constatat și în cazul medicației cu Nurofen).

Afectarea aparatului de ultrafiltrare glomerulară intensifică apariția la nivelul tubilor uriniferi a cilindrilor fibrinoizi de natură proteică. Proteinuria masivă astfel instalată se încearcă a fi contracarată la nivelul tubilor contorți proximali printr-o intensificare a reabsorbției de proteine. Astfel se explică existența a numeroase vacuole apicale, imediat sub bordura de microvili a celulelor epitelului tubular, cunoscut fiind faptul că proteinele ce reușesc să treacă prin barieră filtrantă glomerulară și ajunse în urina primară ulterior pătrund în niște cripte localizate printre baza microvililor, formând la acest nivel invaginări tubulare apicale cu aspect veziculos, care apoi pătrund din ce în ce mai profund în citoplasma celulelor epiteliale și fuzionează, formând vacuole mai mari ca dimensiuni. Apoi, în mod normal, vacuolele fuzionează cu lizosomii și sub acțiunea enzimelor acestora proteinele conținute vor fi degradate până la stadiul de aminoacizi, sub care formă urmează a fi trecute în lumenul capilarelor peritubulare [17]. Din păcate, în condițiile tratamentului cu Nurofen se pare că proteinuria severă care apare ca urmare a perturbării ultrafiltrării glomerulare nu poate fi soluționată printr-o simplă intensificare a reabsorbției proteinelor în zona proximală a tubilor uriniferi, deși aspectul ultrastructural al polului apical al celulelor epiteliale reflectă un efort intens desfășurat în această direcție, întrucât la aceleași celule, se poate observa apariția unor modificări la nivelul polului bazal, materializate într-o dilatare a pliurilor parabazale concomitent cu balonizarea și dezorganizarea mitocondriilor adăpostite. Aceasta sugerează inducerea unei staze intracelulare prin perturbarea circuitului normal către capilarele peritubulare al proteinelor care au fost recuperate din urina primară.

Patologia nefronului indusă prin tratamentul cu Nurofen este posibil să fie corelată cu o nefrită interstițială limfohistiocitară tranzitorie clar decelabilă prin investigațiile de microscopie optică întreprinse în cadrul experimentului nostru. Această nefrită afectează nefronul în mod indirect și induce declanșarea unor procese de atrofiere, de distrofie și chiar de necroză zonale.

Procesele de necroză epitelială tubulară constatate în cadrul experimentului nostru afectează cu preponderență tubii contorți proximali din corticala renală și cuprind un număr moderat de tubi. Acolo unde se declanșează, ele evoluează progresiv, cu apariția la un moment dat a fenomenelor de stază urinară și obturarea lumenului tubilor cu trombi hialini rezultați în urma proceselor de necroză epitelială, care tind să ocupe întreg lumenul. În zona medulară, se înregistrează instalarea unei staze urinare avansate la nivelul porțiunii drepte a tubilor distali, cu compresia și atrofia epitelului tubular, procese care au o dispunere în focar. În plus, pot fi semnalate fenomene evidente de coagulare intravasculară diseminată.

Alături de componenta celulară renală (care se dovedește a fi cea mai sensibilă la acțiunea acestui antiinflamator), o sensibilitate moderată se remarcă și la nivelul componentei vasculare, atât în zona corticală, cât și în medulară, sensibilitate care se concretizează în instalarea unor tulburări de flux sanguin de tipul stazei și congestiei capilare, precum și a unor fenomene de coagulare intravasculară diseminată. Acestea au un caracter generalizat, fiind sesizate atât la nivelul glomerulului renal, cât și la nivelul rețelei capilare care irigă tubul urinifer. Conform datelor din literatură, coagularea intravasculară diseminată este un proces patologic destul de complex care implică participarea sistemului de coagulare sanguin și formarea de trombi în multe vase mici, cu instalarea unor alterări ischemice consecutive în diferite organe. Prezența cordoanelor de fibrină în vasele sanguine mici cauzează deformarea și lezarea hematiilor la trecerea lor prin rețeaua de fibrină intravasculară și, astfel, la organismele cu fenomene de coagulare intravasculară diseminată, apare, implicit, și o anemie hemolitică corelată cu prezența unor eritrocite anormale sub aspect morfologic – mai exact apare ceea ce se numește anemie hemolitică micro-angiopatică [8, 33].

De altfel, cercetările întreprinse de către *Stobbe și Hugel* [26] și *Glovicki și colab.* [13] au arătat că acest medicament, ca de altfel întreaga familie de produse farmaceutice căreia îi aparține, administrat în doze mari, induce leziuni structurale hematopoietice concentrate în principal asupra celulelor stem, ele având un caracter ireversibil și prognoze nefavorabile. Hematotoxicitatea ibuprofenului din Nurofen se manifestă în principal printr-o scădere a numărului de trombocite, scădere corelată cu o creștere a timpului de sângerare și coagulare și cu apariția destul de frecventă pe parcursul tratamentului a echimozelor tranzitorii. Ibuprofenul din Nurofen influențează sinteza și activitatea trombocitelor prin acțiunea sa asupra metabolismului acidului arahidonic (inhibă ciclooxygenaza și blochează tromboxan-sintetaza). Tratamentul cu Nurofen inhibă activarea trombocitelor (adezivitatea, agregarea, disponibilitatea factorului 3 plachetar, eliberarea factorului 4 plachetar și β -tromboglobulinei) și tinde să prevină formarea trombului în contact cu suprafețele străine organismului și, în condiții patologice, la nivelul vaselor sanguine. Efectul trombocitopenic al medicamentului, asociat cu iritația gastrointestinală, poate determina hemoragii digestive destul de severe uneori, ca urmare a perturbării proceselor hemostazei. În asociere cu cantități mari de alcool sau cu anticoagulantele orale și heparina, riscul de sângerare crește în mod deosebit [10]. De asemenea, se cunoaște că tulburările sanguine induse de Nurofen se mai pot materializa și în apariția unei anemii aplastice sau a anemiei imunohemolitice asociate trombocitopeniei [10, 26].

Potrivit cercetărilor în domeniu, există variații considerabile în ceea ce privește gradul în care coagularea intravasculară diseminată afectează diferitele organe. Ea poate avea un caracter destul de difuz, însă cel mai adesea afectează cu maximă severitate un anumit organ, de obicei rinichiul, dar câteodată și plămânul, creierul sau glandele suprarenale. Alterările renale induse de coagularea intravasculară diseminată sunt consecința obstrucției arteriolelor și anșelor capilare glomerulare cu trombi hialini. Totodată, fibrina circulantă nepolimerizată, precum și produșii de degradare ai fibrinei trec prin fenestrele capilarelor glomerulare și se agregă subendotelial, pe membrana bazală și pe mesangiu, conducând la îngroșarea membranei bazale și hiperplazia mesangială. Arteriolele aferente pot fi și ele penetrate de fibrină facilitând dezvoltarea unei necroze fibrinoide ce se poate extinde în întreg glomerulul vascular, cu apariția unor modificări focale proliferative și necrotice [1, 8, 33]. Subliniem că asemenea aspecte histopatologice de îngroșare a membranei bazale, de hiperplazie mesangială, de alterare structurală a glomerulului vascular renal și arteriolei aferente, pe fondul unor fenomene destul de extinse de coagulare intravasculară diseminată, în special în corticala renală, dar și în medulară, au fost sesizate și în condițiile tratamentului cu Nurofen realizat de noi, fără ca ele să fi fost semnalate în materialul bibliografic destul de bogat care a fost consultat în prealabil desfășurării acestui experiment. Ele confirmă și sublinează efectele destul de grave ale coagulării intravasculare diseminate indusă de Nurofen la nivel renal.

Concluzii. 1. Rezultatele investigațiilor structurale și ultrastructurale realizate în cadrul experimentului nostru sunt în deplină concordanță și, totodată, completează datele din literatură, confirmând că Nurofenul, administrat în doze terapeutice, zilnic, timp de 35 de zile, exercită o acțiune nefrotoxică moderată.

2. Efectul toxic renal devine deja decelabil atât electronomicroscopic cât și microscopo-optic după primele 10 zile de tratament, după care se accentuează progresiv și constant pe întreaga durată de administrare a medicamentului.

3. Acțiunea toxică a Nurofenului se concentrează preponderent asupra tubilor uriniferi, în principal în porțiunea lor contortă proximală, materializată în dezorganizarea structurală de intensitate diferită a celulelor epiteliului tubular (alterarea până la picnozare a nucleului, vacuolizarea citoplasmatică preponderent apical, apariția zonală a unor bogate depozite lipidice, creșterea numărului de lizosomi, balonizarea și dezorganizarea structurii mitocondriilor, dilatarea apicală a microvililor asociată zonal cu distrugerea parțială sau chiar totală a bordurii în perie, dilatarea pliurilor parabazale de la nivelul nefrocitelor).

4. Modificările induse la nivelul tubilor uriniferi au implicații profunde asupra proceselor de reabsorbție tubulară extrem de intense în porțiunea contortă și fundamentale pentru îndeplinirea funcției renale, cu posibile implicații asupra farmacocineticii și, implicit, asupra toxicității generale a Nurofenului.

5. Aparatul de ultrafiltrare glomerulară nu scapă atacului toxic al tratamentului cu acest antiinflamator, atac concretizat în inducerea unei staze sanguine la nivelul anșelor capilare glomerulare, a sclerozei zonale a arteriolei aferente, a îngroșării membranei bazale a foițelor capsulei Bowman și a edemației mesangiale intra- și extraglomerulare.

6. Patologia nefronului indusă de Nurofen se materializează și în apariția zonală a unor fenomene distrofice și chiar necrotice, posibil corelate cu nefrita interstițială limfohistiocitară tranzitorie, clar decelabilă prin investigațiile de microscopie optică întreprinse în cadrul experimentului nostru.

7. Nu doar componenta celulară, ci și cea vasculară renală se dovedește a fi sensibilă la această medicație antiinflamatorie nesteroidiană. Efectul toxic se exercită mai ales în zona corticală, dar este decelabilă și în medulară și se concretizează în instalarea unor tulburări ale fluxului sanguin de tipul stazei și congestiei vasculare, precum și a unor fenomene de coagulare intravasculară diseminată cu implicații extrem de profunde.

8. Procesele alterative și degenerative induse de Nurofen, deși semnificative, nu ating nici o amploare și nici o extindere care să îmbrace un caracter ireversibil, permițând desfășurarea unor procese regenerative renale naturale (în absența vreunei medicații protectoare și/sau regeneratoare), fapt clar demonstrat de aspectul structural și ultrastructural apropiat de cel al matorului înregistrat la lotul T₄.

BIBLIOGRAFIE

1. Anderson, J. R., *Muir's Textbook of Pathology*, 11th ed., Arnold, London, 1980.
2. Avram, N., Begnescu, R., Bucur, E., Ciocnitu, V., Lungeanu, A., Manolescu, N., Păltineanu, D., Păunescu, G., Știrbu, C., Voiculescu, I., *Citologie normală și patologică*, Ed. Ceres, București, 1980.
3. Baumgartner, H., Schwartz, H. A., Blum, W., Bruhin, A., Gallachi, G., Goldinger, G., Saxer, M., Trost, H., *Ibuprofen and diclofenac sodium in the treatment of osteoarthritis: a comparative trial of two once-daily sustained-release NSAIDs formulations*, "Curr. Med. Res. Opin.", **13**, 1996, 435-444.
4. Billigmann, P. W., *Tolerance of ibuprofen. Controlled drug monitoring for the detection of rare side effects*, "Fortschr. Med.", **109**, 1991, 213-216.
5. Brenda, S. W., *A Beginner's Handbook in Biological Transmission Electron Microscopy*, Butler & Tanner, London, 1981.
6. Brune, K., Beck, W. S., *Towards safer nonsteroidal anti-inflammatory drugs*, "Agents Actions", **32**, 1991, 13-25.
7. Bussan, M., *Update on ibuprofen*, "J. Int. Med. Res.", **14**, 1986, 53-62.
8. Chanarin, I., *The Megaloblastic Anaemias*, 2nd ed., p. 880-884, Blackwell, Oxford, 1979.
9. Davies, N. M., *Clinical pharmacokinetics of Nurofen. The first 30 years*, "Clin. Pharmacokinether.", **34**, 1998, 101-154.
10. Dobrescu, D., *Farmacoterapie practică*, vol. II, p. 133-145, Ed. Med., București, 1989.
11. Fackovcová, D., Kristová, V., Křísková, M., *Renal damage induced by the treatment with non-opioid analgesics - theoretical assumption or clinical significance*, "Bratisl. Lek. Listy", **101**, 2000, 417-422.
12. Farag, M. M., Mikhail, M., Shehata, R., Abdel-Meguid, E., Abdel-Tawab, S., *Assessment of gentamycin-induced nephrotoxicity in rats treated with low doses of ibuprofen and diclofenac sodium*, "Clin. Res.", **91**, 1996, 187-191.
13. Głowiczki, P., Hollier, L. H., Trastek, V. F., Kopesky, K. R., Kaye, M. P., *Quantitative evaluation of ibuprofen treatment on thrombogenicity of expanded polytetrafluoroethylene vascular grafts*, "Surgery", **95**, 1984, 160-168.

14. Jones, M. K., Wang, H., Peskar, B. M., Levin, E., Iani, R. M., Sarfeh, I. J., Tarnawski, A. S., *Inhibition of angiogenesis by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: insight into mechanisms and implications for cancer growth and ulcer healing*, "Nat. Med.", **5**, 1999, 1418-1423.
15. Jones, R. H., Tait, C. L., *Side-effects of NSAIDs in the community*, "Brit. J. Clin. Pract.", **49**, 2001, 67-70.
16. Kay, D., *Techniques for Electron Microscopy*, Alden & Mowbray, Oxford, 1967.
17. Leeson, C. R., Leeson, T. S., Papparo, A. A., *Textbook of Histology*, Saunders, Philadelphia, 1985.
18. Mann, J. F., Goerig, M., Brune, K., Luft, F. C., *Nurofen as an over-counter drug: is there a risk for renal injury?*, "Clin. Nephrol.", **39**, 1993, 1-6.
19. Max, M. B., Schaffer, S. C., Culnane, M., Dubner, R., Gracely, R. H., *Association of pain relief with drug side effects in postherpetic neuralgia: a single-dose study of clonidine, codeine, Nurofen, and placebo*, "Clin. Pharmacol. Ther.", **43**, 1988, 363-371.
20. McGettigan, P., Henry, D., *Current problems with non-specific COX inhibitors*, "Curr. Pharmacol. Res.", **6**, 2000, 1693-1724.
21. Muncie, H. L., Nasrallah, S. M., *Diflunisal and ibuprofen (nurofen): effects on gastric and duodenal mucosa in patients with osteoarthritis*, "Clin. Ther.", **11**, 2001, 539-544.
22. Mureșan, E., Găboreanu, M., Bogdan, A. T., Băba, A. I., *Tehnici de histologie normală și patologică*, Ed. Ceres, București, 1974.
23. Nielsen, D., *A study of naproxen and nurofen in patients with osteoarthritis seen in general practice*, "Curr. Med. Res.", **9**, 1984, 41-46.
24. Ploaie, P. G., Petre, Z., *Introducere în microscopia electronică cu aplicații în biologia celulară și moleculară*, Ed. Acad. Române, București, 1979.
25. Roy, S., *A double-blind comparison of a propionic acid derivative (nurofen) and a fenamate (mefenamic acid) in the treatment of dysmenorrhea*, "Obstet. Gynecol.", **61**, 1983, 628-632.
26. Stobbe, H., Hugel, W., *Hematotoxic lesions caused by non-steroidal antirheumatic agents*, "Arch. Surg.", **35**, 1980, 165-169.
27. Stratman, N. C., Carter, D. B., Sethy, V. H., *Nurofen: effect on inducible nitric oxide synthase*, "Brain Res.", **50**, 1997, 107-112.
28. Svendsen, K. B., Bech, J. N., Sorensen, T. B., Pedersen, E. B., *A comparison of the effects of etodolac and ibuprofen (nurofen) on renal haemodynamics, tubular functions, renin, vasopressin and urinary excretion of albumin and alpha-glutathione-S-transferase in healthy subjects: a placebo-controlled cross-over study*, "Eur. J. Clin. Pharmacol.", **65**, 2001, 483-488.
29. Tabeeva, G. R., Levin, I. I., Korotkova, S. B., Khanunov, I. G., *Treatment of fibromyalgia*, "Therapy", **48**, 1998, 516-518.
30. Thair, Q. A., Oshiro, E. M., Tamargo, R. J., *Inhibition of experimental vasospasm in rats with the periaortic administration of nurofen using controlled-release polymers*, "Stroke", **30**, 1999, 140-147.
31. Tvřizcka, E., Cvrckova, E., Maca, B., Jiraskova, M., *The effect of ibuprofen on the composition of tissue lipids in an experiment*, "Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.", **134**, 1995, 450-455.
32. VanOvermeire, B., Smets, K., Lecoutere, D., Vandebroek, H., Weyler, J., Degroote, K., Langhendries, J.P., *A comparison of ibuprofen and indomethacin for closure of patent ductus arteriosus*, "New Engl. J. Med.", **343**, 2000, 647-681.
33. Woodruff, H. J., Herrmann, R. P., *Concise Haematology*, 2nd ed., p. 208-212, Arnold, London, 1979.

COMPARISON OF THE PHYLLOSHERE MICROFLORA OF NARROW-LEAVED CATTAIL (*TYPHA ANGUSTIFOLIA*) PLANTS GROWN ON UNPOLLUTED AND POLLUTED SITES

JUDIT PAPP*

SUMMARY. – Microflora of leaf surfaces of narrow-leaved cattail plants grown in unpolluted and polluted habitats was studied. Total numbers of microorganisms were determined, the colonies were studied morphologically and the purified strains were identified using molecular biological techniques. There was a reduction in the number of microorganisms on polluted leaves in comparison to those collected from unpolluted site. The colony-forming microorganisms belong to different groups: yeasts, Gram-negative bacilli and coccobacilli, Gram-positive nonsporogenous and endospore-forming rod-shaped bacteria, actinomycetes and cocci. The species composition of microflora was very different in the phyllosphere of plants grown on unpolluted and polluted sites. The percentage of Gram-negative bacteria was higher in the case of unpolluted leaves, while on the leaf surfaces of polluted plants the predominant group was represented by Gram-positive bacilli and cocci.

The leaf surfaces of the healthy plants are colonised by a specific epiphytic microflora, composed mainly of bacteria, yeasts and filamentous fungi. The phyllosphere microflora plays various biological roles. The phyllosphere microorganisms fix atmospheric nitrogen, produce plant growth regulators and can control the plant parasites either by stimulating plants to synthesise phytoalexins or by producing antibacterial or antifungal compounds. Some phyllosphere bacteria, mainly *Pseudomonas* and *Erwinia* species, cause at low temperatures the frost injury of the plants, others degrade the cuticular waxes and determine the premature senescence of the plants [3, 4, 7, 8, 10, 12].

In some cases the phyllosphere microorganisms can synthesise different air contaminants, but they also have a major role in the metabolisation, transformation and neutralisation of various polluting agents.

The composition and diversity of the microbial populations colonising the leaf surfaces depend on different environmental factors, such as temperature, humidity and UV light, and also on the nature and amount of the nutrients leached on the foliar surfaces, plant species, age and physiological status of the host plant [7, 12, 13]. The presence of different pollutants in the environment also affects the structure and activity of the microbial communities. Therefore, any modification appeared in the microbial populations permits the evaluation of the pollution degree of the environment. The phyllosphere microorganisms could be utilised as bioindicators of the pollution with organic compounds as well as with heavy metals [1-5, 9].

* Babeş-Bolyai University, Department of Plant Biology, 3400 Cluj, Romania. E-mail: jpatta@bioge.ubbcluj.ro

The aim of our study was to investigate the effect of the contaminants on the composition, diversity and abundance of foliar communities of narrow-leaved cattail (*Typha angustifolia*), by comparison of the phyllosphere microflora of plants grown in unpolluted and polluted habitats, respectively.

Materials and methods. Leaves of *Typha angustifolia* were collected from plants grown on unpolluted and polluted sites. A foliar surface of 100 cm² was washed in 50 ml phosphate buffer and dilutions series from 10⁻¹ to 10⁻⁷ were prepared. The dilutions were inoculated in 15 replicates on different culture media: Tryptic Soy Agar (TSA), Potato Dextrose Agar (PDA) and an oligotrophic medium (R2A). The inoculated culture media were incubated at 28^oC for 10 days and the developed colonies were counted. The characteristic colonies were isolated in pure cultures on nutrient agar and were examined macroscopically and microscopically after Gram staining. After the morphological characterisation, representative strains from each morphological group were analysed for identification by molecular biological techniques.

Extraction of DNA from pure bacterial cultures. Cells from agar media (1-2 loopsful) were resuspended in 400 µl of sterile saline EDTA solution (150 mM NaCl – 10 mM EDTA, pH 8.0). Following addition of 10 µl lysozyme solution (10 mg/ml), tubes were incubated at 37^oC for 30 minutes. In a second step, 5 µl of proteinase K (10 mg/ml) and 10 µl sodium dodecylsulphate (25 weight/volume %) were added, followed by incubation at 60^oC for 30 minutes. DNA was extracted with 400 µl Tris/EDTA-phenol and 400 µl chloroform, using centrifugation at 14000 rpm and 4^oC for 10 minutes [11]. The extracted DNA was purified using the Prep-A-Gene kit (Biorad, Hercules Co.). Purified DNA was eluted in 50 µl HPLC water.

Amplification of 16S rDNA. Amplified 16S rDNA was obtained by PCR, using the following primers: 27 F (5' – AGAGTTTGATCCCTGGCTCAG – 3') and 1525 R (5' – AGAAAGGAGGTGAGCCAGCC – 3'). Two different reaction mixtures and programmes were used for the DNA amplification. For the reaction mixture containing 2.4 µl purified DNA, 8 µl dNTP (1.25 mM), 5 µl buffer solution, 0.5 µl primer 1: 27 F, 0.5 µl primer 2: 1525 R, 1 µl Pfu polymerase, 32.6 µl HPLC water, the following cycling programme was used: initial denaturation at 96^oC for 3 minutes, 36 rounds of denaturation at 94^oC for 30 seconds, annealing at 55^oC for 30 seconds, extension at 72^oC for 1 minute and a final extension at 72^oC for 7 minutes. For the other reaction mixture, composed of 2.4 µl purified DNA, 10 µl dNTP (1 mM), 10 µl buffer solution, 3 µl MgCl₂ (15 mM), 0.5 µl primer 1: 27 F, 0.5 µl primer 2: 1525 R, 1 µl Taq polymerase, 26.6 µl HPLC water, the cycling programme was as follows: initial denaturation at 98^oC for 3 minutes, 36 rounds of denaturation at 94^oC for 30 seconds, annealing at 52^oC for 30 seconds, extension at 72^oC for 1 minute and a final extension at 72^oC for 7 minutes.

The purification of PCR products was carried out using a Fermentas kit. The presence of the PCR products was monitored by 1% (weight/volume) agarose gel electrophoresis in TAE buffer at 100 V for 20 minutes. The PCR products were visualised under UV light and were stored at –20^oC.

Amplified rDNA restriction analysis (ARDRA). Two restriction enzymes (Taq I and Hin 6I) were selected for the restriction digestion of the amplified 16S rDNA. The reaction mixtures contain 2.5 µl buffer solution, 0.3 µl enzym, 7 µl purified PCR product and 15.2 µl HPLC water. The incubation of tubes was carried out at 37⁰C in case of Hin 6I and 65⁰C in case of Taq I for 3 hours. The restricted fragment length analysis was performed by 1.5 % agarose gel electrophoresis in TBE buffer at 80 V for 110 minutes. The ARDRA patterns were analysed under UV light.

Partial sequencing of DNA. Sequencing of amplified 16S rDNA was performed with automated laser fluorescent DNA sequencer. The sequencing reaction mixtures contain 2 µl ready reaction mix, 3 µl buffer solution (5x), 1 µl primer 531 R and 9 µl HPLC water.

For the identification of bacterial strains the obtained sequences were compared to the 16S rDNA entries available in public databases using the BLAST program (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

Results and discussion. The three culture media used permitted the development of different groups of bacteria and yeasts. On each culture medium the total number of microorganisms was higher in the phyllosphere of plants grown on unpolluted site than in that of plants grown on polluted site. The highest value in the case of unpolluted plants and the lowest value in the case of polluted plants were registered on the PDA medium (Fig. 1).

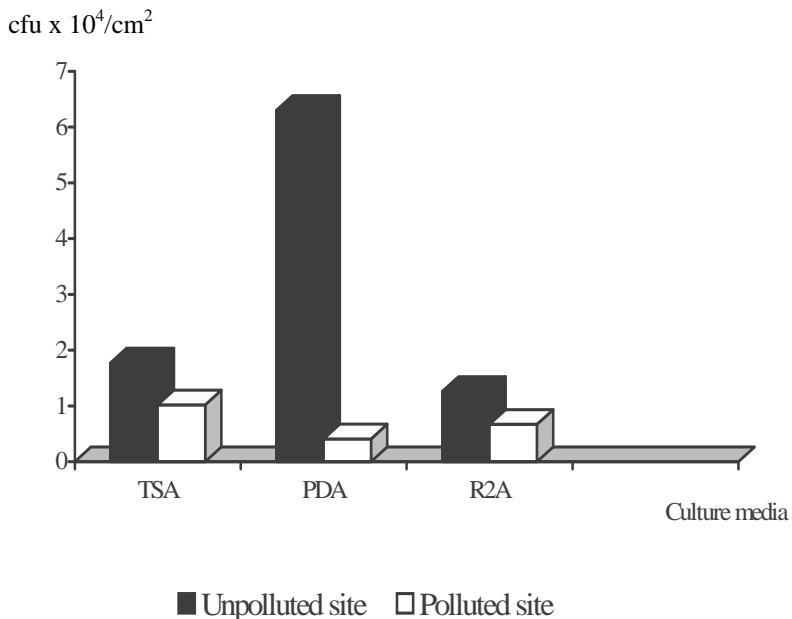


Fig. 1. Total number of microorganisms in the phyllosphere of *T. angustifolia*.

From the phyllosphere of plants grown in unpolluted and polluted habitats 51 and 34 strains, respectively, were isolated (Fig. 2). The most favourable medium for the isolation of microorganisms was found to be the TSA medium in the case of unpolluted leaves, but the oligotrophic R2A medium was better for the isolation of microorganisms colonising the polluted leaves.

The morphological and molecular characterisation of the isolated strains shows that these microorganisms belong to yeasts, Gram-negative bacilli and coccobacilli, Gram-positive nonsporogenous and endospore-forming rod-shaped bacteria, actinomycetes and cocci. The species composition of microflora is very different in the phyllosphere of plants grown on unpolluted and polluted sites, respectively (Table 1).

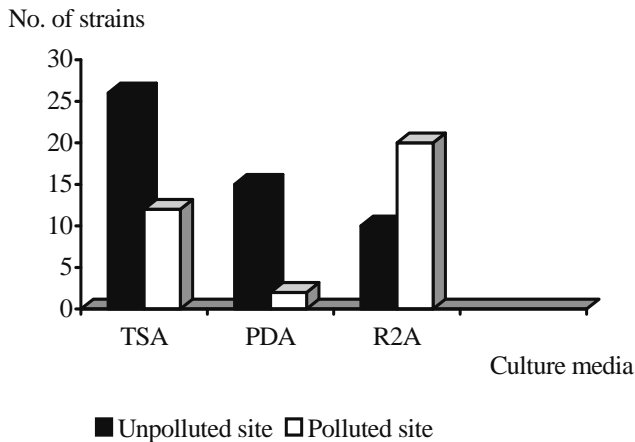


Fig. 2. Number of microbial strains isolated from the phyllosphere of *T. angustifolia*.

The yeasts belonging to *Cryptococcaceae* are present in the phyllosphere microflora in a percentage of 21.56 in case of plants grown on unpolluted place and in 3.22 % when the leaves were taken from plants growing on polluted place.

The percentage of Gram-negative bacteria is higher (54.89) in the phyllosphere of plants from unpolluted habitat, than on leaves originating from polluted place (45.14%), where the Gram-positive bacteria are the dominant microbial group, reaching 51.59%.

Bacteria belonging to the *Pseudomonas* species are predominant on both, unpolluted and polluted leaves. Some bacterial species (*Sphingomonas*, *Kocuria rhizophila*, *Staphylococcus epidermidis* and *Curtobacterium flaccumfaciens*) were detected only in the phyllosphere of the plants growing on unpolluted site, while *Psychrobacter* was isolated only from the foliar surfaces of plants from polluted place.

The nocardioform actinomycetes and the endospore-forming rod-shaped bacteria were detected in the foliar surfaces of polluted plants, whereas other actinomycetes were isolated only from the phyllosphere of unpolluted plants. The

Exiguobacterium species and the cocci were much better represented in the phyllosphere of the plants growing in polluted habitat, than in the phyllosphere of unpolluted plants.

Table 1

Distribution of microorganisms in the phyllosphere of plants grown on unpolluted and polluted places (%)

Microorganisms	Unpolluted plants	Polluted plants
Yeasts (<i>Cryptococcaceae</i>)	21.56	3.22
Gram-negative bacteria	54.89	45.14
<i>Pseudomonas</i> sp.	45.09	32.25
<i>Sphingomonas</i> sp.	3.92	-
<i>Psychrobacter</i> sp.	-	3.22
Gram-negative bacilli	5.88	6.45
Gram-negative coccobacilli	-	3.22
Gram-positive bacteria	23.52	51.59
<i>Kocuria rhizophila</i>	1.96	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1.96	-
<i>Exiguobacterium</i> sp.	1.96	19.35
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	9.80	-
Nocardioform actinomycetes	-	3.22
Other actinomycetes	1.96	-
Gram-positive endosporegenous bacilli	-	3.22
Gram-positive nonsporegenous bacilli	3.92	3.22
Gram-positive cocci	1.96	22.58

Our investigations showed that the environmental pollution influences the phyllospheric microflora in terms of total microbial number and diversity. The lower values of the total number of microorganisms, the reduction of the number of yeasts and the changes appeared in the species composition could be the consequence of the environmental pollution [4]. The increases occurred in the number of some Gram-positive bacteria, especially in that of cocci; the presence of endospore-forming bacteria could be explained by their capacity to tolerate the unfavourable environmental conditions [4, 6, 9]. This finding is consistent with other reports that suggest the use of phyllosphere microorganisms as indicators of environmental pollution [1, 4, 5].

Conclusions. 1. The phyllosphere microflora of *Typha angustifolia* comprised yeasts, Gram-negative bacilli and coccobacilli, Gram-positive nonsporegenous and endospore-forming rod-shaped bacteria, actinomycetes and cocci.

2. There is a reduction in the total number of microorganisms on the polluted leaves in comparison with unpolluted ones.

3. The species composition is different in the phyllosphere of plants grown on unpolluted and polluted sites, respectively.

4. In the phyllosphere of unpolluted plants the predominant group belongs to the Gram-negative bacteria, while the Gram-positive bacteria are predominant on the leaf surfaces of the plants growing on polluted place.

5. In the microflora of polluted leaves, the reduction in the percentage of yeasts is associated with increases in the number of cocci and endospore-forming bacteria.

REFERENCES

1. Andersen, G. L., Menkissoglou, O., Lindow, S. E., *Occurrence and properties of copper-tolerant strains of Pseudomonas syringae isolated from fruit trees in California*, "Phytopathology", **81**, 1991, 648-656.
2. Baldi, F., Bianco, M. A., Pepi, M., *Mercury, arsenic and boron resistant bacteria isolated from the phyllosphere of airborne pollution near geothermal plants*, "Sci. Total Environ.", **164**, 1995, 99-107.
3. Baldi, F., Parati, F., Semplici, F., Tandoi, V., *Biological removal of inorganic Hg(II) as gaseous elemental Hg(0) by continuous culture of a Hg-resistant Pseudomonas putida strain FB-1*, "World J. Microbiol. Biotechnol.", **9**, 1993, 275-279.
4. Brighigna, L., Gori, A., Gonelli, S., Favilli, F., *The influence of air pollution on the phyllosphere microflora composition of Tillandsia leaves (Bromeliaceae)*, "Rev. Biol. Trop.", **48** (2-3), 2000, 511-517.
5. Dowding, P., *Leaf yeasts as indicators of air pollution*, in Fokkema, N. J., Van Den Heuvel, J. (Eds.), *Microbiology of Phyllosphere*, pp. 121-136, Cambridge Univ. Press, Cambridge, 1986.
6. Kulicheva, N. N., Lysak, L. V., Kozhevin, P. A., Zvyagintsev, D. G., *Bakterii v pochve, opade i filloplane gorodskoi ekosistemy*, "Mikrobiologiya", **65**, 1996, 416-420.
7. Last, F. T., Warren, R. C., *Non-parasitic microbes colonizing green leaves: their form and functions*, "Endeavour", **31**, 1972, 143-150.
8. Lindow, S. E., *The role of bacterial ice nucleation in frost injury to plants*, "Annu. Rev. Phytopathol.", **21**, 1983, 363-384.
9. Papp, J., *Microorganismele izolate din fillosferă plantelor de ovăz crescute pe material de haldă de la o mină de plumb și zinc*, "Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Biol.", **46** (1-2), 1999, 179-187.
10. Pattantys, J., Kiss, S., *Contribution to study of phyllosphere microflora*, "Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Biol.", **36** (2), 1994, 97-103.
11. Rainey, F. A., Ward-Rainey, N. L., Janssen, Ph H., Hippe, H., Stackebrandt, E., *Clostridium paradoxum DSM7308^T contains multiple 16S rRNA genes with heterogeneous intervening sequences*, "Microbiology", **142**, 1996, 2087-2095.
12. Szabó, I. M., *A bioszféra mikrobiológiája*, Vol. 2, p. 1438; Vol. 3, pp. 2065-2080, Akad. Kiadó, Budapest, 1989.
13. Yang, C.-H., Crowley, D. E., Borneman, J., Keen, N. T., *Microbial phyllosphere populations are more complex than previously realized*, "Proc. Natl. Acad. Sci. USA", **98** (7), 2001, 3889-3894.

STUDII ASUPRA UNOR GRUPE ECOLOGICE DE BACTERII DIN LACUL DE ACUMULARE GILĂU - JUDEȚUL CLUJ

MANUELA-CLAUDIA LUMPERDEANU* și MIHAIL DRĂGAN-BULARDA**

SUMMARY. - Studies on Some Ecological Groups of Bacteria from the Gilău Dam Lake – Cluj County. The Gilău dam lake, the main role of which is to supply with drinking water the city of Cluj-Napoca and the nearby villages, belongs to the dam system of waterfalls located in the upper basin of the Someșul Mic river.

Based on the well-known key role played by the aquatic microorganisms in the mineralisation of organic residues and in transformation of some inorganic substances, we initiated studies on ten ecological groups of bacteria by analysing water and sediment samples taken from this dam lake. We determined the numbers of the following bacteria: ammonifying, nitrifying (nitrite- and nitrate-producing), denitrifying, aerobic and anaerobic sulphur-reducing, sulphur-oxidising, sulphate-reducing, iron-reducing and amyolytic bacteria. The samples (ten water and seven sediment ones) were taken from different places and depths seasonally (in April, June and October 2002).

Results of the analyses indicated that the number of bacteria from each ecological group varied depending on the sampling sites and season.

For a general characterisation of the bacteria living in the sediment, we estimated the bacterial indicator of sediment quality (BISQ). The highest BISQ values were obtained in samples collected in the peripheral and tail zones of the dam lake.

Lacul de acumulare Gilău, având ca rol principal asigurarea cu apă potabilă a municipiului Cluj-Napoca și a altor localități din jur, face parte din sistemul cascadă de acumulări amplasate în bazinul superior al râului Someșul Mic [10].

Microorganismele acvatice au un rol esențial în conversia substanțelor vegetale și animale în materie anorganică, prin procesele de mineralizare, care restituie organismelor fotosintetizante nutrienții esențiali pentru continuarea activității lor. Pe scară globală, acești produși fac parte din ciclurile biogeochimice, care asigură transformările și recircularea elementelor biogene (C, N, S, P, Fe, Mn) în natură [6, 8].

Studiul constă în determinarea numărului a 10 grupe ecofiziologice de bacterii implicate în recircularea diferitelor resturi organice, respectiv în transformarea unor substanțe minerale.

*Administrația Națională "Apele Române", Direcția Apelor Someș-Tisa, Str. Vânătorului nr.17, 3400 Cluj-Napoca, România. e-mail: manuela_claudia@yahoo.com

**Universitatea "Babeș-Bolyai", Facultatea de Biologie și Geologie, Catedra de Biologie Vegetală, Str. M. Kogălniceanu nr.1,3400 Cluj-Napoca, România. e-mail: draganb@bioge.ubbcluj.ro

Materiale și metode. În cursul anului 2002, s-au realizat 3 campanii sezoniere de recoltare (aprilie, iunie și octombrie), în cadrul fiecăreia fiind prelevate 10 probe de apă și 7 probe de sediment.

Probele de apă s-au prelevat de la suprafață și de la diferite adâncimi, punctele de recoltare fiind următoarele: Someș Rece–amonte lac, Someș Cald–amonte lac, Baraj–0 m, Baraj–3 m, Baraj–6 m, Baraj–adâncime maximă, Mijloc lac–0 m, Mijloc lac–adâncime maximă, Coadă lac–0 m și Coadă lac–adâncime maximă.

Probele de sediment au fost prelevate de la adâncimea de 0-10 cm, din următoarele puncte de recoltare: Baraj–mijloc, Baraj–mal drept, Baraj–mal stâng, Mijloc lac–mijloc, Mijloc lac–mal drept, Mijloc lac–mal stâng și Coadă lac–mijloc.

Pentru determinarea numărului bacteriilor din cele 10 grupe ecofiziologice (bacterii amonificatoare, nitrificatoare, denitrificatoare, sulf-reducătoare aerobe, sulf-oxidante, sulf-reducătoare anaerobe, sulfat-reducătoare anaerobe, fier-reducătoare și amilolitice) atât din apa cât și din sedimentul lacului de acumulare Gilău s-au utilizat medii nutritive electivă și metodele de lucru descrise de C u ș a [4] și D r ă g a n-B u l a r d a [5].

În vederea obținerii numărului celui mai probabil de bacterii am utilizat metoda tuburilor multiple, în cadrul căreia am efectuat diluții până la ordinul 10^{-5} (pentru probele de apă) și 10^{-7} (pentru probele de sediment). Creșterea culturilor s-a obținut prin inocularea mediului de cultură cu 1 ml diluție de apă, respectiv cu 1 ml diluție de sediment. Incubarea s-a efectuat la termostat la temperatura de 22°C pentru toate grupele de bacterii studiate.

Datorită faptului că diferite categorii de sediment pot avea un conținut variabil de apă, care ar influența exprimarea încărcării microbiene raportate la greutatea sedimentului, s-a procedat la determinarea umidității fiecărei probe de sediment în paralel cu pregătirea lor pentru analiză [4].

Calcularea indicatorului bacterian al calității sedimentului (IBCS) s-a efectuat după M u n t e a n [9], utilizând următoarea formulă:

$$IBCS = \frac{1}{n} \cdot \sum \log_{10} N,$$

unde: IBCS = indicatorul bacterian al calității sedimentului; n = numărul grupelor ecofiziologice; N = numărul de bacterii aparținând fiecărui grup ecofiziologic.

Rezultate și discuții. Datele privind distribuția cantitativă a bacteriilor studiate sunt prezentate în Tabelele 1 și 2, respectiv în Fig. 1-8.

Activitatea bacteriilor amonificatoare. Materia organică provenită prin moartea organismelor este parțial degradată în masa apei (structurile ușor asimilabile), cele mai intense procese desfășurându-se în sedimente. În urma proteolizei rezultă peptide și aminoacizi cu masă moleculară mai mică, care prin dezaminare, realizată de către bacteriile amonificatoare, eliberează amoniac. La acest proces participă microorganismele din microbiota constantă a apelor și sedimentelor (*Bacillus*, *Pseudomonas*, actinobacterii). Amoniacul urmează calea oxidărilor bacteriene, efectuate de grupul nitrit- și nitrat-bacterii, în procesul de nitrificare [4].

Tabel 1

Numărul bacteriilor din apa lacului de acumulare Gilău
(număr cel mai probabil/ml apă)

Grupul ecologic	Data prelevării	Locul prelevării									
		Someș Rece amonte lac	Someș Cald amonte lac	Baraj-0 m	Baraj-3 m	Baraj-6 m	Baraj ad. maximă	Mijloc lac 0 m	Mijloc lac ad. maximă	Coadă lac 0 m	Coadă lac ad. maximă
Bacterii amonificatoare	Aprilie	780	680	400	450	910	1000	600	1100	780	1400
	Iunie	1100	910	600	780	920	1200	800	1400	910	1600
	Octombrie	2300	1700	10000	12000	21000	38000	8200	22000	9200	17000
Nitrit-bacterii	Aprilie	6400	5800	22000	17000	7000	5500	14000	8400	21000	9500
	Iunie	9500	7600	28000	22000	11000	7400	21000	12000	18000	11000
	Octombrie	6100	4000	20000	15000	14000	1800	8200	400	10000	4000
Nitrat-bacterii	Aprilie	8400	7600	28000	22000	9500	9200	18000	11000	25000	12000
	Iunie	12000	9500	36000	28000	14000	11000	25000	15000	25000	18000
	Octombrie	8200	6100	20000	17000	17000	1800	8100	200	12000	4000
Bacterii denitrificatoare	Aprilie	2100	980	2400	2600	3800	5200	1200	3300	1100	2800
	Iunie	3900	1700	4700	9500	15000	25000	4500	14000	3900	17000
	Octombrie	3300	1400	4000	7000	12000	21000	1700	11000	2700	22000
Bacterii sulf-reducătoare aerobe	Aprilie	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Iunie	0	0	0	0	0	2100	0	3300	0	4900
	Octombrie	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacterii sulf-oxidante Thiobacillus	Aprilie	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Iunie	0	0	0	0	0	1700	0	2700	0	3300
	Octombrie	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacterii sulf-reducătoare anaerobe	Aprilie	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Iunie	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Octombrie	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacterii sulfat-reducătoare anaerobe	Aprilie	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Iunie	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Octombrie	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacterii fier-reducătoare	Aprilie	130000	110000	23000	49000	70000	130000	47000	170000	40000	350000
	Iunie	1700000	2200000	330000	700000	1100000	1700000	540000	2200000	470000	5400000
	Octombrie	220000	170000	49000	110000	130000	220000	62000	350000	54000	160000
Bacterii amilolitice	Aprilie	9	4	15	11	18	84	12	33	8	18
	Iunie	20	14	21	22	28	91	19	44	24	34
	Octombrie	15	9	15	16	23	85	17	38	13	28

În profilul vertical al apei, numărul bacteriilor amonificatoare a crescut, în general, de la suprafață spre adâncime, rămânând la limita de zeci de mii de bacterii. Acest fapt este explicat prin „ploaia biologică” (rămășițele organismelor moarte) din straturile trofogenice spre zonele de adâncime ale lacului [3, 7], ceea ce demonstrează existența unor cantități mari de substrat particulat azotat [6].

Tabel 2

Numărul bacteriilor din sedimentul lacului de acumulare Gilău
(număr cel mai probabil/g sediment uscat)

Grupul ecologic	Data prelevării	Locul prelevării						
		Baraj mijloc	Baraj mal drept	Baraj mal stâng	Mijloc lac mijloc	Mijloc lac mal drept	Mijloc lac mal stâng	Coadă lac mijloc
Bacterii amonificatoare	Aprilie	48	227	182	68	210	144	203
	Iunie	74	274	216	87	242	202	238
Nitrit-bacterii	Octombrie	74	5439	1725	257	4142	1498	1802
	Aprilie	117	249	225	157	273	216	182
Nitrat-bacterii	Iunie	151	661	335	122	341	176	192
	Octombrie	89	150	132	99	153	129	159
Bacterii denitrificatoare	Aprilie	149	324	225	123	326	268	182
	Iunie	187	867	465	156	396	329	238
Bacterii sulf-reducătoare aerobe	Octombrie	100	230	134	88	229	150	138
	Aprilie	212	756	524	191	336	268	417
Bacterii sulf-oxidante-Thiobacillus	Iunie	3564	41040	23760	4329	23100	14840	20340
	Octombrie	2916	32200	18870	3531	19620	11770	14840
Bacterii sulf-reducătoare anaerobe	Aprilie	466	7560	5243	426	6720	4738	10165
	Iunie	529	7980	5292	366	3080	2544	12430
Bacterii sulfat-reducătoare anaerobe	Octombrie	756	12650	7770	214	3488	2996	97520
	Aprilie	678	7560	5243	493	3675	3605	25680
Bacterii fier-reducătoare	Iunie	756	12540	7560	555	3520	2968	103960
	Octombrie	1026	16100	12210	428	3924	3852	169600
Bacterii fier-reducătoare anaerobe	Aprilie	72	291	118	102	220	175	139
	Iunie	151	445	227	156	352	276	192
Bacterii fier-reducătoare anaerobe	Octombrie	1060	3800	1890	1290	2830	2250	1380
	Aprilie	104	357	289	157	273	175	257
Bacterii fier-reducătoare anaerobe	Iunie	151	513	421	222	429	244	351
	Octombrie	1300	4490	3670	1819	3488	2247	2968
Bacterii fier-reducătoare anaerobe	Aprilie	3498	99360	37450	5488	96600	24720	11770
	Iunie	5292	182400	58320	7770	176000	37100	15820
Bacterii amilolitice	Octombrie	75600	1840000	1021200	139100	1744000	577800	190800
	Aprilie	9791	11772	10070	9240	8663	8910	10754
Bacterii amilolitice	Iunie	16632	25251	16956	16650	21945	15794	18080
	Octombrie	10800	18975	10900	9523	15097	9898	11554

În sediment, aceste bacterii au înregistrat valori de ordinul miilor de bacterii, cele mai ridicate valori înregistrându-se în secțiunile de la periferie și de la coada lacului. Se apreciază că în zonele de la periferia lacului există surse care pot contribui la poluarea lacului cu substanțe organice și nitrați.

O caracteristică generală a acestui grup o prezintă dezvoltarea explozivă în sezonul de toamnă.

Activitatea bacteriilor nitrificatoare. Creșteri mai semnificative ale bacteriilor nitrificatoare (nitrit- și nitrat-bacterii) s-au înregistrat în secțiunile de la suprafața apei și în sediment.

Nitrificarea, prin care amoniacul sau alte forme reduse de azot sunt oxidate la nitrat, este produsul activității bacteriilor aerobe, chemolitotrofe specifice și se realizează în 2 etape: nitritarea (oxidarea amoniacului la nitriți, proces instabil efectuat de nitrit-bacterii de tip *Nitrosomonas*, *Nitrococcus*) și nitratarea. În ecosistemele acvatice în care abundă substanțele organice, oxidarea azotului nu se mai realizează pe cale autotrofă, ci heterotrofă (excesul de substanță organică este toxic pentru bacteriile nitrificatoare autotrofe). Azotații rezultați sunt preluați de către plante [4].

Activitatea bacteriilor denitrificatoare. Pe baza analizelor efectuate, s-a constatat că procesul de denitrificare a avut o evoluție sezonieră, cu maxime vara și toamna, mai ales în sediment. Bacteriile denitrificatoare, fiind anaerobe, au o activitate mai intensă la nivelul bentosului [6]. Numărul lor atinge valori mai ridicate toamna, fapt datorat depunerilor detritice. În sediment, cele mai mari valori s-au înregistrat în zonele periferice și la coada lacului.

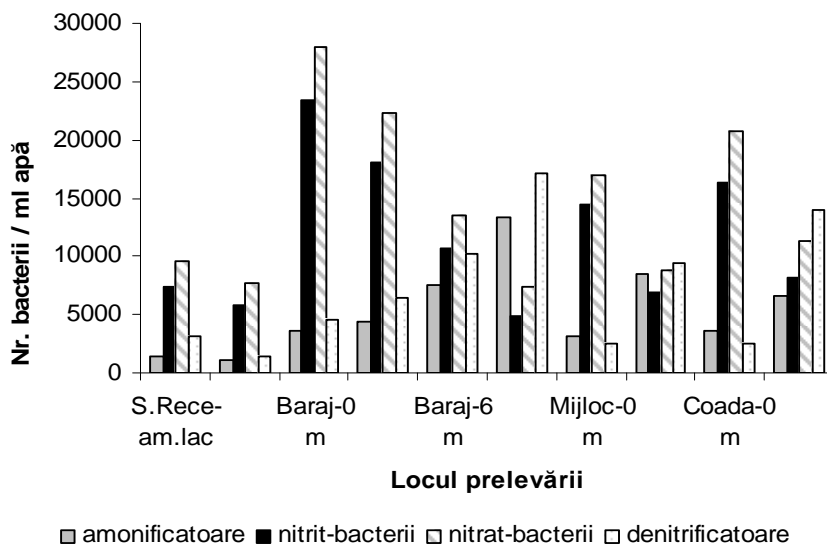


Fig. 1. Reprezentarea bacteriilor implicate în circuitul azotului în apa lacului de acumulare Gilău.

Valorile medii reprezentate în Fig. 1 sugerează creșterea numărului de bacterii amonificatoare odată cu adâncimea. În ceea ce privește bacteriile nitrificatoare (nitrit- și nitrat-bacterii) valori maxime s-au înregistrat în secțiunile de la suprafața apei, iar bacteriile denitrificatoare, fiind anaerobe, au avut o activitate mai intensă în special în secțiunile de adâncime a apei.

Denitrificarea este procesul de reducere dezasimilatorie anaerobă prin care bacteriile denitrificatoare reduc nitrati până la N_2 , NO_2^- sau NH_3 . O sporire a cantității de NO_2^- produsă prin temporizarea etapelor denitrificării (blocarea enzimatică) ar putea crea condiții nefavorabile ecosistemelor, prin acumularea de NO_2^- toxic [4].

În Fig. 2 se observă că bacteriile denitrificatoare, fiind anaerobe, au o activitate mai intensă în sediment-comparativ cu bacteriile amonificatoare și nitrificatoare, valorile medii fiind maxime în zonele periferice și la coada lacului.

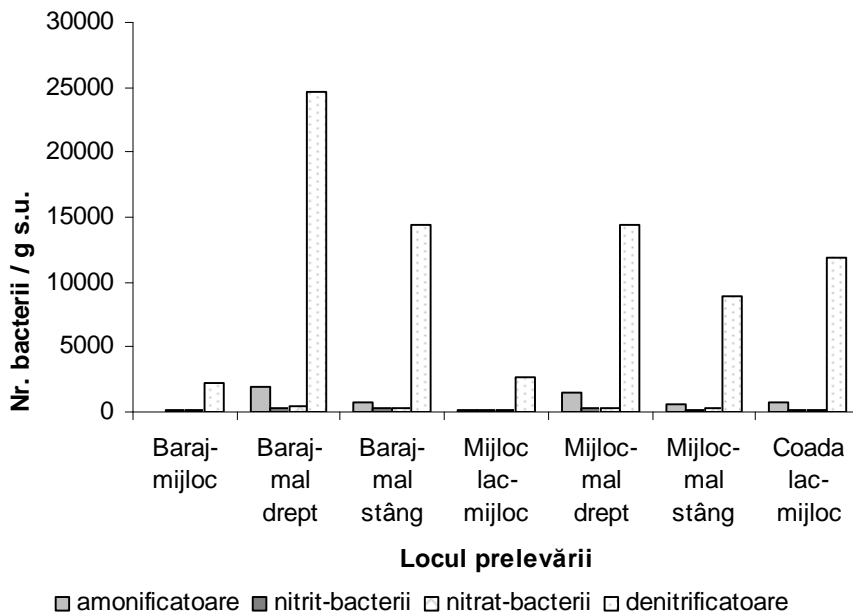


Fig. 2. Reprezentarea bacteriilor implicate în circuitul azotului în sedimentul lacului de acumulare Gilău (g s.u. = gram sediment uscat).

Activitatea bacteriilor sulf-reducătoare aerobe și anaerobe. Aceste bacterii descompun proteinele și aminoacizii cu sulf (metionină, cisteină), eliberând hidrogen sulfurat pe cale aerobă și anaerobă. Marea parte a acestui circuit este sedimentară [4].

În urma analizelor efectuate s-a observat că numai bacteriile sulf-reducătoare aerobe au putut fi evidențiate din apă, în secțiunile prelevate de la adâncime. În sediment, cele două tipuri de bacterii sunt mai bine dezvoltate, prezentând valori mari în zonele periferice și la coada lacului.

Activitatea bacteriilor sulf-oxidante-Thiobacillus. Aceste bacterii au fost identificate numai în probele de apă prelevate de la adâncime. În sediment, s-au înregistrat valori mai mari mai ales în zonele de la periferie și de la coada lacului.

Bacteriile sulf-oxidante oxidează H_2S în sulfați, permițând refolosirea sulfului de către producători. Ultima fază a ciclului sulfului este în întregime sedimentară. Ea implică precipitarea acestui element, în condiții anaerobe, în prezența fierului, sub formă de sulfură de fier, de culoare neagră, caracteristică, ducând în final la acumulări lente și continue de sulf în sedimentele profunde. De altfel, sedimentele reprezintă principala rezervă de sulf din biosferă. Acumulările de substanțe sulfuroase

din sedimente pot constitui un pericol pentru viața organismelor aerobe din ecosistemele acvatice, în condițiile în care predomină procesele de descompunere anaerobă cu degajări mari de H_2S (fermentări anaerobe și fenomene de putrefacție) [4].

Activitatea bacteriilor sulfat-reducătoare anaerobe-Desulfovibrio. În profilul vertical al apei nu s-a observat prezența acestor bacterii. În sediment, valori maxime s-au înregistrat în zonele de la periferie și de la coada lacului [1, 3, 7].

Această categorie de bacterii anaerobe, heterotrofe, din genul *Desulfovibrio* eliberează H_2S din sulfați pe care îi utilizează ca acceptori de hidrogen, pentru activitățile lor metabolice. Straturile negre întâlnite în condiții naturale pe fundul unor mări, lacuri sau în urma poluării antropice, sunt bogate în microorganisme sulfat-reducătoare, capabile să supraviețuiască în condiții total anaerobe [4].

Bacteriile sulfat-reducătoare sunt larg răspândite în majoritatea mediilor terestre și acvatice anaerobe în care au loc descompuneri microbiene ale substanțelor organice de natură vegetală și animală (soluri saturate cu apă, mlaștini, sedimente, nămol, lacuri saline și hipersaline). Reducerea masivă a sulfaților în natură rezultă totdeauna din activitatea bacteriilor sulfat-reducătoare și este evidentă în stadiul penultim al poluării organice masive a mediului.

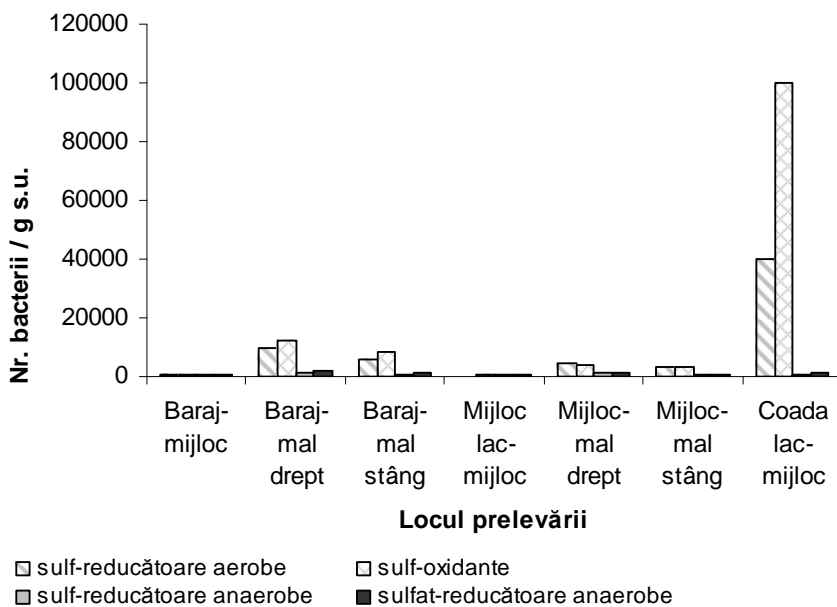


Fig. 3. Reprezentarea bacteriilor implicate în ciclul sulfului în sedimentul lacului de acumulare Gilău.

Pe baza valorilor medii reprezentate în Fig. 3 se observă o dezvoltare mai accentuată a bacteriilor sulf-reducătoare aerobe și sulf-oxidante, care au înregistrat valori maxime în zonele periferice și la coada lacului.

Dezvoltarea masivă a acestor bacterii în aceste medii devenite anaerobe este asociată cu o mortalitate a peștilor și a altor organisme acvatice datorită acumulării în concentrații mari a H_2S , gaz cu efecte toxice asupra diferitelor organisme acvatice [11].

Activitatea bacteriilor fier-reducătoare. Bacteriile fier-reducătoare sunt responsabile pentru reducerea fierului și crearea unui potențial oxido-reducător scăzut în mediu [2].

În profilul vertical al apei se observă o evoluție crescătoare a bacteriilor fier-reducătoare odată cu adâncimea, mai ales vara.

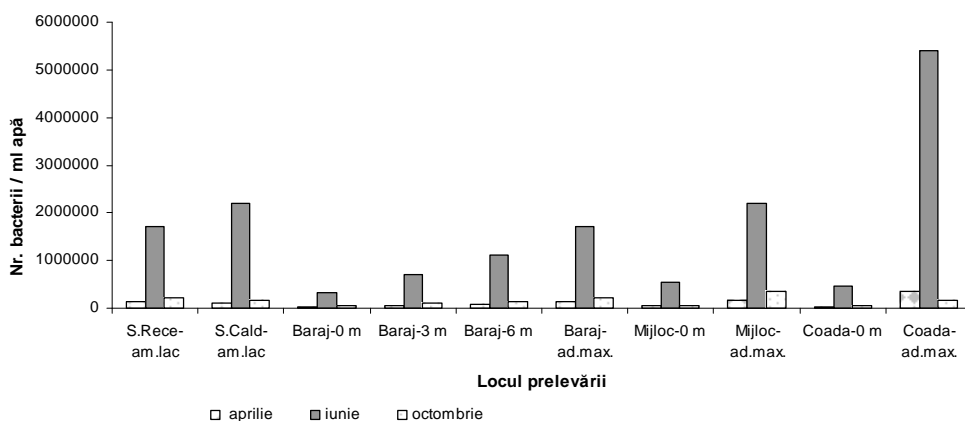


Fig. 4. Reprezentarea bacteriilor fier-reducătoare din apa lacului de acumulare Gilău.

În sediment, bacteriile fier-reducătoare sunt foarte bine reprezentate înregistrând valori maxime în zonele de la periferie și de la coada lacului.

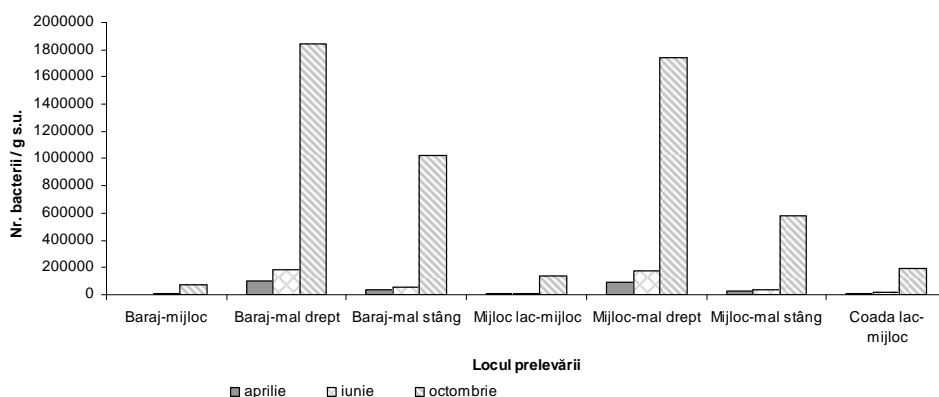


Fig. 5. Reprezentarea bacteriilor fier-reducătoare din sedimentul lacului de acumulare Gilău.

Activitatea bacteriilor amilolitice. Bacteriile amilolitice hidrolizează amidonul, compus ușor degradabil, la dextrine, cu ajutorul enzimei extracelulare amilaza [11].

Dinamica crescută a bacteriilor amilolitice se datorește atât faptului că un număr de microorganisme posedă amilaza, cât și permanenței surse de producere a amidonului: alge planctonice cu succesiuni rapide, macrofite submerse [4].

În Fig. 6 se poate observa că în masa apei, valorile înregistrate au fost mici și au crescut odată cu adâncimea.

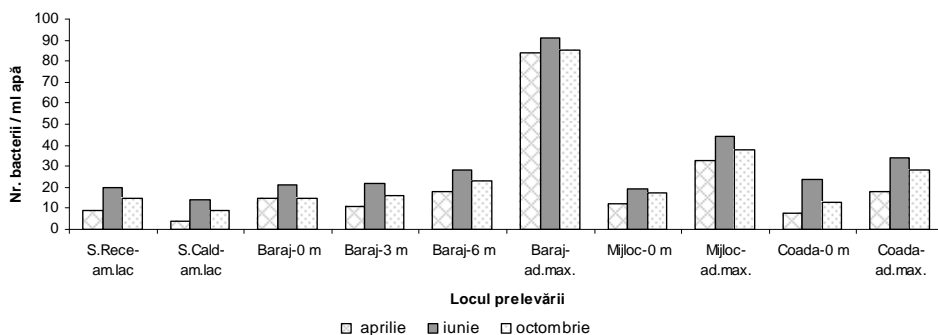


Fig. 6. Reprezentarea bacteriilor amilolitice din apa lacului de acumulare Gilău.

Prezența acestor germeni în apa lacului este direct determinată de existența substratului specific produs de activitatea fitoplanctonului [3, 7]. Marea majoritate a germinilor amilolitici sunt puternic implicați în circuitul carbonului în ecosistemul acvatic [1].

În sediment, valorile medii înregistrate au fost mai mari, în special în zonele periferice și de la coada lacului.

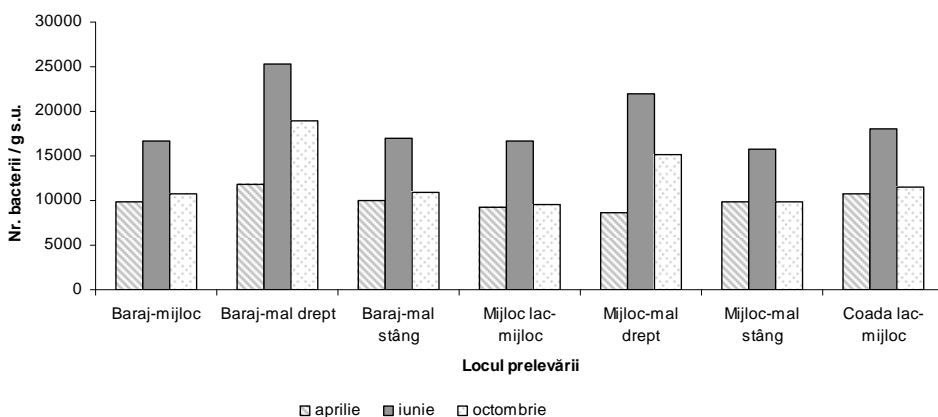


Fig. 7. Reprezentarea bacteriilor amilolitice din sedimentul lacului de acumulare Gilău.

Pentru estimarea calității biologice a sedimentului lacului de acumulare Gilău s-a calculat indicatorul bacterian al calității sedimentului (IBCS) [9]. S-a constatat că indicatorul bacterian al calității sedimentului a prezentat valori maxime în zonele de la periferie și de la coada lacului.

Valorile indicatorilor bacterieni ai calității apreciază cu siguranță abundența bacteriană și potențialul microbial al apei și sedimentului din lac.

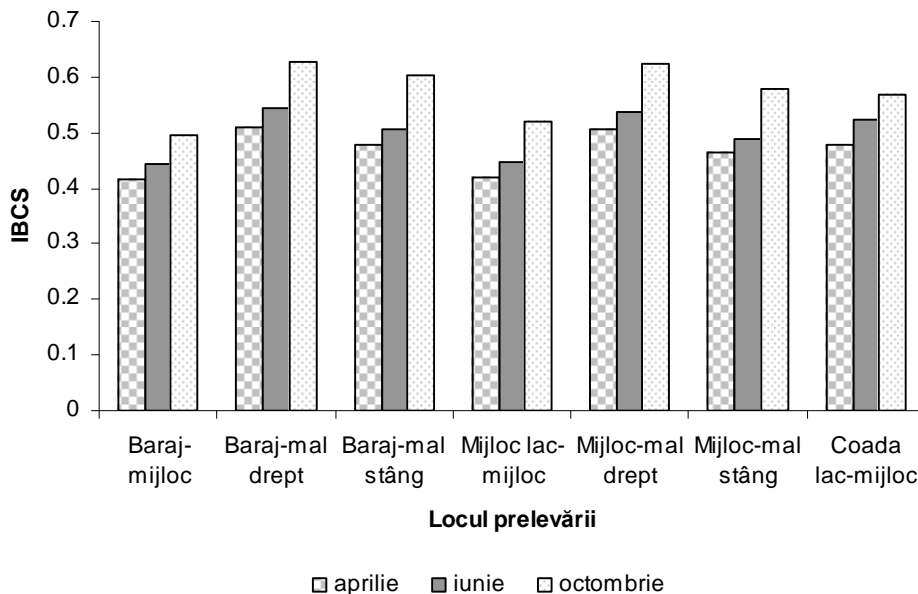


Fig. 8. Reprezentarea indicatorului bacterian al calității sedimentului lacului de acumulare Gilău.

Concluzii. 1. Este evidentă o creștere a densității numerice a bacteriilor *amonificatoare* toamna, în secțiunile de adâncime a apei și în sediment în zonele periferice și la coada lacului, în funcție de accesibilitatea la materialul organic azotos. Aceste creșteri s-ar putea datora acumulării de material detritic de proveniență vegetală sau animală (sau de poluanți organici rezultați din deversări).

2. Creșteri mai semnificative ale bacteriilor *nitrișitoare* (nitrit- și nitrat-bacterii) s-au observat mai ales primăvara și vara, valori maxime înregistrându-se în secțiunile de la suprafața apei și în sediment.

3. Procesul de denitrificare a avut o evoluție sezonieră, cu maxime vara și toamna, mai ales în sediment. Bacteriile *denitrișitoare*, fiind anaerobe, au o activitate mai intensă la nivelul bentosului.

4. Bacteriile aerobe implicate în circuitul sulfului (*sulf-reducătoare aerobe și sulf-oxidante*) au fost prezente în sediment, iar în apă numai în probele prelevate de la adâncime. Bacteriile anaerobe implicate în circuitul sulfului (*sulf-reducătoare anaerobe și sulfat-reducătoare anaerobe*) au fost evidențiate numai în sediment.

5. Cantitativ, bacteriile *fier-reducătoare* au fost bine reprezentate atât în apa cât și în sedimentul lacului de acumulare Gilău, mai ales toamna.

6. Limitele largi de variație a bacteriilor *amilolitice* au fost în raport cu dezvoltarea explozivă a algelor în perioada de vară și a celorlalte componente vegetale, care sunt furnizorii unor cantități importante de substanțe amidonate.

7. Indicatorul bacterian al calității sedimentului a prezentat valori maxime în zonele de la periferie și de la coada lacului. Explicația pentru creșterea evoluției potențialului microbial în sezonul cald constă în contribuția substanțială a materiei organice sedimentate vara și toamna, ca un rezultat al dezvoltării biotei specifice în lac. Materia organică stimulează dezvoltarea microbiotei bente, în special a bacteriilor heterotrofe aerobe implicate în mineralizare.

BIBLIOGRAFIE

1. Ailiese, O., Jâpa, F., *Microbiological characteristics of the Vaduri dam lake in the natural conditions and under the influence of salmonid aquaculture*, "An. Ști. Univ. Al.I.Cuza, Iași", **41**(II), 1995, 97-104.
2. Ailiese, O., Jâpa, F., Nimițan, E., Duncă, S., *Aspects of the microbiological iron cycle in the Bicaz dam lake*, "An. Ști. Univ. Al.I.Cuza, Iași", **44** (II), 1999, 167-170.
3. Ailiese, O., Nimițan, E., Jâpa, F., Duncă, S., *Ecology of some bacterial populations in the Șerbănești dam lake*, "An. Ști. Univ. Al.I.Cuza, Iași", **44** (II), 1998, 163-175.
4. Cușă, V., *Instrucțiuni metodologice pentru analiza microbiologică a sedimentelor din ecosistemele acvatice*, Inst. Cercet. Ing. Mediului, București, **4**, 1996, 14-20.
5. Drăgan-Bularda, M., *Lucrări practice de microbiologie generală*, p.175-180, Univ. Babeș-Bolyai, Cluj-Napoca, 2000.
6. Herlea, V., Lazăr, V., Canja, D., Ciolac-Russu, A., Popescu, V., *Caracterizarea unor aspecte ale diversității microbiotei râului Prahova, cu implicație în biodegradarea poluanților deversaji*, "An. Univ. București", **44**, 1995, 77-88.
7. Jâpa, F., Ailiese, O., *The quantitative distribution of the main ecophysiological groups of bacteria involved in the biogenic elements cycle from the Siriu lake*, "An. Ști. Univ. Al.I.Cuza, Iași", **45** (II), 1999, 161-166.
8. Millea, L., C., Drăgan-Bularda, M., Lengyel, J., Muntean, V., *Studiul bacteriologic al unor probe de ape din orașul Aiud*, "Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Biol.", **38** (1-2), 1993, 111-117.
9. Muntean, V., *Bacterial indicator of mud quality*, "Contrib. Bot." (Cluj-Napoca), 1995-1996, 73-76.
- 10.*** *Regulamente de exploatare a lacurilor*, Direcția Apelor Someș-Tisa, Cluj, 2002.
11. Stoica, E., Drăgan-Bularda, M., Kuever, J., *The presence of sulphate-reducing bacteria in the bottom sediments of the Romanian Black Sea area*, "Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Biol.", **47** (2), 2002, 59-71.

RECENZII - BOOK REVIEWS

Leonida Calancea, **Nitrați, nitriți și nitrosamine. Protecția mediului și sănătatea** (*Nitrates, Nitrites and Nitrosamines. Environmental Protection and Health*), Casa Cărții de Știință, Cluj-Napoca, 2002, 236 pages with 61 tables and 42 figures in the text.

The book is structured into four parts, comprising 15 chapters. First of all, we specify their titles.

Part I: Origin and Dynamics of Nitrates in the Nature. Chapter 1: The nitrogen cycle. Chapter 2: Biological fixation of the molecular nitrogen. Chapter 3: Ammonification. Chapter 4: Nitrification. Chapter 5: Factors influencing the dynamics of nitrification. Chapter 6: Factors influencing the mobility and leaching of nitrates. Chapter 7: Denitrification. Chapter 8: Influence of the intensification of agriculture on the regime of soil nitrates.

Part II: Monitoring of the Nitrification Process. Chapter 9: Chemical control of nitrification.

Part III: The Nitrates and the Plant. Chapter 10: Structure and functions of the cell. Uptake of nitrates and of other nutrients. Photosynthesis and interactions between C and N in plants. Chapter 11: Content of nitrates and nitrites in vegetal and animal products.

Part IV: Effects of Nitrates, Nitrites and Nitrosamines on the Health of Humans and Animals. Chapter 12: Implications of nitrates and nitrites in the health of humans and animals. Chapter 13: Hemoglobin and methemoglobin. Chapter 14: Nitrosamines and health. Chapter 15: Content of nitrosamines in vegetal and animal products.

Even this list of part and chapter titles indicates that Professor Leonida Calancea's book presents much interest for a broad circle of readers, including students and experts in chemistry, biology, agriculture, environmental technology, and also for decision makers in problems of environmental protection. The book is a useful source of information also for manufacturers of nitrogen fertilisers.

Last but not least, the book was elaborated based on a very rich literature (456 books, reviews, original papers and patents cited). At the same time, this book may be considered a valuable contribution to further enrichment of the world literature on agrochemistry, biology and ecology of nitrogen.

STEFAN KISS

Iustinian Petrescu (Editor), **Mediul – Cercetare, Protecție și Gestiune** (*Environment – Research, Protection and Management*), Editura Presa Universitară Clujeană, Colecția Environment and Progress, Cluj-Napoca, 2003, 567 pagini, inclusiv 137 tabele și 241 figuri.

Volumul, apărut sub îngrijirea Profesorului univ. dr. Iustinian Petrescu de la Departamentul de Geologie al Facultății de Biologie și Geologie, din Universitatea “Babeș-Bolyai”, cuprinde lucrările prezentate la Simpozionul ce a avut loc în 25-26 octombrie 2002 și reprezintă cu adevărat o realizare de prestigiu în viața științifică a Universității clujene, întrunind specialiști din diferite domenii ale științei având cel puțin în parte preocupări legate de mediul înconjurător. Tematica simpozionului desfășurat conform următoarelor secțiuni: I. Cercetarea, protecția și gestiunea mediului industrial; II. Agricultura și modificările mediului; III. Cercetarea și protejarea biosistemelor terestre și acvatice; IV. Dreptul și economia mediului. Politici de mediu. Administrația publică și mediul; V. Mediul și sănătatea publică; VI. Arii protejate. Paleomedii; VII. Mediul și educația. Metodologii. Miscellanea, a suscitat interes din partea specialiștilor biologi, geografi, geologi, chimiști, fizicieni, ingineri, dar și economiști, juriști, toți deopotrivă fiind animați de dorința de a-și aduce contribuția la această problematică vastă legată de mediul în care trăim, cu lucrări de un specific propriu domeniului în care activează.

Cele 105 lucrări științifice cuprinse în volum, din care 5 ale cercetătorilor din străinătate, aduc informații din multe ra-

muri științifice, toate având însă tangență cu mediul ambiant. De la lucrări cu tematică de poluare, prin metale grele, ape reziduale, lucrări de forare pentru gaz metan, la cele de ecologia și protecția mediului, respectiv de impact asupra mediului, toate prezintă interes științific major, stârnind atenția cercetătorului versat și ancorat în cunoașterea multiplelor aspecte legate de acest domeniu complex al mediului. Se aduc multe informații valoroase în legătură cu impactul procesării materiilor prime asupra mediului, referitoare la refacerea ecologică a solurilor poluate, la bioremedierea solurilor rezultate în urma activităților miniere, la poluarea industrială și prevenirea acesteia, la monitorizarea poluării unor râuri, la revalorificarea unor materiale din steril ca materii prime, precum și multe altele ce nu pot fi cuprinse în acest spațiu. Nu se poate a nu fi amintite cercetări cum ar fi impactul construcțiilor asupra mediului, protecția mediului și dreptul, implementările sistemelor de management de mediu în organizațiile românești, auditul de mediu și rolul acestuia, politica comunitară europeană privind mediul, care își fac tot mai simțită prezența în literatura științifică actuală privind mediul înconjurător. În ansamblul său volumul se constituie ca un material prețios la îndemâna oricărui specialist ce are ca scop protecția mediului, respectiv a cititorului instruit (jurnalist, politician etc.), devenind o carte de vizită pentru preocupările programatice ale noii facultăți de Știința mediului ce-și deschide porțile în 2003, la Universitatea “Babeș-Bolyai”.

MIHAIL DRĂGAN-BULARDA