

**STUDIA
UNIVERSITATIS BABEŞ-BOLYAI**

BIOLOGIA

2

1992

CLUJ-NAPOCA

REDACTOR ŞEF: Acad. prof. I. HAIDUC

REDACTORI ŞEFI ADJUNCTI: Prof. A. MAGYARI, prof. A. MARGA, prof. I. A. RUS

COMITETUL DE REDACȚIE AL SERIEI BIOLOGIE: Prof. N. COMAN, prof. S. KISS (redactor coordonator), prof. I. POP, prof. N. TOMESCU, conf. M. DRĂGAN-BULARDA (secretar de redacție), conf. C. TARBA, cercet. st. I. G. RACOVITA

STUDIA UNIVERSITATIS BABEŞ-BOLYAI

BIOLOGIA

2

R e d a c ț i a : 3400 CLUJ-NAPOCA, str. M. Kogălniceanu, 1 • Telefon 11 61 01

SUMAR — C O N T E N T S — S O M M A I R E — I N H A L T

| | |
|--|----|
| A. RASIGA, L. Ș. PÉTERFI, L. MOMEU, Structura comunităților de diatomee din râul Someșu Rece, Transilvania, România • Structure of Diatom Communities in the Someșu Rece River, Transylvania, Romania | 3 |
| I. POPOVICI, Nematodes as Indicators of Ecosystem Disturbance Due to Pollution | |
| T. CEUCA, <i>Mastigophorophyllum saxonicum</i> Verh., 1910 in Munții Apuseni • <i>Mastigophorophyllum saxonicum</i> Verh., 1910 in the Apuseni Mountains | 15 |
| N. TOMESCU, S. ACCOLA, Postembryonic Development of <i>Trachelipus difficilis rotundatus</i> (<i>Crustacea, Isopoda</i>) | 29 |
| N. TOMESCU, S. ACCOLA, C. BERCIU, Reproduction of Terrestrial Isopods of Cheile Turzii Natural Reservation (Romania) | 33 |
| E. KESSLER, Review of the Neogene Waterfowl (<i>Aves: Anatidae</i>) of Eastern Paratethys | 39 |
| M. DRĂGAN-BULARDA, S. KISS, D. PAȘCA, R. CRIȘAN, V. MUNTEAN, E. MANOLACHE Cultivarea masivă a tulpinilor bacteriene producătoare de levan necesar pentru inducerea sintezei levanazei • Massive Cultivation of Bacterial Strains Producing Levan Necessary for Induction of Levanase Synthesis | 47 |
| M. DRĂGAN-BULARDA, S. KISS, D. PAȘCA, R. CRIȘAN, E. MANOLACHE, V. MUNTEAN, Izolări de microorganisme producătoare de levanază și dextranază • Isolation of Microorganisms Producing Levanase and Dextransanase | 55 |
| V. MUNTEAN, Analiza bacteriologică a nămolurilor din lacurile saline Ursu și Negru de la Sovata • Bacteriological Analysis of Muds from the Salt Lakes Ursu and Negru in Sovata | 61 |
| L. NEDELCU, M. SAFTA, Activitatea biologică a unor noi fungicide românești • Biological Activity of Some New Romanian Fungicides | 65 |
| C. DELIU, A. NICOARĂ, C. MUNTEANU-DELIU, V. BERCEA, M. KEUL, D. TÎRNOVEANU, Studiul unor procese fiziologice la două linii celulare de <i>Berberis parvifolia</i> Sprague • Study of Some Physiological Processes in Two Cell Lines of <i>Berberis parvifolia</i> Sprague | 71 |
| M. ZĂPÎRTAN, <i>In Vitro</i> Tuberization in Some Potato Cultivars | 77 |
| V. MICLĂUȘ, T. LECHINTĂN, V. MICLĂUȘ, G. MARIN, Contribuții la studierea compoziției humusului din unele soluri ale României • Contributions to the Study of Humus Components in Some Soils of Romania | 85 |
| | 91 |

| | |
|--|-----|
| M. SIMIHAIAN, S. KISS, D. PAŞCA; C. SUCIU; Testing of Some Synthetic Derivatives of L-Glutamic Acid as Inhibitors of Soil Urease Activity | 99 |
| S. KISS, D. PAŞCA, M. DRĂGAN-BULARDĂ, R. CRİŞAN, V. MUNTEAN, Enzymological Evaluation of the Efficiency of the Measures Applied for Biological Recultivation of Lead and Zinc Mine Spoils | 103 |
| Recenzii — Book Reviews — Comptes Rendus — Buchbesprechungen | |
| R. J. Chróst (Editor), <i>Microbial Enzymes in Aquatic Environments</i> (S. KISS) | 109 |
| S. Wirth, Entwicklung und Anwendung neuer Methoden zur Bestimmung von Enzymaktivitäten und zum Nachweis mikrobieller Populationsdichte der Horizontabfolge einer saueren Braunerde unter Buehe (S. KISS) | 109 |
| G. Asplund, On the Origin of Organohalogens Found in the Environment (S. KISS) | 110 |

STRUCTURA COMUNITĂȚILOR DE DIATOMEE DIN RÂUL SOMEȘU RECE, TRANSILVANIA, ROMÂNIA

ANA RASIGA*, LEONTIN S. PETERFI** și LAURA MOMEU*

SUMMARY. — Structure of Diatom Communities in the Someșu Rece River, Transylvania, Romania. The present paper deals with the structure and pattern of diatom communities of the Someșu Rece river between Blăjoaia and the Someșu Rece village. The pattern of frequency distribution has been described by employing truncated normal curves. Differences at the level of algal communities (sites) have been tested by cluster analysis using the floristic similarity index of Sørensen, as well as by computing species diversity (Shannon-Weiner) and relative information as the measure of coenotic stability of communities. According to the present findings, communities in all sites are of \pm natural pattern, the algal flora consisting mostly of oligo- and β -mesosaprobic forms. The floristic diversity and coenotic stability exhibit an increasing tendency from the upper site (Blăjoaia) towards the lowest one (Someșu Rece village).

Comunitățile de diatomee din râurile Transilvaniei, în general, au fost relativ puțin studiate, astfel că literatura de specialitate din acest domeniu este săracă. Dintre lucrările publicate, o parte sunt exclusiv floristice [12—14]. Mai recent, Momeu și colab. [5] au prezentat mai pe larg organizarea comunităților naturale de diatomee bentonice din Crișul Repede, aplicând metode matematice de prelucrare a informației; aceiași autori (Péterfi și Momeu) au urmărit instalarea și evoluția comunităților de diatomee epilitice din râul Arieș în perioada vernală [10], cât și influența poluării asupra acestora [11]. În ceea ce privește râul Someș, până în prezent nu există publicații care să semnaleze cercetări în domeniu.

Ne propunem ca prezenta lucrare să fie începutul unei serii, în care să înfățișăm comparativ compoziția floristică și organizarea comunităților de diatomee bentonice din întreg bazinul Someșului.

În lucrarea de față publicăm rezultatele studiului efectuat în Someșul Rece.

Descrierea fizico-geografică a biotopului [1]. Râul Someșu Rece izvorăște de sub Vârful Runcului (1.609 m) (Culmea Balomiresei) din Masivul Bihor al Munților Apuseni. Cursul său, alături de Someșul Cald, este situat între Munțele Mare și Munții Gilăului (componente ale Masivului Bihor), având o înclinație a pantei cuprinsă între 30 și 50 m/km. Defileul Someșului Rece este săpat în sâmburele granitic al M-ților Gilăului, care din punct de vedere structural reprezintă un vechi bloc cristalin, regenerat în timpul orogenezelor alpine. Bazinul său, cu o suprafață de 296 km², este situat la o altitudine medie de 1.220 m s.m. Debitul mediu multianual al apei (determinat în punctul „la uzină”, alt. 451 m s.m., în perioada 1940—1964) era de 4,67 m³. s⁻¹; debitul maxim se înregistrează în luna aprilie, la topirea zăpezii. Alimentarea râului este de tip pluvio-nival, regiunea

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

** Universitatea Babeș-Bolyai, Catedra de biologie vegetală, 3400 Cluj-Napoca, România

fiind umedă, cu precipitații abundente. Apele râului sunt reci, cu temperatura medie multianuală (determinată în aceeași perioadă și în același punct) de 7,3°C, valoarea medie lunară pentru luna mai (1961) fiind de 7,6°C.

Din punct de vedere chimic, apele râului fac parte din așa-numitul „raion al sîsturilor cristaline și al rocilor eruptive“. Ele sunt slab mineralizate și aparțin clasei apelor bicarbonatațe din grupa calciului. Căteva date privind chimismul apei (vizând perioada 1958–1964): conținut în O_2 8,4–17,5 mg. l⁻¹; pH 6,6–8,4, rezidu f.x 10–492 mg.l⁻¹; mineralizare 172 mg.l⁻¹ (în ape mari) și 229 mg.l⁻¹ (în ape mici); duritate 25°dH (ape foarte moi).

Material și metodă. S-au studiat comunitățile de diatomee bentonice din 5 stațiuni (vezi Tabelul 1) situate de-a lungul râului, între Someșu Rece-sat și Blăjoiaia, colectate în luna mai 1993. Probele s-au prelevat prin răzuire de pe suprafața substraturilor solide (pietre, fragmente de ramuri, obiecte) din albia râului căi și din material vegetal aflat în apă; ele au fost conservate în formol 4%. Pentru îndepărțarea materialului organic, eșantioanele au fost tratate la rece cu acid azotic conc.; după spălare repetată, fructulele s-au montat în colofoniu.

Pentru caracterizarea calitativă și cantitativă a populațiilor de diatomee, preparatele au fost examineate cu ajutorul obiectivului de imersie (Planachromat HI 100×1,30), efectuându-se determinările de rigoare și numărători de cel puțin 2.300 indivizi per probă. Frevența fiecărei specii s-a exprimat ca probabilitate de apariție.

Structura comunităților s-a descris folosindu-se modelul curbei normale trunchiata a lui Patrick și colab. [8].

Afinitatea floristică între comunitățile din cele 5 stațiuni s-a testat cu ajutorul indexului de similaritate Sørensen, obținându-se cladograma de grupare a speciilor, după modelul lui Mountford [6].

Aprecierea stabilității cenotice a comunităților s-a realizat conform funcției Shannon—Weiner [9], în care informația relativă (sensu Caneleada Fonseca [2, 3]), ca măsură a stabilității cenotice, este raportul dintre informația reală (diversitate specifică) și cea maximă (diversitate maximă sau entropie). Detalii privind metodele indicate se pot găsi în sursele bibliografice citate.

Rezultate și discuții. În cele 5 puncte de colectare s-au identificat un număr total de 125 specii și varietăți de diatomee (Tabel 1). Datele din tabel (cifrele reprezentă probabilitatea de apariție a speciilor) oglindesc modificarea treptată a structurii calitative și cantitative relative a comunităților de diatomee dinspre portiunea superioară a cursului apei, către cea inferioară. Astfel, în punctele situate mai sus pe firul apei apar specii caracteristice biotopurilor de ape curgătoare curate și repezi de munte (*Meridion circulare*, *Hannaea arcus*, *Diatoma anceps*, *Stauroneis kriegeri*, *Diatoma hiemale* var. *mesodon*). Aceasta din urmă domină în comunitățile primelor trei puncte. Alături de aceasta există, în cantități semnificative, specii larg răspândite în apele dulci (*Achnanthes*, *Navicula*, *Fragilaria*, *Synedra*, precum și *Cocconeis placentula*) și mai puține specii de *Cymbella*, *Gomphonema* și *Nitzschia*. Prezența unor specii de *Eunotia* și *Pinnularia*, caracteristice apelor mai mult sau mai puțin acide, cu conținut mineral scăzut, se poate explica prin antrenarea lor din înmlăștinirile adiacente râului, existente în regiunile superioare. Aceeași constatare este valabilă și pentru *Tabellaria flocculosa*, *Navicula variostriata*, *N. contenta* și altele, specii care apar în unele probe, dar cu frecvență redusă.

În punctul de colectare nr. 4 (localizat mai jos pe cursul apei) dominantă devine *Hannaea arcus*, alături de *Cymbella minuta*, codominantă. Cu număr mare de indivizi apar *Cymbella silesiaca* și *Nitzschia communis*. Speciile de *Nitzschia*, în general, devin mai frecvente.

Tabel 1

Probabilitatea de apariție a speciilor de diatomă identificate în Someșu Rece

| Nr. crt. | Specia | Puncte de colectare | | | | | |
|-------------|--|---------------------|----------------|------------------------|----------------|-----------------|------------------------------|
| | | aval (1) | Blăjoia (2) | amonte baraj (3) | Răcătău (4) | la uzină (5) | amonte Someșu Rece-sat(5) |
| 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | |
| 1. | <i>Melosira italica</i> var. <i>subarctica</i> | 0,00021 | — | — | — | — | — |
| 2. | <i>M. distans</i> | 0,00208 | — | — | 0,00514 | 0,00336 | — |
| 3. | <i>M. varians</i> | 0,00146 | — | — | — | — | — |
| 4. | <i>Cyclotella kützingiana</i> | 0,00021 | — | — | — | — | — |
| 5. | <i>Tabellaria flocculosa</i> | 0,00115 | 0,00125 | — | — | — | — |
| 6. | <i>Meridion circulare</i> | 0,00469 | 0,00585 | 0,00865 | 0,00437 | 0,00027 | — |
| 7. | <i>Diatoma anceps</i> | 0,00010 | — | — | — | — | — |
| 8. | <i>D. hiemale</i> var. <i>mesodon</i> | 0,57499 | 0,65873 | 0,45563 | 0,00514 | 0,00222 | — |
| 9. | <i>D. vulgare</i> | 0,00010 | 0,00376 | 0,01639 | 0,00583 | 0,32655 | — |
| 10. | <i>Fragilaria capucina</i> | 0,00021 | — | — | — | 0,00007 | — |
| 11. | <i>F. construens</i> | 0,01407 | 0,00042 | 0,00761 | 0,00058 | 0,00369 | — |
| 12. | <i>F. inflata</i> | — | — | 0,00052 | — | 0,00047 | — |
| 13. | <i>F. leptostauron</i> | 0,00042 | — | 0,00019 | — | — | — |
| 14. | <i>F. pinnata</i> | 0,00146 | 0,00083 | 0,00013 | 0,00019 | — | — |
| 15. | <i>F. virescens</i> | 0,00094 | 0,00083 | — | 0,00019 | 0,00128 | — |
| 16. | <i>Hannaea arcus</i> | 0,10349 | 0,09941 | 0,07774 | 0,16208 | 0,25134 | — |
| 17. | <i>Synedra rumpens</i> | 0,00823 | 0,01086 | 0,00410 | 0,00925 | 0,00772 | — |
| 18. | <i>S. ulna</i> | 0,00021 | 0,00125 | 0,00319 | 0,01401 | 0,05291 | — |
| 19. | <i>S. vaucheriae</i> | 0,00229 | 0,01336 | 0,02810 | 0,03942 | 0,02485 | — |
| 20. | <i>Asterionella formosa</i> | 0,00010 | 0,00125 | — | — | — | — |
| 21. | <i>Eunotia curvata</i> | — | — | 0,00013 | — | — | — |
| 22. | <i>E. exigua</i> | — | — | 0,00006 | — | — | — |
| 23. | <i>E. pectinalis</i> | 0,00333 | — | 0,00013 | — | — | — |
| 24. | <i>E. petpusilla</i> | 0,00021 | 0,00042 | — | — | — | — |
| 25. | <i>E. sudetica</i> | 0,00021 | — | — | 0,00006 | 0,00007 | — |
| 26. | <i>E. tenella</i> | 0,00333 | 0,00125 | 0,00006 | — | — | — |
| 27. | <i>Cocconeis pediculus</i> | — | — | — | 0,00032 | 0,00107 | — |
| 28. | <i>C. placentula</i> | 0,00938 | 0,01044 | 0,01769 | 0,00302 | 0,00678 | — |

| 0 | 1 | 2 | 3 |
|-----|--|---------|---------|
| 29. | <i>Achbanthes clevei</i> | — | — |
| 30. | <i>A. deflexa</i> | — | 0,00752 |
| 31. | <i>A. exigua</i> | — | — |
| 32. | <i>A. grimmiei</i> | — | — |
| 33. | <i>A. lanceolata</i> | 0,04325 | 0,02422 |
| 34. | <i>A. minutissima</i> | 0,06086 | 0,02464 |
| 35. | <i>A. pinnata</i> | 0,02251 | 0,00752 |
| 36. | <i>A. saxonica</i> | — | 0,00042 |
| 37. | <i>Rhoicosphaenia curvata</i> | — | — |
| 38. | <i>Diploneis elliptica</i> | — | — |
| 39. | <i>D. oblongella</i> | — | — |
| 40. | <i>Frustulia vulgaris</i> | — | — |
| 41. | <i>Anomoeoneis brachysira</i> | — | — |
| 42. | <i>Stauroneis kriegerii</i> | 0,00010 | — |
| 43. | <i>S. phoenicenteron</i> | 0,00021 | — |
| 44. | <i>S. smithi</i> | — | — |
| 45. | <i>Navicula cincta</i> | — | — |
| 46. | <i>N. contenta</i> | — | — |
| 47. | <i>N. cuspidata</i> | 0,00010 | — |
| 48. | <i>N. cryptocephala</i> | 0,00125 | — |
| 49. | <i>N. cryptotenella</i> | 0,00292 | 0,00251 |
| 50. | <i>N. decussis</i> | — | — |
| 51. | <i>N. elginensis</i> | — | 0,00042 |
| 52. | <i>N. gallica</i> var. <i>perpusilla</i> | — | — |
| 53. | <i>N. iusociabilis</i> | — | — |
| 54. | <i>N. lanceolata</i> | 0,00938 | 0,00125 |
| 55. | <i>N. lapidosa</i> | 0,00062 | 0,00209 |
| 56. | <i>N. medioconvexa</i> | 0,00010 | — |
| 57. | <i>N. minima</i> | 0,00208 | 0,00292 |
| 58. | <i>N. minuscula</i> | 0,00333 | 0,00301 |
| 59. | <i>N. mutica</i> | 0,00021 | 0,00083 |
| 60. | <i>N. pelliculosa</i> | — | — |
| 61. | <i>N. pseudobryophila</i> | — | — |
| 62. | <i>N. pseudoscutiformis</i> | 0,00010 | — |
| 63. | <i>N. pupula</i> | 0,00031 | — |
| 64. | <i>N. rhynchocephala</i> | 0,00031 | 0,00042 |

Tabel 1 (continuare)

6

| 4 | 5 | 6 |
|---------|---------|---------|
| 0,00013 | | |
| 0,02095 | 0,03374 | 0,08024 |
| 0,00013 | | |
| 0,00052 | | |
| 0,01106 | 0,00347 | 0,00228 |
| 0,05113 | 0,02404 | 0,01632 |
| 0,00039 | 0,00019 | |
| — | | |
| 0,00111 | 0,00103 | 0,00034 |
| 0,00013 | | |
| 0,00019 | | 0,00043 |
| 0,00013 | 0,00019 | 0,00033 |
| 0,00006 | | |
| — | | |
| 0,00058 | 0,00006 | |
| 0,00006 | | |
| 0,00195 | 0,00006 | 0,00020 |
| 0,00013 | | |
| — | | |
| 0,00299 | 0,00148 | 0,00349 |
| 0,00137 | 0,00630 | 0,00933 |
| — | 0,00100 | 0,00034 |
| 0,00032 | | 0,00007 |
| 0,00006 | | |
| 0,00013 | | |
| 0,00032 | 0,02886 | 0,04163 |
| 0,00455 | 0,00123 | 0,00013 |
| — | | |
| 0,00026 | 0,00141 | 0,00167 |
| 0,02908 | 0,08876 | 0,00436 |
| 0,00606 | | |
| 0,00013 | 0,00431 | |
| 0,00116 | | |
| — | | |
| 0,00111 | 0,00013 | 0,00007 |
| — | 0,00019 | 0,00040 |

TABELA 1
A. RÄSÄKÄ, E. S. PERIFERI, E. MÖKKU

Tabel 1 (continuare)

| 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|------|-----------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 65. | <i>N. subatomoides</i> | 0,02574 | 0,00626 | 0,01340 | 0,00019 | 0,00013 |
| 66. | <i>N. subminuscula</i> | — | — | 0,00006 | — | — |
| 67. | <i>N. subrhynchocephala</i> | 0,00083 | — | 0,00338 | 0,09094 | 0,00980 |
| 68. | <i>N. tenelloides</i> | — | — | 0,01314 | 0,00019 | — |
| 69. | <i>N. tripunctata</i> | 0,00010 | — | 0,00046 | — | 0,00034 |
| 70. | <i>N. variostriata</i> | 0,00010 | — | — | — | — |
| 71. | <i>Pinnularia borealis</i> | 0,00156 | — | — | — | — |
| 72. | <i>P. gibba</i> | — | — | — | 0,00006 | — |
| 73. | <i>P. mesolepta</i> | 0,00010 | — | 0,00143 | — | 0,00007 |
| 74. | <i>P. microstauron</i> | 0,00042 | — | 0,00078 | — | 0,00007 |
| 75. | <i>P. nodosa</i> | — | — | 0,00013 | — | — |
| 76. | <i>P. subcapitata</i> | 0,00365 | 0,00167 | 0,00078 | — | 0,00007 |
| 77. | <i>P. viridis</i> | 0,00104 | 0,00125 | 0,00032 | — | 0,00013 |
| 78. | <i>Neidium affine</i> | — | — | 0,00019 | — | — |
| 79. | <i>N. bisulcatum</i> | 0,00021 | — | 0,00052 | — | — |
| 80. | <i>Caloneis amphisbaena</i> | — | — | — | — | 0,00007 |
| 81. | <i>C. ventricosa</i> | — | — | — | — | 0,00007 |
| 82. | <i>Gyrosigma nodiferum</i> | — | — | — | — | 0,00027 |
| 83. | <i>G. spenceri</i> | — | — | — | — | 0,00007 |
| 84. | <i>Amphora libyca</i> | — | — | — | — | 0,00013 |
| 85. | <i>A. ovalis</i> | — | — | 0,00039 | — | 0,00007 |
| 86. | <i>A. o. var. pediculus</i> | 0,00010 | — | — | — | — |
| 87. | <i>A. perpusilla</i> | — | — | 0,00124 | 0,00148 | 0,00215 |
| 88. | <i>A. veneta</i> | — | — | — | — | 0,00013 |
| 89. | <i>Cymbella affinis</i> | — | — | 0,00006 | — | 0,00081 |
| 90. | <i>C. amphicephala</i> | 0,00021 | — | — | — | — |
| 91. | <i>C. cistula</i> | — | 0,00042 | 0,00013 | 0,00026 | 0,00215 |
| 92. | <i>C. cymbiformis</i> | 0,00010 | — | — | — | 0,00007 |
| 93. | <i>C. helvetica</i> | 0,00042 | 0,00083 | 0,00091 | 0,01202 | 0,00357 |
| 94. | <i>C. mesiana</i> | 0,00031 | — | — | — | — |
| 95. | <i>C. minuta</i> | 0,02428 | 0,05054 | 0,10213 | 0,14036 | 0,07252 |
| 96. | <i>C. naviculiformis</i> | — | 0,00083 | 0,00085 | — | 0,00007 |
| 97. | <i>C. prostrata</i> | — | — | — | — | 0,00027 |
| 98. | <i>C. silesiaca</i> | 0,02157 | 0,02172 | 0,03330 | 0,12950 | 0,02129 |
| 99. | <i>C. sinuata</i> | 0,00823 | 0,01169 | 0,00885 | 0,00726 | 0,00309 |
| 100. | <i>C. tumida</i> | — | — | — | 0,00013 | — |

Tabel 1 (continuare)

| 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|---|---|---------|---------|---------|---------|---------|
| 101. <i>Gomphonema acuminatum</i> | | 0,00021 | 0,00042 | — | 0,00032 | — |
| 102. <i>G. angustatum</i> | | 0,00062 | — | 0,00085 | 0,00058 | 0,00007 |
| 103. <i>G. angustum</i> | | — | — | 0,00052 | — | 0,00007 |
| 104. <i>G. clavatum</i> | | 0,00094 | — | 0,00156 | 0,00013 | — |
| 105. <i>G. clevei</i> | | — | 0,00376 | 0,00260 | 0,00058 | 0,00060 |
| 106. <i>G. gracile</i> | | 0,00010 | — | — | — | 0,00007 |
| 107. <i>G. olivaceum</i> | | 0,00052 | — | — | — | 0,01209 |
| 108. <i>G. parvulum</i> | | 0,01699 | 0,00752 | 0,00956 | 0,00321 | 0,00141 |
| 109. <i>G. truncatum</i> | | — | — | — | 0,00077 | — |
| 110. <i>Denticula tenuis</i> | | — | — | 0,00078 | — | — |
| 111. <i>Rhopalodia gibba</i> | | — | — | 0,00013 | — | — |
| 112. <i>Hantzschia amphioxys</i> | | — | — | — | — | 0,00013 |
| 113. <i>Nitzschia acicularis</i> | | — | — | — | 0,00116 | — |
| 114. <i>N. amphibia</i> | | 0,00021 | — | 0,00013 | — | — |
| 115. <i>N. capitellata</i> | | 0,00042 | — | 0,00006 | — | — |
| 116. <i>N. communis</i> | | 0,00021 | — | 0,00657 | 0,12841 | 0,00336 |
| 117. <i>N. dissipata</i> | | — | — | 0,00098 | 0,01619 | 0,00336 |
| 118. <i>N. frustulum</i> | | — | — | 0,00176 | 0,00617 | 0,00128 |
| 119. <i>N. gracilis</i> var. <i>minor</i> | | 0,00073 | 0,00125 | 0,00807 | — | 0,00074 |
| 120. <i>N. kützingiana</i> | | 0,00021 | — | — | — | — |
| 121. <i>N. linearis</i> | | — | — | 0,02168 | 0,00540 | 0,00799 |
| 122. <i>N. microcephala</i> | | 0,00021 | — | — | — | — |
| 123. <i>N. palea</i> | | 0,01563 | 0,00208 | 0,00312 | 0,00906 | 0,00087 |
| 124. <i>N. pseudoamphioxys</i> | | — | — | 0,00019 | — | — |
| 125. <i>N. sinuata</i> var. <i>tabellaria</i> | | — | — | — | — | 0,00013 |
| 126. <i>N. stagnorum</i> | | 0,00042 | — | — | — | — |
| 127. <i>N. sublinearis</i> | | — | — | 0,00455 | — | — |
| 128. <i>N. thermalis</i> | | — | — | 0,00208 | — | — |
| 129. <i>Surirella angustatum</i> | | — | — | 0,00111 | 0,00026 | 0,00060 |
| 130. <i>S. biseriata</i> | | — | — | — | — | 0,00013 |
| 131. <i>S. ovata</i> | | — | — | 0,00117 | — | 0,00410 |

In punctul cu localizarea cea mai joasă din porțiunea cercetată (nr. 5), *Diatoma vulgare* apare ca dominantă, *Hannaea arcus* continuă să fie abundantă și cresc cantitativ *Synedra ulna*, *Achnanthes deflexa*, *Navicula lanceolata*. De asemenea, se poate observa o diversificare ceva mai mare a populațiilor de diatomee prezente. Față de genurile deja amintite, apar, chiar dacă sporadic, specii de *Caloneis*, *Amphora*, *Frustulia* și *Surirella*.

Caracterul tînzând către alcalin al apei este evidentiat prin existența unor specii mai mult sau mai puțin alcalifile: *Cocconeis pediculus*, *Achnanthes minutissima*, *A. lanceolata*, *Navicula mutica*, *N. heuffleri*, *N. cincta*, *N. tenelloides*, *Eunotia curvata*.

Dacă ar fi să caracterizăm din punct de vedere ecologic biotopul studiat, ținând cont de compoziția floristică înfățișată, apele Someșului Rece, în porțiunea cercetată, ar fi tip oligo — la β -mezosaprob (cf. [4]).

Se poate constata, de asemenea, că majoritatea speciilor semnalate sunt prezente cu un număr redus de indivizi, 1—2 specii apar ca preponderente (dominante), alături de alte 2—4 specii codominante, situație caracteristică pentru comunitățile naturale de diatomee din apele curgătoare [7].

Comparând comunitățile de diatomee din cele 5 stațiuni pe bază de afinitate floristică (Fig. 1), se poate observa asocierea acestora în două grupe principale, la nivel de similaritate de peste 55%: o grupă cuprinde comunitățile corespunzătoare punctelor 1 și 2, iar cea de-a doua grupă include următoarele trei puncte. În cadrul acesteia, apare o subîmpărțire a comunităților, la nivel de similaritate 65%, astfel: punctul 3 pe de o parte, punctele 4 și 5 pe de altă parte, acestea din urmă grupate împreună la un nivel de similaritate de 70%. În felul acesta, cladograma evidențiază mai pregnant existența a două tipuri de comunități în porțiunea studiată a Someșului Rece, una caracteristică cursului superior, mai apropiat de izvoare și alta, cu modificările structurale evidențiate anterior, proprie zonelor mai joase, intermediajă probabil față de comunitățile caracteristice cursului inferior al râului, apropiat de confluență, și care străbate regiuni cu așezări omenesti mai numeroase, surse de poluare care, fără

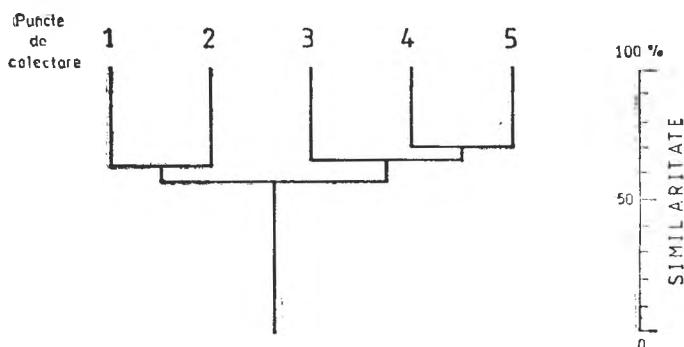


Fig. 1. Cladogramă ilustrând gruparea speciilor în comunitățile de diatomee din Someșul Rece, pe bază de afinitate floristică.

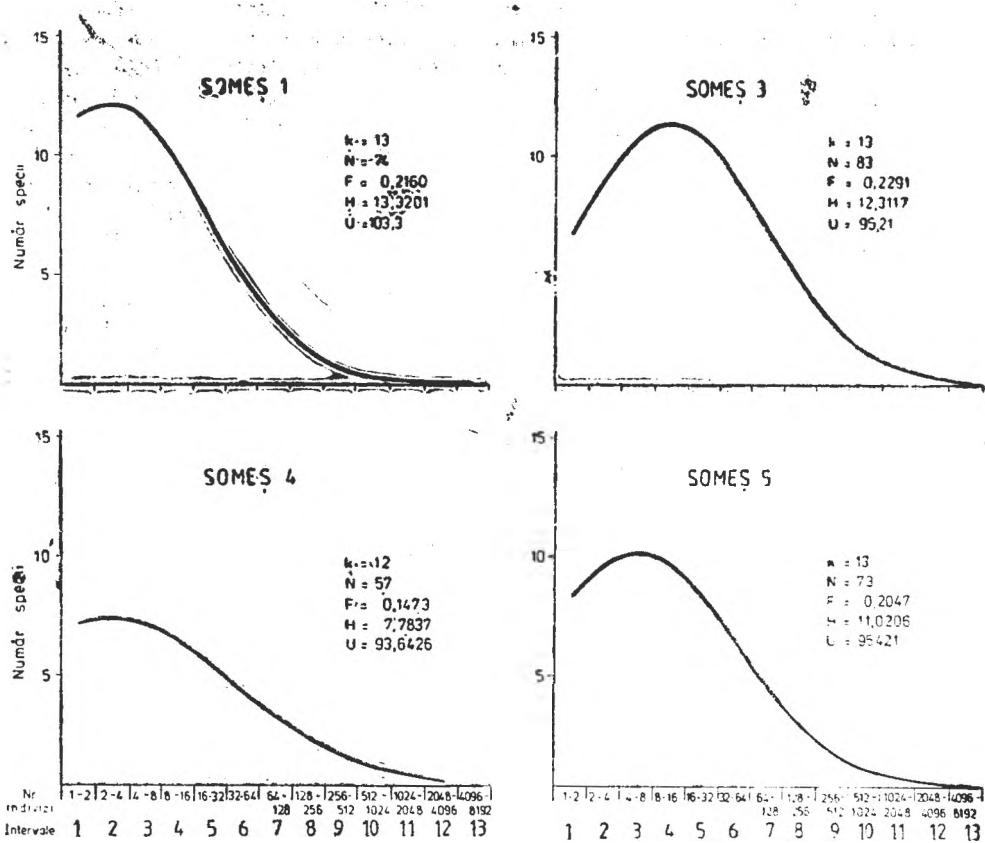


Fig. 2. Curbe normale trunchiate reprezentând structura comunităților de diatomee din râul Someșu Rece.

k — Număr intervale. N — Număr specii identificate. F — Factor de dispersie. H — Înălțime maximă teoretică a intervalului modal. U — „Univers teoretic” sau număr teoretic de specii.

îndoială, își pun amprenta asupra structurii comunităților de diatomee habitante în râu.

Așa cum se poate observa în Fig. 2, și curbele de distribuție indică păstrarea caracterului natural al comunităților cercetate. Aspectul lor aproximează modelul pentru comunitățile naturale, diferențele care apar, și care vizează în principal înălțimea și poziția intervalului modal, reflectând probabil variații locale inerente tipului de habitat studiat. În cazul curbelor reprezentând structura comunităților din punctele 2 și 4, aceste diferențe sunt mai evidente. Astfel, pentru punctul 2 (nu apare în figuri), curba este deplasată spre punctul de origine; pentru punctul 4, ea apare mai aplatizată și, în consecință, înălțimea modulului redusă. Numărul de specii identificate în aceste două puncte este mai mic, indicând o diversitate floristică mai scăzută, datorată probabil unor cauze locale.

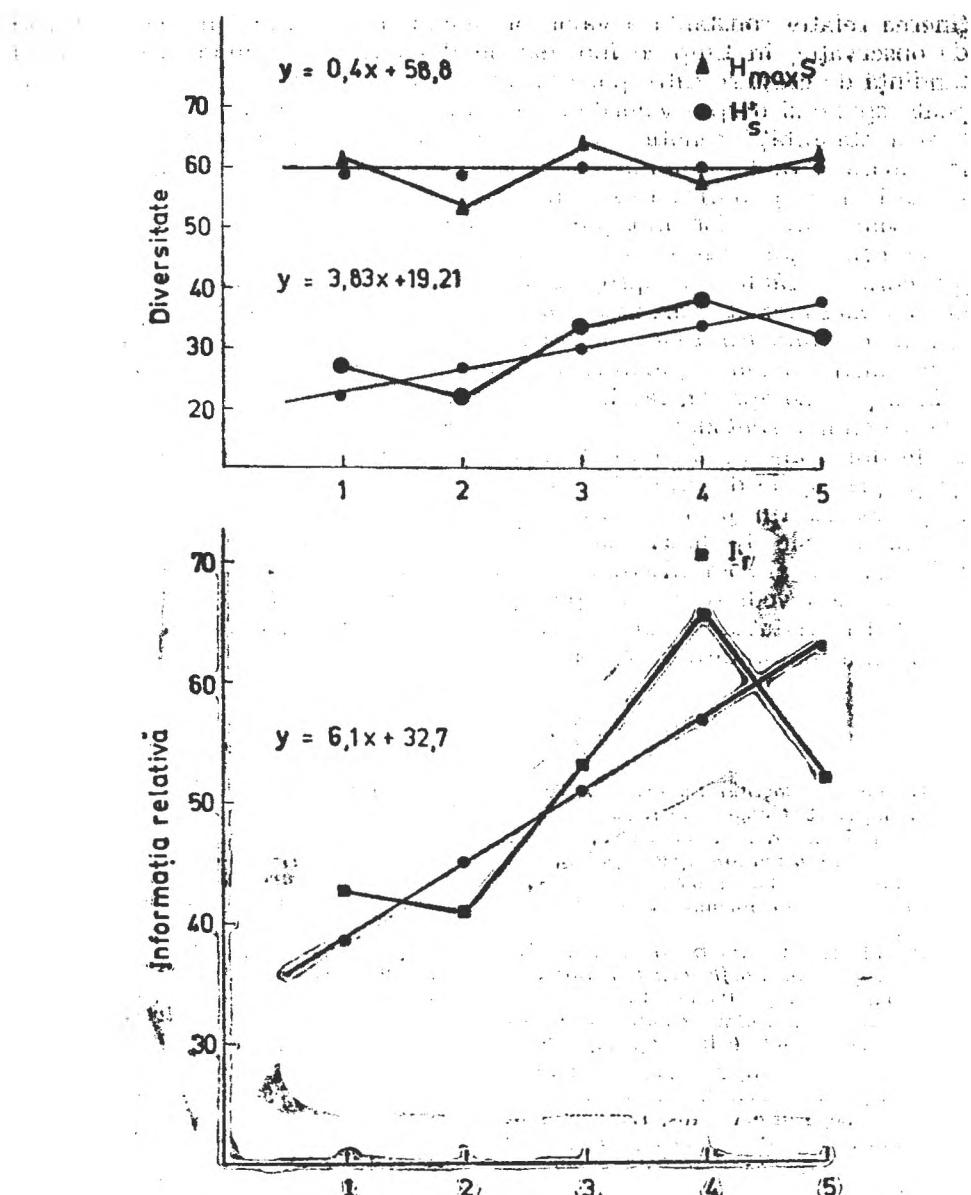


Fig. 3. Evoluția diversității maxime ($H_{max}S$), specifice (H_s) și a informației relativă (I_r) în cadrul comunităților de diatomee din Someșul Rece.

Pentru testarea stabilității cenotice a comunităților, s-au calculat, în fiecare caz, diversitatea specifică (H_s) sau indicele Shannon, diversitatea maximă ($H_{max}S$) și informația relativă (I_r) (Fig. 3). Se poate observa men-

tinerea relativ constantă a valorilor diversității maxime în cele 5 puncte de observație, în timp ce indicele de diversitate Shannon are o ușoară tendință de creștere către porțiunea inferioară a cursului. Același lucru se poate spune și despre valorile informației relative, ceea ce indică o creștere a stabilității cenotice a comunităților de diatomee către porțiunea inferioară a râului. Liniile de regresie trasate conform ecuațiilor specificate în figură confirmă existența acestor tendințe.

Concluzii. 1. Comunitățile de diatomee bentonice din porțiunea studiată a Someșului Rece suferă modificări calitative și cantitative de-a lungul cursului râului. În apropierea izvoarelor comunitățile sunt dominate de *Diatoma hiemale var. mesodon*, specie tipic microtermă și oligosaprobă, alături de *Hannaea arcus*, element microterm de asemenea. Mai jos dominantă devine *H. arcus*, alături de *Cymbella minuta*, specie indiferentă termic și β-mezosaprobă, iar în punctul de colectare cu localizarea cea mai joasă dominantă *Diatoma vulgare*, element β-mezosaprob larg răspândit în apele dulci, alături de *H. arcus*. În cadrul acestor comunități apar două grupe principale de afinitate floristică, corespunzătoare cursului superior, respectiv celui mijlociu ale râului.

2. Curbele de distribuție indică nealterarea semnificativă a caracterului natural al comunităților de diatomee în zona cercetată, apele Someșului Rece dovedindu-se de tip oligo- la β-mezosaprob.

3. Diversitatea specifică, informația relativă și, implicit, stabilitatea cenotică a comunităților din râu cresc către zonele sale mai joase.

B I B L I O G R A F I E

1. Buta, I., *Basinul Someșului*, Teză Dr., Univ. Babeș-Bolyai, Fac. Biol., Geogr. Geol., Secț. Geogr., Cluj, 1964.
2. Cancelada Fonseca, J.-P., *L'outil statistique en biologie du sol. V. Indices de diversité spécifique*, „Rev. Écol. Biol. Sol”, 6, 1969, 1–30.
3. Cancelada Fonseca, J.-P., *L'outil statistique en biologie du sol. VI. Théorie de l'information et diversité spécifique*, „Rev. Ecol. Biol. Sol”, 6, 1969, 533–555.
4. Möller, B., Pankow, H., *Algensoziologische und saprobiologische Untersuchungen an Vorflutern der Elbe*, „Limnologica” (Berlin) 13 (2), 1981, 291–350.
5. Momeu, L., Péterfi, L. S., Pándi-Gacsádi, O., Șipoș, C., *Structure of diatom communities occurring in a Transylvanian river, Romania*, „Contrib. Bot.” (Cluj-Napoca), 1988, 153–161.
6. Mountford, M. D., *An index of similarity and its application to classificatory problems*, in Murphy, P. W. (Ed.), *Progress in Soil Zoology*, p. 43–50, Butterworths, London, 1962.
7. Patrick, R., *Ecology of freshwater diatoms and diatom communities*, in Werner, D. (Ed.), *The Biology of Diatoms*, p. 284–332, Blackwell, Oxford, 1977.
8. Patrick, R., Hohn, M. H., Wallace, J. H., *A new method for determining the pattern of the diatom flora*, „Not. Natl. Acad. Nat. Sci.” (Philadelphia), 259, 1954, 1–12.
9. Patrick, R., Reimer, C. W., *The Diatoms of the United States, Exclusive of Alaska and Hawaii*, Acad. Nat. Sci., Philadelphia, 1966.
10. Péterfi, L. S., Momeu, L., *Dezvoltarea comunităților de diatomee epilitice din rîul Arieș, Transilvania*, „Stud. Univ. Babes-Bolyai, Ser. Biol.”, 29, 1984, 3–8.

11. Péterfi, L. S., Momoeu, L., *Structura comunităților de diatomee din Arieș sub influența poluării*, „Trav. Lab. Aquacult.” (Piatra Neamț), **1** (10), 1985 263—267.
12. Róbert, A., *Contribuții la studiul diatomeelor din rîul Mureș la Tîrgu-Mureș*, „Contrib. Bot.” (Cluj), 1968, 31—36.
13. Róbert, A., *Contribuții la studiul diatomeelor dintr-un pîrîu sărat de lîngă Singeorgiu de Mureș*, „Contrib. Bot.” (Cluj), 1969, 39—42.
14. Róbert, A., *Contribuții la studiul diatomeelor din partea de N—E a Cimpei Transilvaniei*, „Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Ser. Biol.”, **14** (2), 1969, 39—46.

NEMATODES AS INDICATORS OF ECOSYSTEM DISTURBANCE DUE TO POLLUTION

IULIANA POPOVICI*

SUMMARY. — Successional changes in soil nematode communities of forest ecosystems located nearby a metallurgic plant in the Western Carpathians were investigated. The efficiency of Maturity Index as a measure of habitat disturbance is discussed. Decrease in nematode abundance and diversity, changes in the relative abundance of trophic groups with increasing percentage of r-strategists and removing of K-strategists in highly polluted ecosystems are noted. As a result, a lower Maturity Index is accounted for nematode communities in the stands with high concentration of heavy metals.

In biomonitoring system the research is focussed on finding potential suitable organisms for assessing the quality of ecosystems which could show induced disturbances due to different factors.

The nematodes have proved to be well suited for monitoring the changes in soils and waters due to disturbances caused by pesticides, pollutants, sewage sludges etc. They show high abundance and diversity in almost all kinds of habitats; nematodes have different life spans, rapid colonization ability, relatively quick turnover; they represent a trophically heterogeneous group; many nematodes can withstand anhydrobiotic conditions; they can be easily sampled throughout the whole year [1, 2].

The potential usefulness of nematodes as test organisms to assess the environmental toxicants has been recently investigated for soils [8, 10, 11], mosses [13] and freshwaters [12]. Toxic effects of heavy metals (Pb, Cd, Zn, Cu, As) included in nutrients are revealed on some nematode species [6] as reduced abundance and exclusion of some species or trophic groups in polluted waters [12], or as strong changes in the structure and organization of nematode communities in forests of highly polluted areas [7, 9]. All these data underline a high sensitivity of nematodes to habitat disturbance.

An ecological index, — named Maturity Index (MI) — based on ecological characteristics of nematodes, was developed by Bongers [1] in order to assess the quality of terrestrial, freshwater and marine ecosystems.

Successional changes in nematode fauna of some forest ecosystems, situated in a highly polluted area in Romania, are presented below. Data on nematode abundance, diversity and trophic groups, as well as on heavy metal contents of soil and litter are illustrated and discussed. The efficiency of Maturity Index as a measure of habitat disturbance is also discussed.

Materials and methods. The forest ecosystems studied are situated in the Zlatna area, along the Ampoi and Roșioara rivers, on south-east of the Western

* Biological Research Institute, 3400 Cluj-Napoca, Romania

Carpathians. Here, a complex metallurgic plant is located. The ecosystems include beech, hornbeam, and pine forests situated at different distances up- and downstream from the plant (see Fig. 1). A control area (beech forest), located near the Muncel village, was chosen for the investigations conducted between 1981—1984 and in 1992.

The soils of these areas are brown acid, brown luvic and brown mesobasic. The essential pollutant is Pb, followed by Cu, Cd, Zn and SO₂ (as exhaust fumes and fine powder).

Ten samples, both from litter and soil layers (0—10 cm depth), were collected each time, seasonally for 1981, 1983, 1984 and yearly for 1979 and 1992.

The nematodes were extracted by a centrifugal flotation method, with sugar solution [4] and fixed in TAF solution [5]. They were counted and identified at genus level, and assigned to the following 5 trophic groups: plant parasites, bacterivores, fungivores, omnivores and predators.

All stands were sampled for soil analysis and heavy metal contents, too.

The Maturity Index (MI) [1] was used for the interpretation of data. A colonizer-persister (c—p) scale from 1 to 5, at genus level, was used [3]. The Maturity Index (MI) is calculated as the weighted mean of the individual c—p values:

$$MI = \sum_{i=1}^n v(i) \times f(i)$$

where $v(i)$ is the c—p value of taxon i as given in Bongers *et al.* [3] and $f(i)$ the frequency of taxon i in a sample.

It is to be noted that the plant parasitic nematodes are not included in this index; for them another index (PPI) has to be taken into account.

Results and discussion. On the first estimation (in 1979), significant differences were noted for nematode abundance of the 7 stands analysed (Fig. 1). The abundance was strongly reduced in the stands close (up- and downstream) to the metallurgic plant (beech and pine forests mainly).

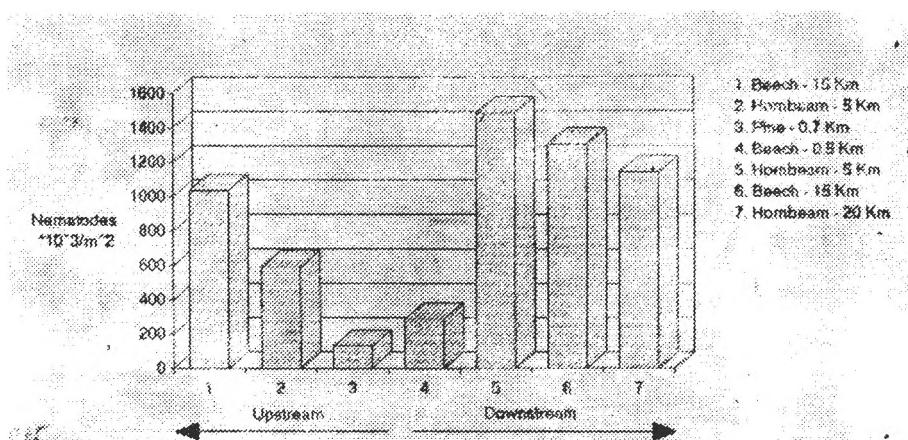


Fig. 1. Nematode abundance in forest ecosystems in relation to the distance from the metallurgic plant (1979's sampling).

Here, the nematode abundance represented only 27% (pine forest) and 51% (beech forest), respectively, of the abundance from the other stands.

It seems to be a close relation between nematode abundance and degree of pollution. High concentrations of lead (3,230 ppm!) and copper (1,132 ppm!) were found in litter of beech forest (0.5 km downstream). High values were also registered for copper in litter of the hornbeam stand no. 2 (566 ppm), no. 5 (1,593 ppm) and even in that of the stand no. 7 (573.5 ppm) located at 20 km downstream from the plant.

The pollutant accumulation reduced, also, the nematode diversity, increased the percentage of r-strategists (bacterivores) to 50—72%, reduced

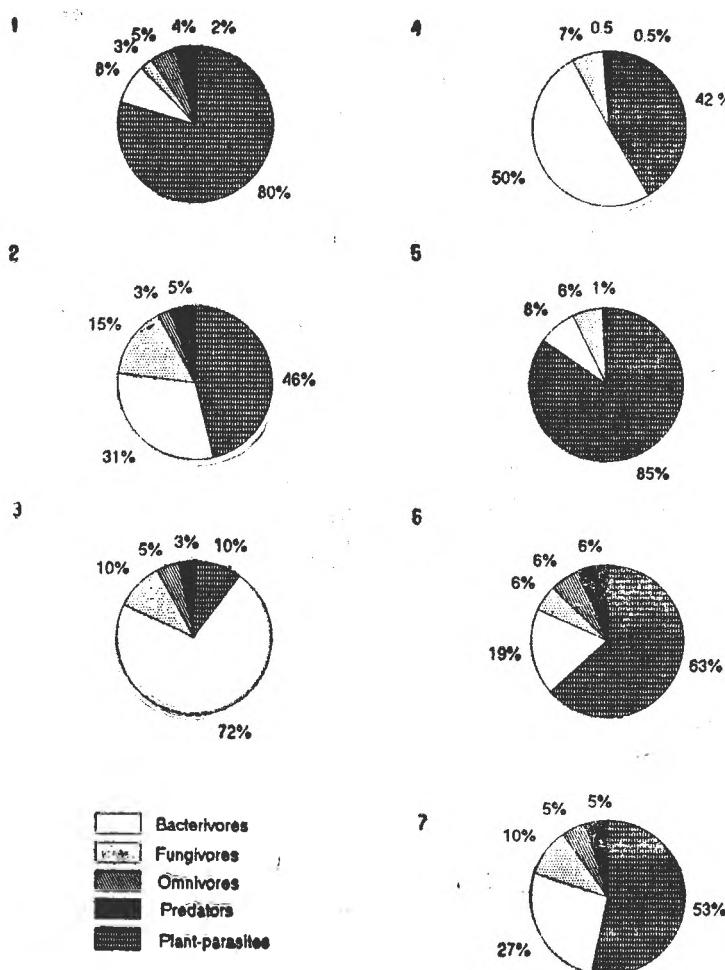


Fig. 2. Changes in trophic structure of nematode fauna due to pollution (number of ecosystem as in Fig. 1).

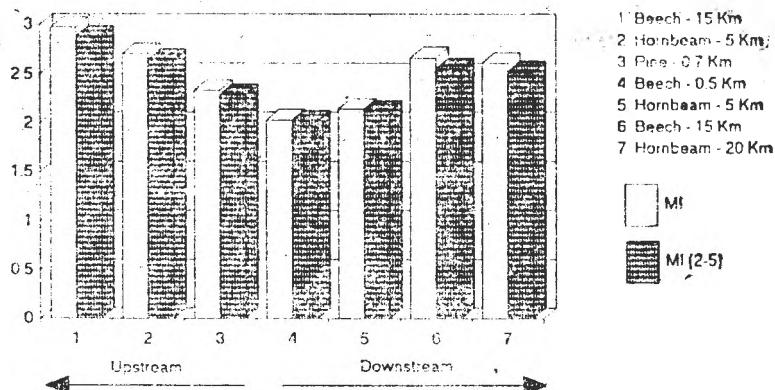


Fig. 3. Changes in the Maturity Indices as a measure of disturbance due to heavy metals plus SO_2 pollution (1979's sampling).

the relative abundance of plant-feeding nematodes (stands nos. 3 and 4) and almost excluded the omnivores and predators from the beech stand no. 4 (Fig. 2).

As a result, a lower Maturity Index (MI) is accounted for the nematode communities of the stands located near or up to 5 km from the plant (Fig. 3). The values of MI and MI (2—5) (when MI is estimated by excluding the extreme-colonisers with c-p=1) are similar in stands nos. 3, 4 and 5, meaning a lower abundance of the extreme-colonisers in these forests (Fig. 3). The stands located more than 5 km up- and downstream from the plant have a high MI value [MI=2.61 — 2.97; MI (2—5)=2.52 — 2.88].

The dominant genera in highly polluted forests are *Acrobeloides*, *Aphelenchoides*, *Filenchus*, *Criconemella* and *Gracilaculus*.

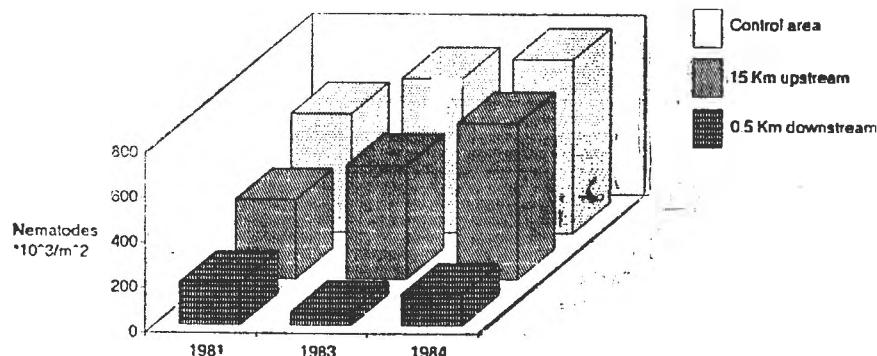


Fig. 4. Successional changes in nematode abundance of beech forests under the influence of pollutants (March's sampling).

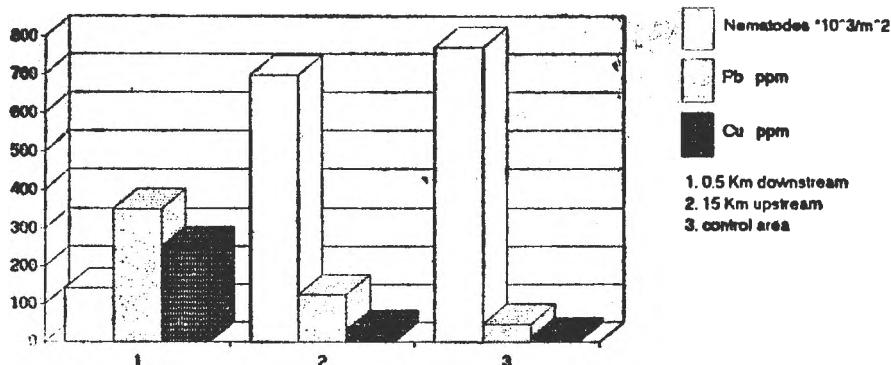


Fig. 5. Correlation between nematode abundance and soil heavy metal contents (1984's sampling)

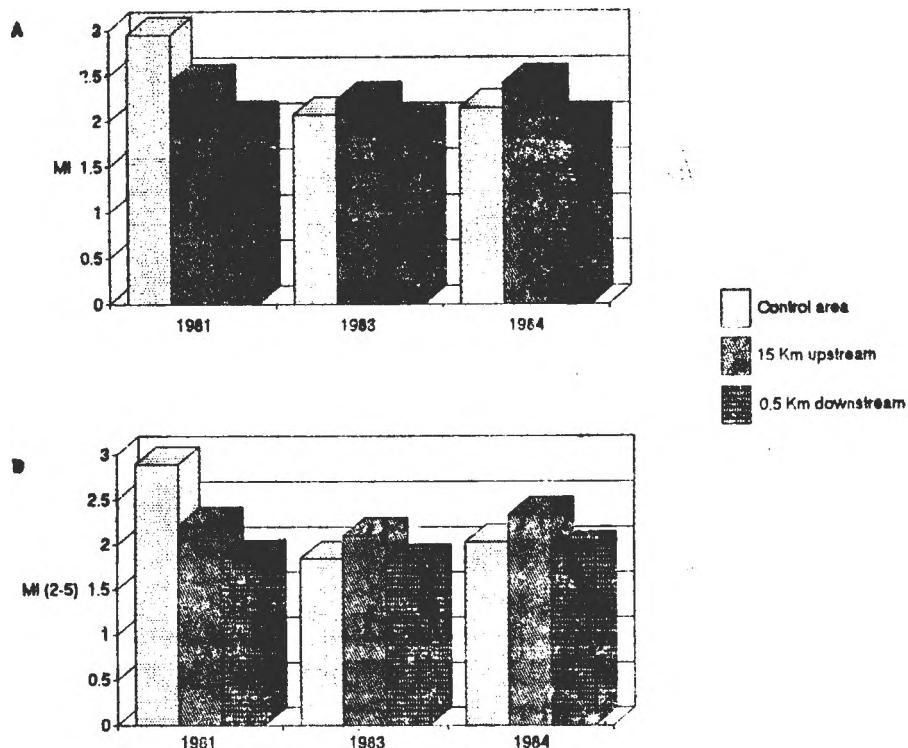


Fig. 6. Successional changes of Maturity Indices [A = MI; B = MI (2-5)] of nematode fauna in beech forests under the influence of pollution.

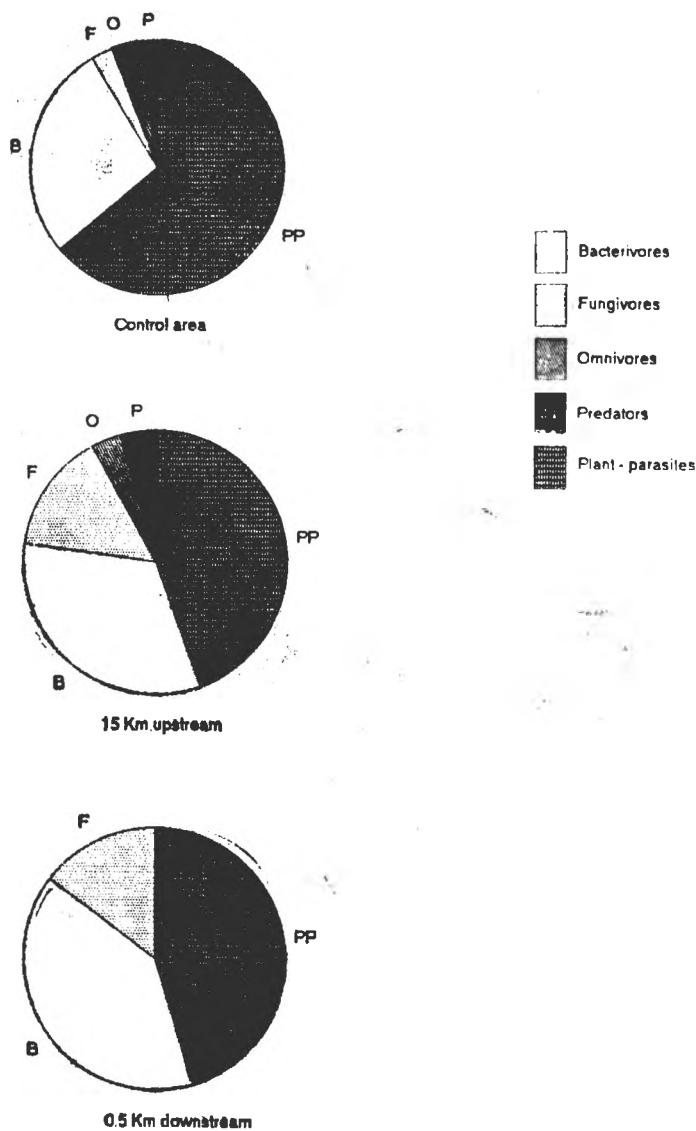


Fig. 7. Trophic structure of nematode fauna in beech stands under the influence of pollution.

A dynamic study was conducted between 1981 and 1984 in three beech forests, two of them already mentioned (stands nos. 1 and 4) and a control area (also a beech forest).

The nematode abundance is strongly reduced in highly polluted area (beech at 0.5 km downstream) during the whole investigation period. An illustration is given for March's sampling (Fig. 4). Both copper and lead

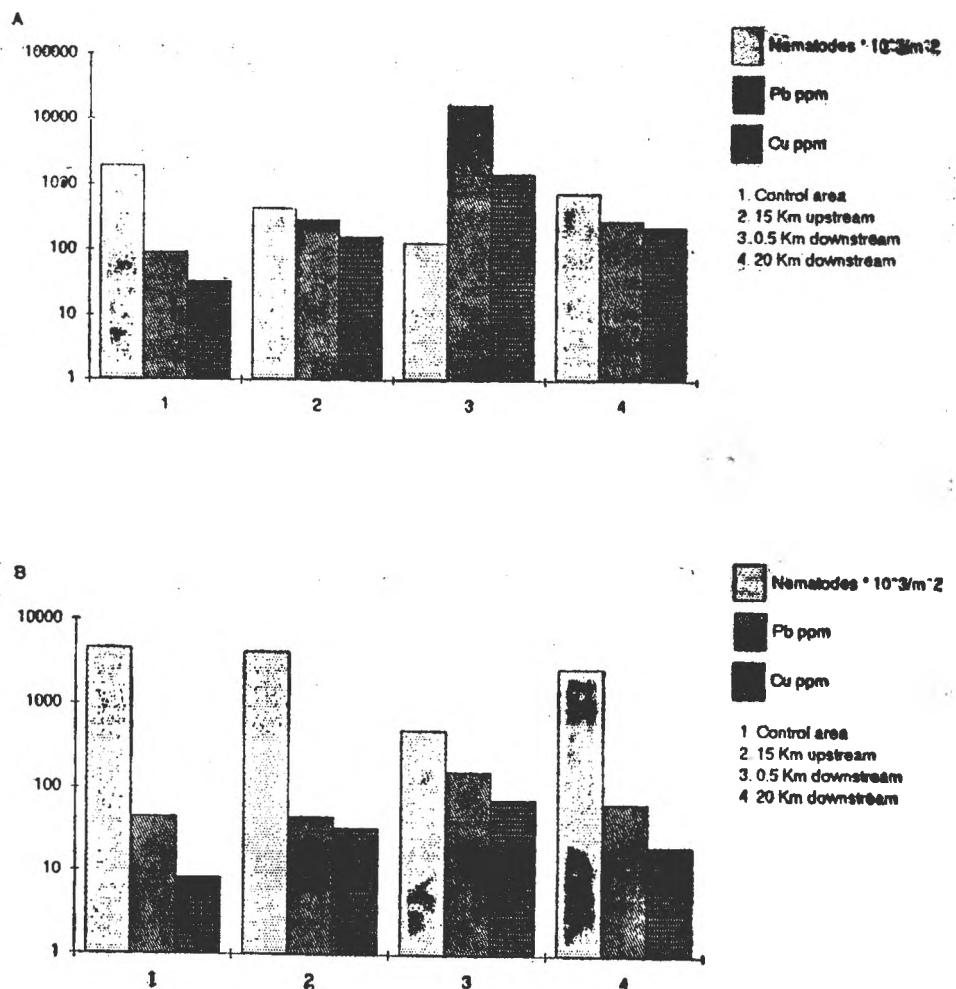


Fig. 8. Nematode abundance (on log scale) in litter (A) and soil (B) in relation to the distance of stands from the metallurgic plant (1992's sampling).

concentrations could be responsible for the decreased abundance (Fig. 5) in the forest situated nearby the plant.

A reduced diversity (25—32 genera) (Table 1) as well as low density could be correlated with the increased pollution degree. A major part of the populations in the polluted area is attributed to the genera *Acrobeloides*, *Filenchus*, *Gracilacarus*, *Aphelenchoïdes* and *Rhabditis*. In the control area, an increased diversity (49—56 genera) was recorded with a high percentage of *Filenchus*, *Plectus*, *Ceratoplectus* and *Criconemella* individuals.

Table 1

22

Relative abundance (%) and c-p value for nematode genera in three forests from the Zlatna area
(March's sampling)

| Genus/Family Trophic group | c-p value | Beech (0.5 km) | | | Beech (15 km) | | | Beech (control) | | |
|-------------------------------|--------------|----------------|------|------|---------------|------|------|-----------------|------|------|
| | | a | b | c | a | b | c | a | b | c |
| <i>Plant parasites</i> | | | | | | | | | | |
| <i>Aglenchus</i> | 2 | 0.1 | | | 0.8 | | 0.1 | 0.5 | 0.1 | 0.01 |
| <i>Coslenchus</i> | 2 | | | | | | 0.1 | 0.1 | 0.3 | |
| <i>Filenchus</i> | 2 | 42.2 | 19.4 | 9.5 | 44.8 | 22.9 | 14.4 | 25 | 19.5 | 15.8 |
| <i>Malenches</i> | 2 | | 0.4 | 0.1 | | 0.05 | 1.3 | | | |
| <i>Tylenchus</i> | 2 | 1 | 0.2 | 0.9 | 0.8 | 1.2 | 0.3 | 0.4 | 0.3 | 2.2 |
| <i>Tylenchidae</i> | 2 | | | 0.5 | | 0.05 | 0.1 | | 0.2 | 0.01 |
| <i>Tylenchorhynchus</i> | 3 | | | 0.1 | | | | 0.03 | | |
| <i>Merlinius</i> | 3 | | | | | | | | | 0.01 |
| <i>Pratylenchus</i> | 3 | | | | | | | 0.03 | | |
| <i>Gracilacarus</i> | 2 | 0.3 | 8.2 | 28.2 | 0.06 | 0.02 | 7 | 3.3 | 0.7 | 6.8 |
| <i>Criconema</i> | 3 | | 3.6 | 0.7 | | 0.1 | | | 0.3 | 0.05 |
| <i>Criconemella</i> | 3 | 11.4 | 2.2 | 1.7 | 17.2 | 15.6 | 20.4 | 9.9 | 7.5 | 2.5 |
| <i>Ogma</i> | 3 | 0.2 | | | 0.1 | 0.04 | 0.6 | 0.1 | 0.04 | 0.5 |
| <i>Ecpheyadophora</i> | 2 | 0.1 | | | | | 0.06 | | | |
| <i>Rotylenchus</i> | 3 | | | 0.6 | | | 0.1 | | | 0.1 |
| <i>Helicotylenchus</i> | 3 | | | 0.1 | | | | | | |
| <i>Longidorus</i> | 5 | | | | | | | 0.2 | | |
| <i>Trichodorus</i> | 4 | 0.2 | 0.6 | 3 | 0.06 | 0.02 | 0.02 | 0.6 | 0.7 | 0.5 |
| <i>Paratrichodorus</i> | 4 | 0.1 | | | 0.03 | | | 0.2 | 0.07 | 0.2 |
| <i>Bacterivores</i> | | | | | | | | | | |
| <i>Bunonema</i> | 1 | 0.2 | 3.8 | 0.7 | 0.9 | 7 | 2.2 | 1.3 | 3.9 | 5.1 |
| <i>Mesorhabditis</i> | 1 | 0.1 | | | | | | | | |
| <i>Rhabditis</i> | 1 | 6.6 | 5.3 | 1.1 | 0.5 | 2.1 | 2.1 | 1.2 | 11.1 | 2.7 |
| <i>Panagrolaimus</i> | 1 | | 0.7 | 0.1 | | 0.04 | 0.04 | | | 0.05 |
| <i>Cephalobus</i> | 2 | | | 0.6 | | | 0.02 | 0.3 | 0.1 | 0.6 |
| <i>Eucephalobus</i> | 2 | 0.1 | 0.4 | | 0.7 | 1.7 | 0.02 | 1.9 | 1.5 | 2.6 |
| <i>Heterocephalobus</i> | 2 | 0.1 | | 0.1 | 0.2 | 0.9 | 0.3 | 0.3 | 1.3 | 0.2 |
| <i>Chiloplacus</i> | 2 | | | 0.1 | | 0.1 | | 0.02 | 0.1 | 0.2 |
| <i>Cervidellus</i> | 2 | 0.1 | | 0.1 | 0.2 | 0.05 | 0.5 | 0.4 | 0.4 | |
| <i>Acobeloides</i> | 2 | 18.2 | 33.5 | 31.8 | 1.2 | 0.6 | 2.5 | 2.5 | 1.2 | 2.8 |
| <i>Teratocephalus</i> | 3 | | 0.4 | 0.5 | 0.5 | 1.8 | 1.3 | 1.2 | 3.1 | 3 |
| <i>Metateratocephalus</i> | 3 | 2.8 | 4.9 | 0.1 | 0.5 | 1.5 | 0.9 | 1.7 | 0.9 | 2 |
| <i>Eumonhystera</i> | 1 | 1.6 | | | 1 | 0.04 | 0.3 | 0.06 | 0.2 | 0.2 |
| <i>Geomonhystera</i> | 1 | | | | 0.1 | 0.07 | 0.2 | 0.4 | 0.5 | 0.6 |
| <i>Anaplectus</i> | 2 | | 0.7 | | 0.2 | 0.1 | | 0.8 | 0.7 | 1.8 |
| <i>Ceratoplectus</i> | 2 | | 1.7 | | 0.1 | 0.8 | 0.5 | 0.3 | 9.9 | 7.6 |

| | | | | |
|---------------------------|---|-----|-----|-----|
| <i>Plectus</i> | 2 | 6.4 | 1.1 | 3.7 |
| <i>Tylocephalus</i> | 2 | | 0.2 | 0.1 |
| <i>Wilsonema</i> | 2 | 0.3 | | |
| <i>Araeolaimida</i> | 2 | | | |
| <i>Aphanolaimus</i> | 3 | | | |
| <i>Paraphanolaimus</i> | 3 | | | |
| <i>Rhabdolaimus</i> | 3 | | | |
| <i>Cylindrolaimus</i> | 3 | | | |
| <i>Chronogaster</i> | 3 | | | |
| <i>Odontolaimus</i> | 3 | | | |
| <i>Bastiania</i> | 3 | 0.4 | | 0.1 |
| <i>Prismatolaimus</i> | 3 | 0.4 | 0.4 | 0.1 |
| <i>Alaimus</i> | 4 | 0.4 | | 0.1 |
| <i>Paramphidelus</i> | 4 | 0.1 | | |
| <i>Fungivores</i> | | | | |
| <i>Aphelenchus</i> | 2 | | | 0.1 |
| <i>Aphelenchoides</i> | 2 | 4.4 | 7.4 | 9.7 |
| <i>Ditylenchus</i> | 2 | 0.7 | 3.8 | 4.4 |
| <i>Deladenus</i> | 2 | | | 0.1 |
| <i>Ty whole inophorus</i> | 3 | 0.1 | | |
| <i>Diphtherophora</i> | 3 | | | |
| <i>Tylencholaimus</i> | 4 | 0.6 | | 0.1 |
| <i>Omnivores</i> | | | | |
| <i>Prodorylaimidae</i> | 4 | | | |
| <i>Mesodorylaimus</i> | 4 | | | 0.2 |
| <i>Pungentus</i> | 4 | | | |
| <i>Eudorylaimus</i> | 4 | 0.3 | | 0.2 |
| <i>Thonus</i> | 4 | | | 0.2 |
| <i>Aporcelaimus</i> | 5 | | | |
| <i>Aporcelaimellus</i> | 5 | 0.2 | | |
| <i>Oxydirus</i> | 5 | | | |
| <i>Dorylaimoides</i> | 4 | | | |
| <i>Predators</i> | | | | |
| <i>Pristionchus</i> | 1 | | | |
| <i>Clarkus</i> | 4 | | | |
| <i>Iotonchus</i> | 4 | | | |
| <i>Miconchus</i> | 4 | 0.2 | | |
| <i>Mylonchulus</i> | 4 | | | |
| <i>Prionchulus</i> | 4 | | | |
| <i>Tripyla</i> | 3 | 0.1 | 0.2 | 0.2 |
| Total of genera | | 32 | 25 | 31 |

* a - 1981. b - 1983. c - 1984.

Table 1(continued)

| | | | | | |
|------|------|------|------|------|------|
| 9.7 | 21 | 16.7 | 7.9 | 17.3 | 15 |
| 0.3 | 2.2 | 0.4 | 1.8 | 8.1 | 2.7 |
| 0.2 | 1.2 | 0.5 | 0.6 | 1.4 | 3.7 |
| | 0.3 | 0.3 | | 0.06 | 0.4 |
| | | | 0.02 | | |
| 0.03 | 0.04 | | 0.1 | 0.03 | |
| | 0.02 | 0.02 | | 0.02 | |
| | 0.05 | | 0.1 | 0.3 | 0.1 |
| | | | | | 0.05 |
| 0.5 | 0.6 | 0.4 | 5.6 | 1 | 1.7 |
| 3 | 0.2 | 0.6 | 3.2 | 0.8 | 1 |
| 1.4 | 1.1 | 2.5 | 1.4 | 1.1 | 1.1 |
| 0.2 | 0.1 | | 0.5 | 0.1 | 0.1 |
| | | | | 0.03 | |
| 0.9 | 2.6 | 6.8 | 1.4 | 0.03 | 0.01 |
| 0.3 | 3.6 | 3.8 | 0.7 | 3.6 | 3.6 |
| | 0.02 | 0.08 | | 2.3 | 6.7 |
| 0.3 | 0.04 | 0.2 | 1.2 | 0.3 | 0.01 |
| | | | | 0.07 | |
| 1.4 | 1.8 | 4 | 4.4 | 0.08 | |
| | | | | 0.8 | 0.9 |
| 0.06 | 0.1 | | 0.4 | 0.02 | |
| | 0.04 | 0.02 | 0.4 | 0.5 | 0.4 |
| | 0.02 | | 0.1 | 0.02 | |
| 0.6 | 1.1 | 1.3 | 6.7 | 1.6 | 1.4 |
| 1.7 | 0.7 | 1.9 | 0.4 | 0.3 | 0.4 |
| 0.2 | | | 0.2 | 0.1 | 0.04 |
| 0.7 | | 0.1 | 3.2 | 0.7 | 0.1 |
| | | | | 0.01 | |
| | | | | 0.02 | |
| 1.9 | 0.2 | 0.1 | 0.06 | | |
| | | 0.08 | 0.9 | 0.1 | 0.1 |
| | | 0.02 | | | 0.01 |
| | | | 0.1 | | |
| 0.2 | 0.05 | | 0.2 | 0.03 | 0.02 |
| 0.03 | 5.4 | 4.1 | 4.4 | 1.3 | 1 |
| 40 | 32 | 42 | 52 | 56 | 49 |

Lower values of Maturity Indices were accounted for polluted area ($MI=1.96-2.02$) as compared to those for the control area ($MI=2.07-2.95$) or for the beech stand located 15 km upstream from the plant ($MI=2.23-2.43$) (Fig. 6 A,B).

Changes are also noted in the trophic structure of nematode communities (Fig. 7). The K-strategists (omnivores and predators) are eliminated from communities of the most polluted forest, these being replaced by r-strategists (bacterivores).

Eight years later (in 1992), again low nematode abundances were accounted in the polluted area (Fig. 8 A,B); the lowest abundance was recorded in the litter layer with the highest heavy metal contents ($Pb=16,000$ ppm !!, $Cu=1,467$ ppm) (Fig. 8 A). The negative influence of pollutants is reflected also in MI values (Fig. 9) which are very low both

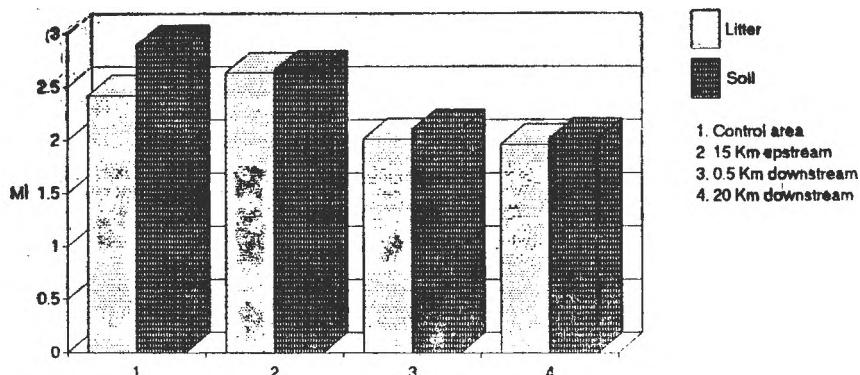


Fig. 9. Maturity Indices of nematode fauna in litter and soil layers of beech (1-3) and hornbeam (4) forests under the influence of pollution (1992's sampling).

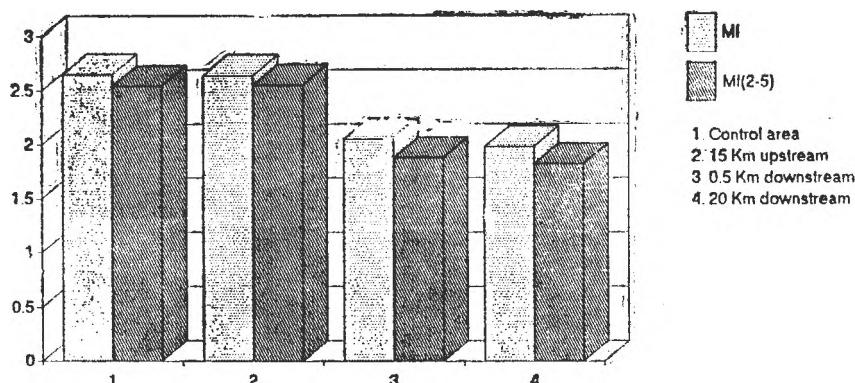


Fig. 10. Comparative changes in MI and MI(2-5) indices of nematode fauna in beech (1-3) and hornbeam (4) forests under the influence of pollution (1992's sampling).

for litter and soil nematodes in beech and hornbeam forests located downstream from the plant ($MI=2.01-2.1$ and $1.96-2.01$, respectively). By comparing the values for MI and MI(2-5) of the whole nematode fauna

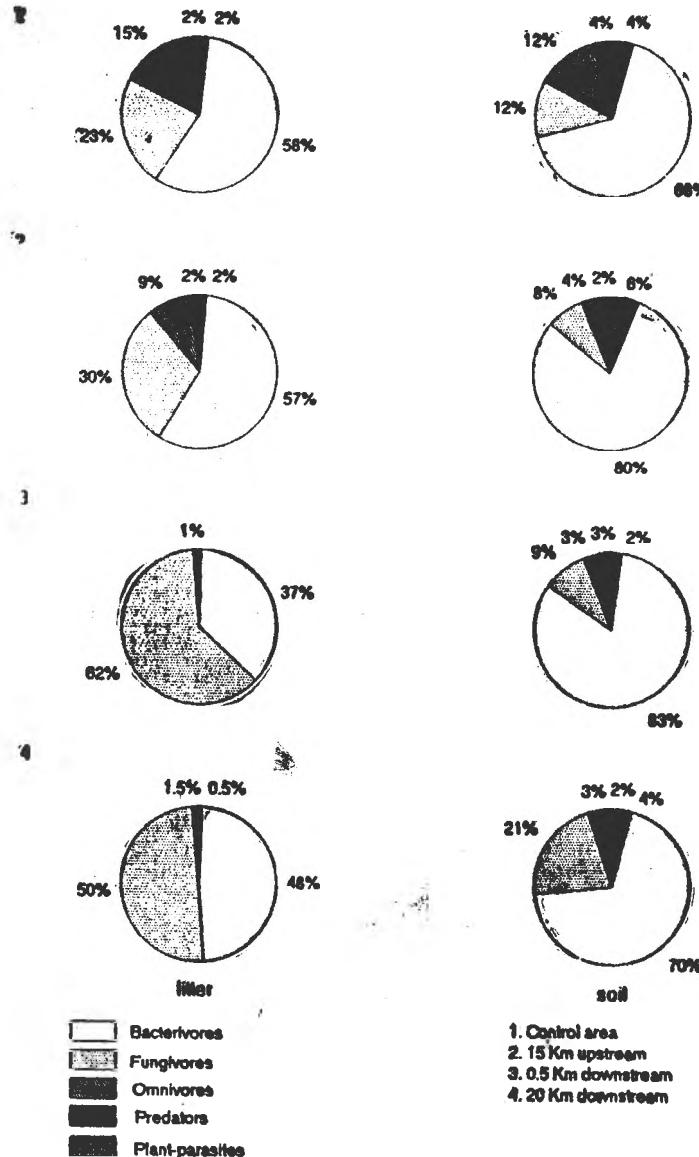


Fig. 11. Changes in trophic structure of nematode fauna under the influence of pollutants
(1-3 — beech, 4 — hornbeam forests).

(Fig. 10) from these ecosystem, a low contribution of extreme-colonisers to these indices is to be noted.

In these two above-mentioned ecosystems major changes in the trophic structures of nematode communities are observed: a high percentage of fungivores, a lower contribution of bacterivores and an almost complete removing of the other groups from litter communities (Fig. 11).

All these data confirm that the disturbances due to pollutants have negative influences on the more specialised species (K-strategists, which are replaced by less specialised ones (r-strategists) [2].

Conclusions. 1. Successional changes in nematode fauna of forest ecosystems, situated up- and downstream from the metallurgic plant in Zlatna, are marked by the decreased abundance and diversity correlated with the accumulation of heavy metals, the distance and direction of the stands from the plant.

2. Changes in relative abundance of feeding groups in highly polluted areas are reflected in increased percentage of r-strategists and an almost complete removing of K-strategists from the nematode communities. The negative effect of habitat disturbance on nematode communities persisted and became even more pronounced during the investigation period.

3. As a result, lower Maturity Indices were accounted for nematofauna of the stands located within the highly polluted area.

4. The usefulness of nematodes and of Maturity Index as indicators of ecosystem disturbance due to pollution has to be underlined.

REFERENCES

1. Bongers, T., *The maturity index: an ecological measure of environmental disturbance based on nematode species composition*, „Oecologia“, 83, 1990, 14–19.
2. Bongers, T., Alkemade, R., Yeates, G. W., *Interpretation of disturbance-induced maturity decrease in marine nematode assemblages by means of the Maturity Index*, „Mar. Ecol. Progr. Ser.“, 76, 1991, 135–142.
3. Bongers, T., Goede, R. G. M. de, Kappers, F. I., Manger, R., *Ecoloogische typologie van de Nederlandse bodem op basis van de vrij levende nematodenfauna*, RIVM-Rapp., No. 718602002, 1989.
4. De Grisse, A. T., *Redescription ou modifications de quelques techniques utilisées dans l'étude de nématodes phytoparasitaires*, „Meded. Fak. Landbouwwet. Gent“, 34, 1969, 351–370.
5. Goodey, J. B., *Laboratory methods for work with plant and soil nematodes*, „Tech. Bull. Ministry Agric., Fish. Food“ (London), No. 2, 1957.
6. Popham, J. D., Webster, J. M., *Cadmium toxicity in the free-living nematode Caenorhabditis elegans*, „Environ. Res.“, 20, 1979, 183–191.
7. Popovici, I., *Influența poluării industriale asupra nematodelor din sol*, „Stud. Cercet. Biol. Ser. Anim.“, 33 (1), 1981, 93–98.
8. Sturhan, D., *Nematodes as potential indicators of heavy metals*, in Van der Waal, A. F., Goede, R. G. M. de (Eds.), *Nematodes in Natural Systems. A Statut Report of a Workshop*, p. 41, Agric. Univ., Wageningen, 1988.

9. Wasilewska, L., *The structure and function of soil nematode communities in natural ecosystems and agroecosystems*. „Pol. Ecol. Stud.“, 5, 1979, 97—145.
10. Weiss, B., *Einflu von Klärschlammdüngung und Schwermetallbelastung auf die Nematoden eines Ackerbodens*, Diplomarbeit, Univ. Braunschweig, 1990
11. Weiss, B., Larink, O., *Influence of sewage sludge and heavy metals on nematodes in an arable soil*. „Biol. Soils“, 12, 1991, 5—9.
12. Zullini, A., *Nematodes as indicators of river pollution*, „Nematol. Medit.“, 4, 1976, 13—22.
13. Zullini, A., Peretti, E., *Lead pollution and moss inhabiting nematodes of an industrial area*, „Water, Soil Air Pollut.“ 27, 1986, 403—419.

MASTIGOPHOROPHYLLON SAXONICUM Verh., 1910 ÎN MUNTII APUSENI

TRAIAN CEUCA*

SUMMARY. —*Mastigophorophyllum saxonicum* Verh. 1910 in the Apuseni Mountains. The paper reveals, for the first time, the presence of *Mastigophorophyllum saxonicum* in the Apuseni Mountains, from where no species of the *Mastigophorophyllum* genus was yet mentioned. A new subspecies (*Mastigophorophyllum saxonicum biharicum*) is also described.

Dintre toate speciile genului *Mastigophorophyllum*, specia *M. saxonicum* este cea mai răspândită. Ea ocupă un areal ce se întinde din Germania (unde este citată din mai multe stațiuni), prin Letonia, Estonia, Polonia și Slovacia, pînă în vestul Ucrainei și nordul României, deocamdată numai pe Muntele Rarău [2, 4].

Deși în Carpații Orientali, cît și în cei Sudici, mai există numeroase alte specii ale acestui gen (și chiar și în Balcani), în Munții Apuseni încă nu a fost menționată nici o specie, aşa cum spuneam în lucrarea din 1976 [3].

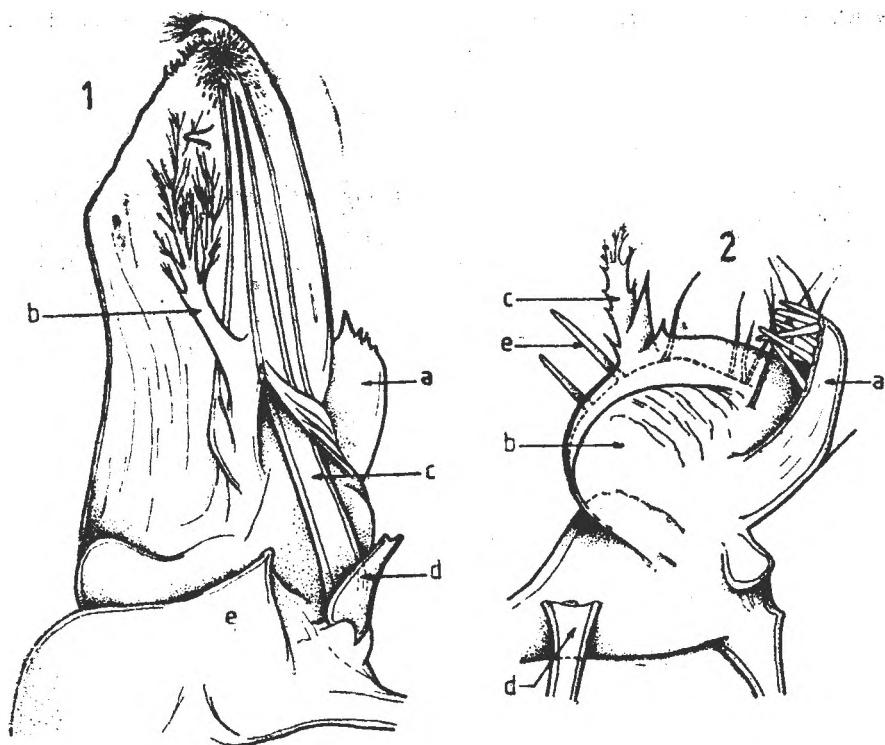
Studiind conținutul stomacal, care mi-a fost dat pentru determinare, al unei șopirle (*Lacerta vivipara*), capturată de lîngă cabana Băișoara din Apuseni la 18. VIII. 1975 (Muntele Buscat), am avut surpriza să găsesc intacte gonopodele unui exemplar ♂ de *M. saxonicum*. Cercetările intense ulterioare, pe care le-am făcut în zona acestor munti, mi-au confirmat existența acestei specii și într-o altă stațiune de pe valea Someșului Rece — Irișoara — de unde am colectat, în 19. IV. 1978, 3 ♂♂ + 2 ♀♀, ale căror gonade sunt reprezentate în Fig. 1—2.

Analizînd conformația acestor gonopode și comparîndu-le cu cele ale unui exemplar de pe Rarău, sau din Germania [5], date de Schubart, se poate observa o oarecare diferență între vîrful gonopodelor anterioare, care la exemplarele de la Băișoara și ale celor din Germania, au vîrfurile ascuțite și ușor curbate posterior, pe cînd la forma de la Rarău, acestea nu sunt ascuțite și nici curbate posterior, avînd țotuși, sub vîrful lor, tot pe partea posterioară, o zonă circulară „păroasă“.

Lobii mediali (a), la formele de la Băișoara, sunt evident lăți și cu vîrfurile puțin ascuțite, pe cînd la cele de la Rarău și la cele din Germania, vîrfurile sunt evident mai ascuțite. Ramura plumiformă (b) este relativ asemănătoare, atît la formele de la Rarău, cît și la cele de la Băișoara, în schimb cele de la formele din Germania au „rachisul“ gros și „barbele“ foarte scurte [5].

Dacă ne referim la gonopodele posterioare (Fig. 2), se poate spune că și aici există un oarecare grad de variabilitate, atît în ceea ce privește forma gonopodelor, cît și cea a prelungirii hialine (c) a acestora (care se

* Universitatea Babes-Bolyai, Catedra de zoologie, 3400 Cluj, România



F i g. 1 – 2. *Mastigophorophyllum saxonicum.*

1. Gonopodul anterior drept, văzut posterior.

a — Lobul medial. b — Ramura plumiformă. c — Pseudoflagelul ascuns. d — Pseudoflagelul liber. e — Pintenul coxal.

2. Gonopodul posterior drept, văzut anterior.

a — Ramura externă. b — Ramura internă (corpus gonopodiale). c — Prelungirea hialină a ramurei interne. d — Pseudoflagelul liber (văzut parțial). e — Bastonașe mediale de pe fața posterioară.

aseamănă mai bine cu formele din Polonia — figurate de Stojalo-wska [6]. Dintre cele cîteva bastonașe de pe fețele posterioare ale acestor gonopode, numai la formele de la Băisoara, proeminează, medial două, neobișnuit de lungi (e); la celealte forme (Rărău, Polonia și Germania), acestea, evident mult mai scurte, nu ajung spre marginea medială a gonopodelor, ci din contră ele sănt orientate lateral. Referindu-ne la ramura externă a acestor gonopode, ea este evident mult mai scurtă; capătul distal, acoperit pe latura internă de bastonașe, abia depășește corpul gonopodial (ramura internă).

Bineînțeles, că aceste mici diferențe nu reprezintă decît niște variații normale intraspecificice, dacă ne referim la marea întindere a arealului acestei specii [1].

Mastigophorophyllum saxonicum biharicum n. ssp.

Studiind materialul pe care l-am colectat și din alte stațiuni din Munții Apuseni, am constatat că sunt în față unei noi forme: o subspecie. Ca dimensiuni și culoare, aceasta se încadrează în aspectul general al speciei (subspecia nominată) *M. s. saxonicum*. Ceea ce deosebește noua subspecie de forma nominală sunt cîteva diferențieri, considerate majore, din conformația gonopodelor.

Gonopodele anterioare (Fig. 3) se caracterizează prin vîrfurile telopoditelor indoite mult posterior și abundant „păroase“. Micul pînjen de sub această zonă (care la subspecia nominată este abia schițat), aici el este evident mult mai lung și are vîrful dirijat oblic-lateral. Lobii mediali ai telopoditelor (a), și ei evident mai mari, au vîrfurile lungi și ascuțite, iar spre bazele lor sint ușor dințați, întinzîndu-se pînă în dreptul coxelor. Pînjenii coxali sint de asemenea neobișnuit de lungi (e), subțiri și ușor încovoaiați. Ramurile plumiforme (b), precum și pseudoflagelii liberi (d), cît și cei ascunși (c) nu au modificări semnificative.

Gonopodele posterioare (Fig. 4) au ramurile externe (a) desprinse de pe corpul gonopodial (ramurile interne), mult mai sus decît la subspecia



Fig. 3 — 4. *Mastigophorophyllum saxonicum biharicum n. ssp.*

3. Gonopodul anterior drept, văzut posterior.

a—e — Vezi Fig. 1.

4. Gonopodul posterior drept, văzut anterior.

a—e — Vezi Fig. 2.

nominată; grupurile de bastonașe, obișnuite, de pe aceste ramuri, aici sunt dispuse pe aproape jumătate din lungimea lor și nu numai spre vîrfurile lor, ca la forma nominată. Pe marginile externe ale acestor ramuri laterale, există cîte două sete lungi. Corpul gonopodial (ramura internă) are un aspect de patrulater (b) și nu ovoidal, așa cum este de regulă. Sirul neregulat de bastonașe de pe fețele lor posterioare au vîrfurile îndreptate spre ramurile externe (la formele de la Rarău, Polonia și Germania), pe cind aici (e) trei sunt orientate medial cu vîrfurile abia vizibile, situate sub prelungirea hialină a ramurei interne (c) care este evident mai lată.

Proveniența. Am colectat 2 ♂♂ și 3 ♀♀ din apropierea podului de la Ic-Ponor în 20. VI. 1976 și de la Padiș, 3 ♂♂ și 2 ♀♀ în 19. VII. 1976. Materialul a fost colectat din micișe șanțuri care se găsesc între drumurile forestiere și marginile pădurilor, sub pietre, frunză sau bucăți de ramuri, mai groase, rupte și căzute.

Dacă am compara gonopodele acestei noi subspecii cu gonopodele de la *M. s. saxonicum*, vom observa că diferențele care există între aceste două forme sunt clare și evidente, nepunind în discuție valabilitatea subspeciei *M. s. biharicum*, cu toate că stațiunile dintre cele două subspecii fac parte din ansamblul Munților Apuseni.

Probabil că cercetări și studii ulterioare, făcute pe mai mulți indivizi (populații — deși se știe că foarte rar se găsesc mai mulți indivizi în același loc) și din alte stațiuni, vor putea să consolideze și din alte puncte de vedere, nu numai morfologic, acest nou taxon, sau din contră.

B I B L I O G R A F I E

1. Attems, C., *Über paläarktischer Diplopoden*, „Arch. Naturgeschichte“, **91** (1–2), 1926, 82–103.
2. Ceuca, T., *Citeva Diplopode noi în fauna RSR*, „Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Ser. Biol.“, **9** (2), 1964, 89–99.
3. Ceuca, T., *Genul Mastigophorophyllum Verh. 1897* (Diplopoda—Ascospomphora), „Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Biol.“, **21** (2), 1976, 37–43.
4. Ceuca, T., *Diplopodes nouveaux dans la faune de la Roumanie* (Diplopoda—Ascospomphora), „Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Biol.“, **30**, 1985, 35–46.
5. Schubert, O., *Tausendfüssler oder Myriapoda. 7. Diplopoda*, in *Tierwelt Deutschlands*, p. 74–76, Fischer, Jena, 1934.
6. Stojalowska, W., *Krocionogi (Diplopoda) Polski*, p. 84–104, Pol. Akad., Warszawa, 1961.

POSTEMBRYONIC DEVELOPMENT OF *TRACHELIPUS DIFFICILIS ROTUNDATUS* (CRUSTACEA, ISOPODA)

NICOLAE TOMESCU* and SHARON ACCOLA*

SUMMARY — The postembryonic ontogenetic development of *Trachelipus difficilis rotundatus* (Crustacea, Isopoda) takes place in approximately 10—11 months. The larval stage appears in June-July and the adults develop in May—June of the following year. The specific characters are formed progressively during the immaturity stage: first the cephalic lobes, then the pleopods 1 (especially the gonopods) and lastly the crest of the carpopodite of pereopod VII.

The paper represents a continuation of research regarding the postembryonic ontogenetic development of terrestrial isopods [2—7]. The knowledge of the appearance of secondary sexual characters in the course of ontogenesis can help avoid taxonomical errors. In the males, specific characters appear progressively; thus, immature individuals, which have characters of both immature and adult individuals, could be mistakenly considered as belonging to another species.

Materials and methods. We studied specimens of *Trachelipus difficilis rotundatus* grown in the laboratory as well as specimens captured in Cheile Turzii at two-week intervals over a period of two years. First, the overall morphology of whole animals was inspected by binocular microscope, then parts required for further analysis were dissected out and prepared for examination by light microscopy. Body length measurements were made for each individual in different stages of development [7]. In describing the developmental stages, we use the terminology proposed by Holdich et al. [1].

Results and discussions. The length of the postembryonic development from the larval stage to that of the adult one is approximately 10—11 months.

a) *Postmarsupial larval stage.* The first larvae of *Trachelipus difficilis rotundatus* appear at the end of June. The length of the larva is 1 mm; the cephalic lobes are not developed (Fig. 1 a). The last article of the antenna is much shorter than the next to the last one, the former being approximately 1/3 the length of the latter (Fig. 1 b). The eyes have 5 ommatides. The buccal appendices are completely developed, capable of masticating food. The epimeral glandular fields are not yet formed. Pleopods 1 and 2 are barely visible. The distal extremity of the pleotelson is very blunt.

The principal morphological modifications which occur in the larval stage involve the length of the last two antennal articles, the cephalic lobes, the thoracic segment VII and pereopod VII. After 5 days, the relationship between the last and the next to last articles of the antenna is changed, the last article becoming twice as long as the next to last (Fig. 1 c). At the age of 19 days, the difference is much more pronounced.

* Babes-Bolyai University, Department of Zoology, 3400 Cluj, Romania

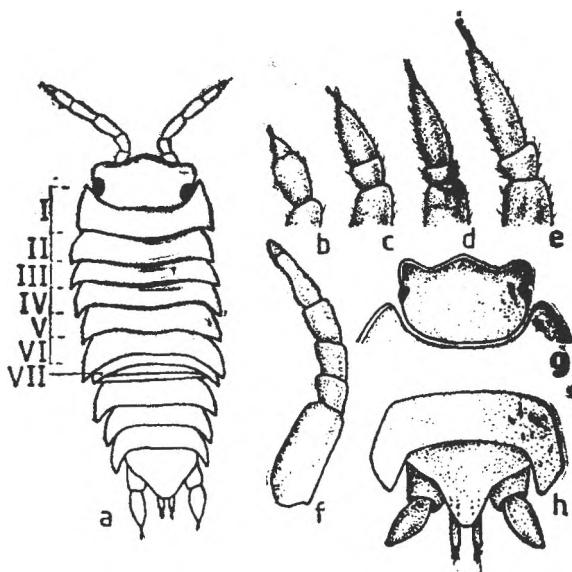


Fig. 1. *Trachelipus difficilis rotundatus* — postmarsupial larval stage.

a — One-day old larva. b-e — Antennae. f — Pereopod VII. g — Cephalon and h — pleotelson of a 30-day old larva.

ced (Fig. 1 d). The pereopods VII, which appear at the age of 5 days, have the aspect of little plaques attached to the sternites. The tegument shows just the beginning of pigmentation. The contour of the lateral cephalic lobes appears at the age of 8 days. At 13 days, the tergal epimers of thoracic segment VII are completely developed. Also, the pereopods VII, which have a filamentous aspect, have grown in length and their articles are differentiated (Fig. 1 f). At the age of 30 days, the larvae are 2.8-mm long. The last antennal article is 4 times longer than the next to the last (Fig. 1 e). The thoracic pereopod VII is completely developed and functional. The cephalic lobes are well developed and the median lobe has a triangular shape (Fig. 1 g). The pleotelson is longer and its tip is rounded (Fig. 1 h). The glandular fields of the epimers, which are now formed, touch the borders of the epimers.

b) *Immature stage*. The external sexual differentiation of *Trachelipus difficilis rotundatus* appears at the age of approximately two months, when the young animals reach the length of over 4 mm. First of all, the endopodite of pleopod 1 of the males lengthens, followed by the exopodite, whose distal extremity lengthens and becomes curved, forming a crescent with the tip directed outward. For a comparative study, we have presented in Fig. 2 the specific characters of an immature of 5.5 mm and one of 7 mm.

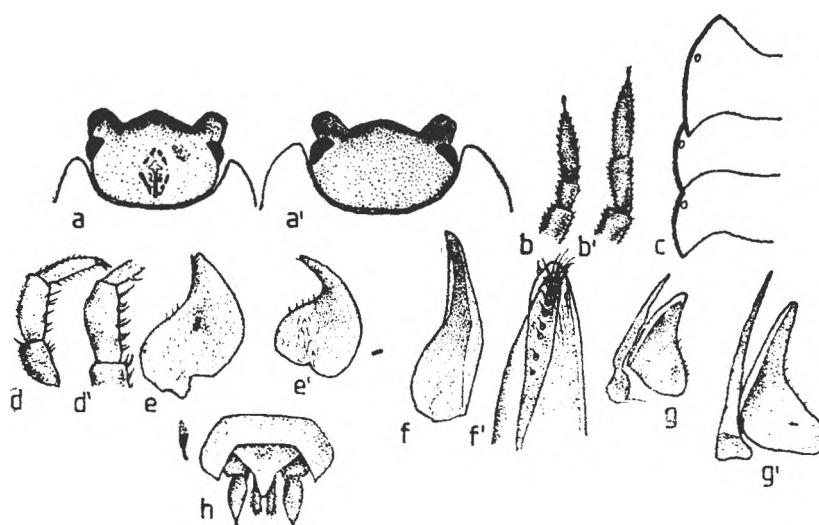


Fig. 2. *Trachelipus difficilis rotundatus* — immature stage. A 5.5-mm immature individual is compared with a 7-mm one.

a, a' — Cephalon. b, b' — Antenna. c — Epimeral glandular fields. d, d' — Carpopodite of pereopod VII. e, e' — Exopodite of pleopod 1. f, f' — Endopodite of pleopod 1. g, g' — Pleopod 2. h — Pleotelson.

The cephalic lobes of the 5.5-mm immature are well developed and the median lobe has a triangular form (Fig. 2 a). The last antennal article is twice as long as the next to the last (Fig. 2 b). The glandular fields touch the borders of the epimers (Fig. 2 c) and the carpopodite has no crest (Fig. 2 d). The distal extremity of the exopodite of pleopod 1 is blunt and lacks the crescent form, characteristic of the species (Fig. 2 e). The endopodite of pleopod 1 is long, like a rod, and lacks the rows of spines and tuft of hair which exist in the adult (Fig. 2 f). The pleotelson and uropods have a shape similar to that of the adults (Fig. 2 h).

After approximately 2½—3 months, the immature individuals reach the length of 7—8 mm. The secondary sexual characters are very pronounced, showing almost the same features found in the adult. The median cephalic lobe has become rounded (Fig. 2 a') and the last two antennal articles are nearly equal (Fig. 2 b'). On the carpopodite of pereopod VII, a crest has formed on the margin without spines (Fig. 2 d'). The distal portion of the exopodite of pleopod 1 has become curved like a crescent (Fig. 2 e') and on the tip of the endopodite of pleopod 1 (gonopod) a row of spines has formed (Fig. 2 f'). The pleopod 2 has already the form which is characteristic of the species (Fig. 2 g and g'). In the first 3—4 months, the rate of growth and development of *Trachelipus difficilis rotundatus* is fairly rapid. The majority of the secondary sexual characters are formed during this time.

c) Adult stage. The new generation reaches the adult stage of development in approximately 10—11 months after the larvae hatch, a pe-

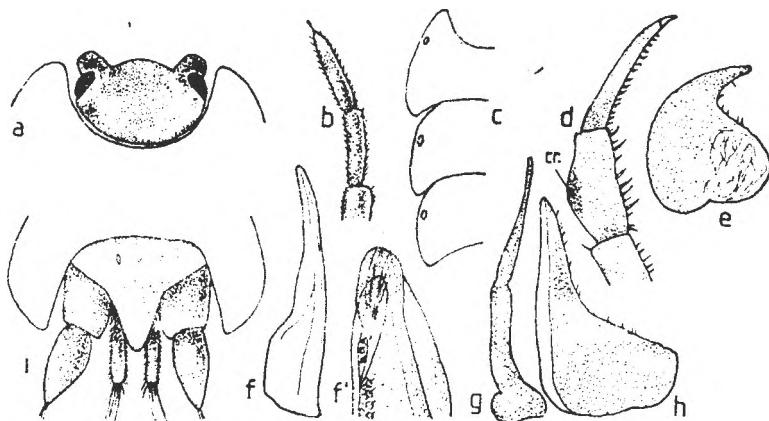


Fig. 3. *Trachelipus difficilis rotundatus* — adult stage.
 a — Cephalon. b — Antenna. c — Epimeral granular fields. d — Carpopodite of pereopod VII. cr. — Crest. e — Exopodite of pleopod 1. f, f' — Endopodite of pleopod 1. g — Exopodite of pleopod 2. h — Exopodite of pleopod 2. i — Pleotelson.

riod which includes the winter months when the processes of growth and development are interrupted. In spring these physiological processes are resumed and the individuals reach maturity around the months of May-June, when they are capable of reproduction. The length of young adults is 8—9 mm. Isopods continue to moult after reaching the adult stage. Thus, the body length in this species can grow up to 16 mm.

The median cephalic lobe is rounded and clearly shorter than the lateral lobes (Fig. 3a). The last two articles of the antenna are of equal length (Fig. 3b). The glandular fields are clearly separated from the border of the epimers (Fig. 3c). The crest of the carpopodite of pereopod VII is formed, extending 3/4 of the length of the article (Fig. 3d). The crescent of the pleopodal 1 exopodite extends beyond the side of its base (Fig. 3e). The endopodite of pleopod 1 is very long and has a tuft of hair on its extremity (Fig. 3f and f'). The endopodite of pleopod 2 is clearly larger than the exopodite (Fig. 3g and h). The pleotelson is longer than the tips of the abdominal epimeral segment 5 (Fig. 3i).

Conclusions. 1. The postembryonic development of *Trachelipus difficilis rotundatus* until the adult stage takes place in 11—1 months.

2. Specific characters appear progressively in the males. First the endopodites of pleopod 1 change their form, becoming longer, after which they are transformed into goniopods. The external morphological characters, such as the crest of the carpopodite of pereopod VII, are formed in the last developmental stage.

REFERENCES

1. Holdich, D.M., Lincoln, J.R., Ellis, P.J., *The biology of terrestrial Isopods: terminology and classification*, „Symp. Zool. Soc. London”, 53, 1984, 1—6.
2. Radu, V.G., Tomescu, N., *Reproduction and ontogenetic development in Trachelipus balticus Verh. 1907*. „Rev. Roum. Biol., Zool.”, 16 (2), 1971, 89—96.
3. Tomescu, N., *Reproduction and ontogenetic development of Protracheoniscus politus C.L. Koch*, „Rev. Roum. Biol., Zool.”, 17 (1), 1972, 31—39.
4. Tomescu, N., *Reproduction and postembryonic ontogenetic development in Ligidium hypnorum (Cuvier) and Trichoniscus pusillus (Brandt 1833)* (Crustacea, Isopoda), „Rev. Roum. Biol., Zool.”, 18 (6), 1973, 403—413.
5. Tomescu, N., *Reproducerea și dezvoltarea postembrionară la Porcellium conspersum C.L. Koch, 1841* (Crustacea, Isopoda), „Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Biol.”, 19 (2), 1974, 109—114.
6. Tomescu, N., *Reproduction et développement ontogénétique post-embryonnaire chez Hyloniscus transsylvanicus Verh. 1901* (Crustacea, Isopoda). „Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Biol.”, 21, 1976, 44—48.
7. Tomescu, N., Crăciun, C., *Postembryonic ontogenetic development in Porcellio scaber* (Crustacea: Isopoda), „Pedobiologia”, 30, 1987, 345—350.

REPRODUCTION OF TERRESTRIAL ISOPODS OF CHEILE TURZII NATURAL RESERVATION (ROMANIA)

NICOLAE TOMESCU*, SHARON ACCOLA* and CRISTINA BERCIU*

SUMMARY. — Aspects of the reproduction of some terrestrial isopod species collected in Cheile Turzii (*Ligidium hypnorum*, *Protracheoniscus politus*, *Porcellium collicolum*, *Trachelipus nodulosus*, *T. difficilis rotundatus*, *Armadillidium vulgare*, *A. versicolor* and *A. carniolense*) are described. The sex ratio (male: female) is 50:50% in *A. carniolense*, 40:60% in *P. politus*, *P. collicolum* and *A. versicolor*, 60:40% in *T. nodulosus* and *A. vulgare*, 55:45% in *T. difficilis rotundatus*, and 70:30% in *L. hypnorum*. The reproductive period is May-August for *A. vulgare* and *A. carniolense*, May-September for *L. hypnorum*, *P. collicolum* and *T. difficilis rotundatus*, May-October for *P. politus* and *A. versicolor*, and April-October for *T. nodulosus*. The period of maximum reproduction (with the greatest number of gravid females) is in July. *A. carniolense* is an exception, having its peak in August. The fertility of the females was over 80% in the species *P. politus*, *P. collicolum*, *T. nodulosus*, *T. difficilis rotundatus* and *A. versicolor*, between 50 and 60% for *L. hypnorum* and *A. vulgare* and below 40% for *A. carniolense*. Fecundity is correlated with body size, even within the framework of the same species. However, there exist genetically determined significant interspecific differences between species of the same size. For example, females of *A. vulgare* with a body length of 15–16 mm produce an average of 160 embryos, while females of *T. difficilis rotundatus* of the same size produce an average of 80 embryos.

The reproduction of terrestrial isopods presents specific particularities, genetically determined, as well as intraspecific differences, which are determined by the variability of ecological factors, especially climatic ones. In the species which have a large area of distribution, such as *Armadillidium vulgare* and *Trachelipus nodulosus*, there exist pronounced interpopulational differences regarding reproduction, growth and development, population size, the period of biological activity, etc. In our research, we studied aspects of reproduction, which are influenced by ecological particularities of Cheile Turzii.

Materials and methods. The material we studied was collected in Cheile Turzii, a natural reservation located 35 km from Cluj-Napoca. More than 17,300 animals were collected over a period of two years, 1991 and 1992, using Barber traps. The traps were emptied after every two weeks. In the laboratory the species were identified, the individuals were sexed, counted and measured. The eggs and embryos in the brood pouch of the gravid females were counted.

Results and discussions. The sex ratio of the 8 species collected in Cheile Turzii is presented in Fig. 1. We calculated the percent of males and females for each year, as well as for the two years together. In the majority of species, the proportion between males and females was similar for both years. In some species there was a slight predominance

* Babes-Bolyai University, Department of Zoology, 3400 Cluj, Romania

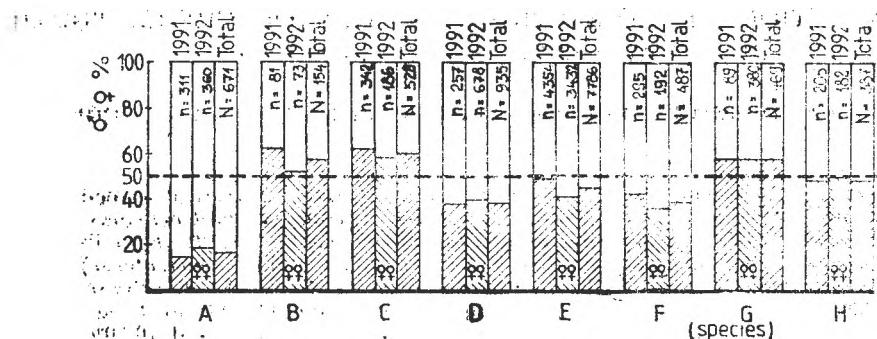


Fig. 1. Male:female ratio of terrestrial isopods in Cheli-Turzii.
 A - *Ligidiump hypnorum*. B - *Protracheoniscus politus*. C - *Porcellium collicolum*. D - *Trachelipus nodulosus*. E - *Trachelipus difficilis rotundatus*. F - *Armadillidium vulgare*. G - *Armadillidium versicolor*. H - *Armadillidium carniolicense*.

of the females and in others, of the males. The number of females exceeds the number of males by nearly 10% in *P. politus*, *P. collicolum* and *A. versicolor*. In *T. nodulosus* and *A. vulgare*, the number of females is slightly reduced, being approximately 10% less than that of the males; whereas it is 5% less in *T. difficilis rotundatus* and over 30% less in *L. hypnorum* than the number of males. In *A. carniolicense*, the proportion of males to females is equal in both years.

The sex ratio of the adults of natural populations can be influenced by physiological and ecological factors, as well as the behavioural differences between males and females. The gravid females of *L. hypnorum* feed very little, remaining in hiding during this period. The males are more mobile and thus more exposed to predators. After reproduction, the ratio changes in favour of the females [4]. In the collections of *L. hypnorum* captured with Barber traps, fewer females were present, due to the fact that this method depends on the mobility of the animals. It is possible that the same phenomenon occurs in all species in which the percent of females appears more reduced in collections taken from the ecosystem by Barber traps.

A larger number of *P. politus* males die shortly after the reproductive season [3]. In all of the amphimictic isopod species, the greater number of females in the population should be an advantage, due to the fact that the specific biological reproductive potential is increased.

The reproductive period corresponds to the season in which the ecological factors are optimal and the number of broods varies according to the length of these conditions, especially to the climate [1, 2]. In Europe, the number of broods increases from the north to the south [5] and the duration of the developmental stages of the young is shortened. The formation of the brood pouch preceded by copulation, which takes place, probably, several days before the eggs are deposited in the brood pouch. The start of the reproductive season should be considered as beginning at least a week before the appearance of the first

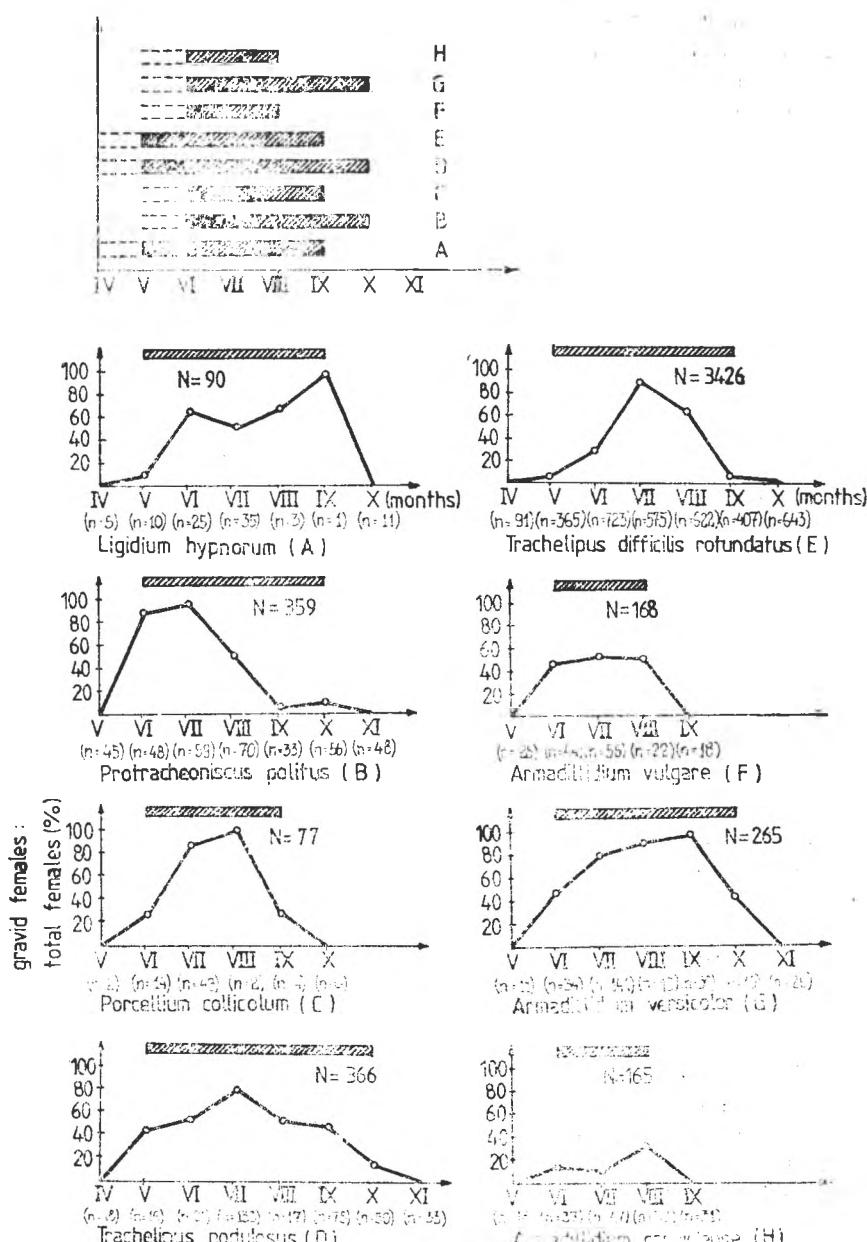


Fig. 2. Percentage of gravid females compared to the total number of adult females collected during the reproductive period and the length of the reproductive period (hatched bars) of the species collected in Cheile Turzii.

ovigerous females. The reproductive periods of the species of terrestrial isopods in Cheile Turzii, established on the basis of material collected in these two years, are presented in Fig. 2 (the hatched bars). The interrupted lines represent the potential mating period. *A. vulgare* and *A. carniolense* have the shortest reproductive periods and *L. hypnorum*, *P. politus*, *T. nodulosus*, *T. difficilis rotundatus* and *A. versicolor* have the longest periods. The length of the reproductive period can be influenced, in the first place, by the number of broods produced per year by the females of the species and also by their age. The species in which the immature individuals reach the adult stage in the first year of life, the females produce only one brood in the first year and two broods the second and third years. In *L. hypnorum*, *T. nodulosus* and *T. difficilis rotundatus*, the 2- and 3-year-old females produce the first brood earlier, in June-July, and the second in August-September, some even in October.

Fig. 3 is a phenogram of reproductive activity, representing the number of ovigerous females collected each month compared to the total number of gravid females collected. *A. carniolense* has its reproductive peak in August and the other species in July. A relatively large percent of gravid females of the species *P. politus*, *T. difficilis rotundatus*, *A. vulgare* and *A. carniolense* were also collected in August. In September we found gravid females of *T. nodulosus* and *A. versicolor*. The large number of ovigerous females in July is due to the fact that in this month the adult females of all ages are gravid, with different stages of embryos. In the months of August and September, only the 2- and 3-year old females have a pouch, this being their second brood. This category represents a small percent of the adult female population.

Fertility of the females was calculated using the number of embryos in the different developmental stages in the ovigerous pouch related to the total number of female adults (Fig. 2). If we take into consideration the months in which the largest number of females were collected, we find interspecific differences regarding the percent of fertile females. In the period of maximum activity, over 80% of the females of *P. politus*, *P. collicolum*, *T. nodulosus*, *T. difficilis rotundatus* and *A. versicolor* were fertile. In the species *L. hypnorum* and *A. vulgare*, the percent of fertile females is between 50 and 60%, and the lowest frequency, of less than 40%, was found in *A. carniolense*.

Fecundity is calculated for the 6 species in which we have enough specimens. It is expressed by the median values calculated for each species and, in the framework of a species, is calculated according to size class, which also expresses age classes (Fig. 4). Our results indicate two different aspects. The number of embryos produced by a female varies according to her body size and also according to specific reproductive characters, which are inscribed in the genotype of the species. The females of species which have a smaller body size, for example *L. hypnorum* and *P. politus*, produce fewer eggs than species which have a larger body size, such as *T. difficilis rotundatus* and *A. vulgare*. However, if we compare the last two species, which are of a similar length,

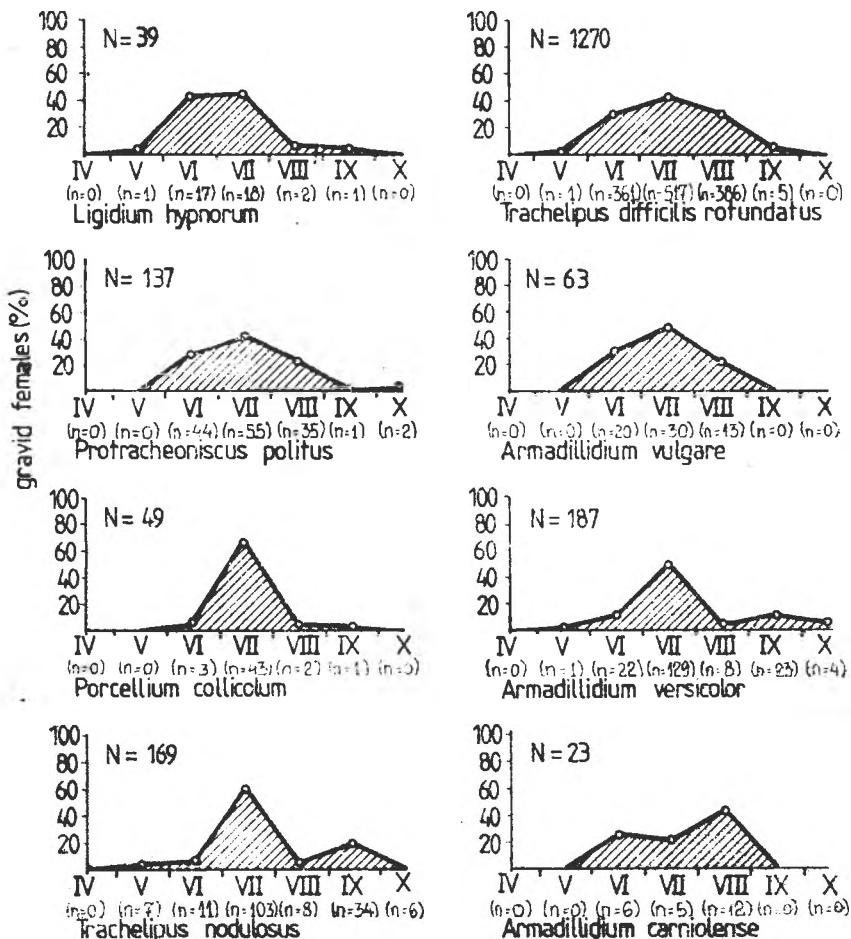


Fig. 3 Reproductive phenogram of the species of isopods in Cheile Turzii (the number of females collected monthly, compared to the total number of gravid females).

We observe that the fecundity of *A. vulgare*, in which the females of 15 to 16 mm produce an average of 160 eggs, is greater, while the females of *T. difficultis rotundatus* of the same length produce only an average of 80 eggs. We consider that the greater fecundity of the first species is a consequence of a higher mortality rate in the early stages of development, which is caused by the pressure of ecological factors of the ecosystem in which this species lives. *A. vulgare* populates arid ecosystems, where death of the young animals by desiccation, especially during moulting, occurs more frequently. *T. difficultis rotundatus* lives under the leaf litter of deciduous woods, where humidity is high and the conditions that produce desiccation are greatly reduced.

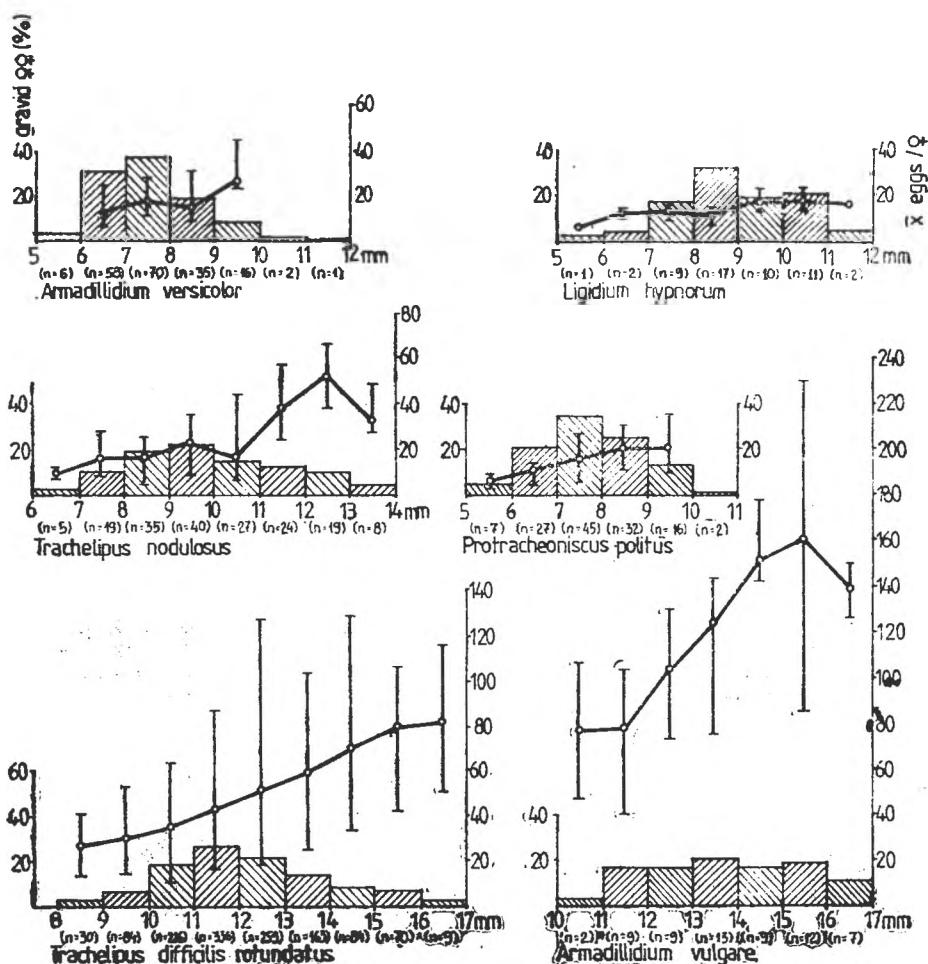


Fig. 4. Fecundity of the species of terrestrial isopods from Cheile Turzii as related to body size and expressed as the average number of embryos per female, the bars marking the minimum and maximum number of embryos.

In each species, there exists a relationship between female body size (and age) and fecundity. One finds, in general, a linear increase of fecundity, correlated with the body size. In the species with a greater fecundity, for example *T. difficilis rotundatus* and *A. vulgare*, there exist large variations among females of the same size. The variations are narrower in the other species, such as *L. hypnorum*, *P. politus* and *A. versicolor*, which have a lower fecundity.

Conclusions. 1. The sex ratio of the species of isopods in Cheile Turzii varies within certain limits: 40–60% (male: female) for *P. colliculum*, *P. politus* and *A. versicolor*, 40:60% for *T. nodulosus* and *A. vulgare*, 70:30% for *L. hypnorum* and 50:50% for *A. carniolense*.

2. The reproductive period at populational level varies according to the number of broods produced by the females of each species. It is shorter (May-July) in the species which produce one brood per year, and longer (May-September) in the species which produce two broods.

3. Fecundity is proportional to the size and age of the females, as well as the genetic peculiarities of the species.

R E F E R E N C E S

1. Paris, O. H., Pitelka, F. A. *Population characteristics of the terrestrial isopod Armadillidium vulgare in California grassland*, „Ecology“, **43** (2), 1962, 229—248.
2. Sutton, S. L., Hassall, M., *Life histories of terrestrial isopods: A study of intra- and interspecific variation*, „Symp. Zool. Soc. London“, **53**, 1984, 269—294.
3. Tomescu, N., *Reproduction and ontogenetic development of Protracheoniscus politus C.L. Koch*, „Rev. Roum. Biol., Zool.“, **17** (1), 1972, 31—39.
4. Tomescu, N., *Reproduction and postembryonic ontogenetic development in Ligidium hypnorum (Cuvier) and Trichoniscus pusillus (Brandt 1833)* (Crustacea, Isopoda), „Rev. Roum. Biol., Zool.“, **18** (6), 1973, 403—413.
5. Warburg, M. R., Linsenmaier, K. E., Berkovitz, K., *The effect of climate on the distribution and abundance of isopods*, „Symp. Zool. Soc. London“, **53**, 1984, 339—367.

REVIEW OF THE NEOGENE WATERFOWL (AVES: ANATIDAE) OF EASTERN PARATETHYS

EUGEN KESSLER*

SUMMARY. — The types of 7 waterfowl species described from the Neogene of Eastern Paratethys were restudied. The following systematic changes were proposed: *Anas* sp. from Credința and Mălușteni becomes *Dendrochen blanchardi*, *Anas* sp. from Kishinev is reclassified as *Dendrochen natator*, *Aythya* sp. from Credința becomes *Aythya chauvira*, *Anser* sp. from Credința is reviewed as *Anserobranta tarabukinii* (this type from Kishinev and *Anas velox* from Credința were reconfirmed). I could not examine the types of *Anas* sp., *Anatinæ* and *Merginae* sp. indet. from Kishinev (described by Kurochkin and Ganea).

In the Neogene avifauna from Eastern Paratethys there are known [11] described one taxon: *Anas* sp. from Mălușteni — Berești (România, Kurochkin and Ganea [13] described 4 taxa: *Anserobranta tarabukinii*, *Anas* sp., *Anatidae* and *Merginae* sp. indet. from Kishinev and Bujoru (R. Moldova); Kessler [12] identified two taxa: *Anserobranta tarabukinii* and *Anas* sp. from Kishinev; Grigorescu and Kessler [8, 9] recognized 4 taxa: *Anas* cf. *velox*, *Anas* sp., *Aythya* sp. and *Anser* sp. from Credința (Romania, South Dobrogea); Kessler [11] described one taxon: *Anas* sp. from Mălușteni — Berești (Romania, Eastern Moldova).

In addition, one entire humerus, collected by D. Grigorescu, in the sites of Credința, was recognized recently by the author.

The age of the deposits from Upper Miocene (Kishinev, Bujoru, Credința) was established on the basis of molluscan and ostracod microfauna in Lower Bassarabian [7, 10, 13]. The age of the faunal complex from Mălușteni — Berești was determined as Middle Pliocene on the basis of mammal remains and stratigraphic data in Ruscianian, MN15 and MN15 a [17].

Results and discussion.

Order *Anseriformes* (Wagler, 1831)

Family *Anatidae* Vigors, 1825

Subfamily *Anatinæ* (Vigors, 1825)

Genus *Anas* L., 1758

Anas velox Milne-Edwards, 1867—71

Syn. *Nettion velox* (Milne-Edwards, 1867—71)

Locus typicus: Sansan (Gers, France).

Stratum typicum: Miocene, Astaracian, MN6.

Material: right ulna, proximal fragment (LPUB 273) (Fig. 1).

* Babeş-Bolyai University, Department of Zoology, 3400 Cluj, Romania

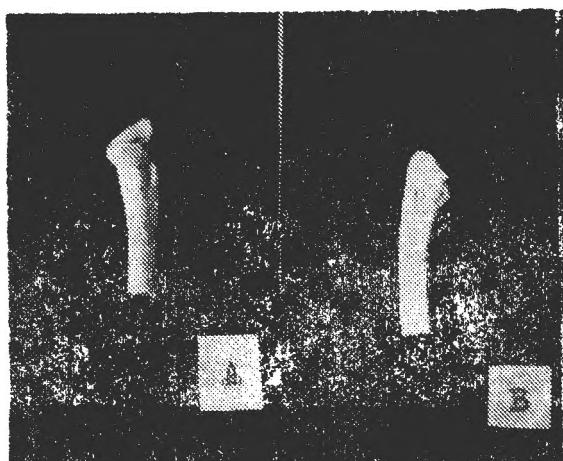


Fig. 1. *Anas velox* Milne—Edwards, 1867—71—right ulna (LPUB 273). proximal fragment. A — Cranial aspect. B — Caudal aspect.

Locality: Credința (South Dobrogea, Romania).

Age: Upper Miocene (Middle Sarmatian, Lower Bassarabian, 12.5 m.y.).

Locality: Credința (South Dobrogea, Romania).

Age: Upper Miocene (Middle Sarmatian, Lower Bassarabian, 12.5 m.y.).

Size (Table 1).

Description and remarks: the size and the characters of the fossil species from Sansan seem to be closest to the referred material [1—6, 14].

Genus *Aythya* Boie, 1822
Aythya chauvireae Cheneval, 1987

Locus typicus: Sansan (Gers, France).

Stratum typicum: Miocene, Astaracian, MN6.

Material: entire left radius (LPUB 260) (Fig. 2).

Table 1

Measurements of *Anas velox* Milne—Edwards, 1867—71 remains

| Remains and measurements | Credința | | Sansan | | |
|---|-------------------|-----------|-------------------|------------------|-----------|
| | Number of remains | Size (mm) | Number of remains | Size limits (mm) | Mean (mm) |
| Ulna (proximal epiphysis and shaft): | | | | | |
| — breadth of proximal epiphysis | 1 | 6.1 | 2 | 5.98—6.58 | 6.3 |
| — diagonal of proximal epiphysis | 1 | 5.2 | 2 | 5.10—5.74 | 5.4 |
| — thickness of shaft | 1 | 3.1 | 1 | 3.2 | — |

Size: length of entire radius — 53.4 mm, breadth of proximal epiphysis — 3.1 mm, thickness of proximal epiphysis — 3.6 mm, breadth of distal epiphysis — 4.1 mm, thickness of diaphysis — 1.8 mm.

Description and remarks: the fossil remains presented the characters of recent genera and the size is close to that of fossil species described by Cheneval [5] on the basis of one entire femur.

Subfamily *Dendrocygninae* Reichenbach, 1850

Genus *Dendrochen* Miller, 1944

Dendrochen blanchardi (Milne-Edwards, 1863)

Syn. *Anas blanchardi* Milne-Edwards, 1863

Locus typicus: Saint-Gérand-le-Puy (Allier, France).

Stratum typicum: Miocene, Aquitanian.

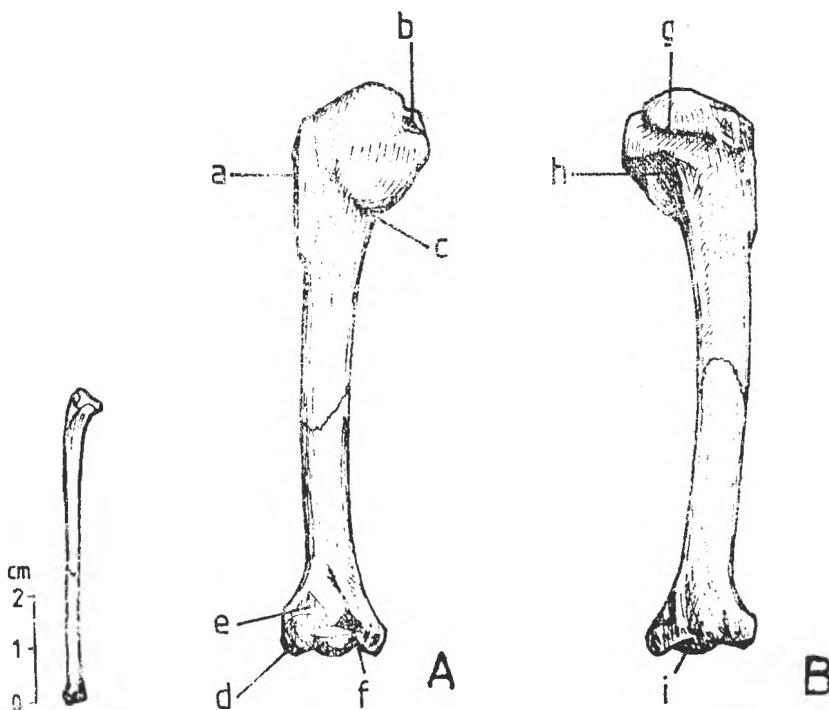


Fig. 2. *Aythya chauvireae*
Cheneval, 1987
—left radius
(LPUB 260),
caudal aspect.

Fig. 3. *Dendrochen blanchardi* (Milne-Edwards, 1863) —
left humerus (LPUB 283). A — Cranial aspect. B —
Caudal aspect. a — Crista pectoralis. b — Sulcus ligamen-
tosus transversus. c — Sulcus bicipitalis. d — Condylus
dorsalis. e — Fossa musculi brachialis. f — Incisura intercon-
dylaris. g — Incisura capitis. h — Foramen pneumaticum.
i — Fossa oleocranii.

Material: entire left humerus (Credința, LPUB 283) (Fig. 3), right radius, distal fragment (Credința, LPUB 272) (Fig. 4), left coracoid cra-
nial fragment (Mălușteni — Berești, LPUB 270 a.) (Fig. 5).

Locality: Credința (South Dobrogea, Romania) and Mălușteni — Berești
(Eastern Moldova, Romania).

Age: Upper Miocene (Middle Sarmatian, Lower Bassarabian) for Credința, Middle Pliocene (Ruscinian, MN15 and MN15 a) for Mălușteni — Berești.

Size (Table 2).

Description and remarks: the procoracoid process of coracoid is short and pointed; the profound pit in the inner side of acrocoracoid is absent; the sulcus bicipitalis of humerus is less characteristic and deep; the foramen pneumaticum is very broad and deep; the fossa oleocranii is small but deep; the general appearance of radius is more robust; the caput radii is broad (after diagnosis); the distal epiphysis is broad and the proeminencia ligamenti radiocarpale is thick [1—6].

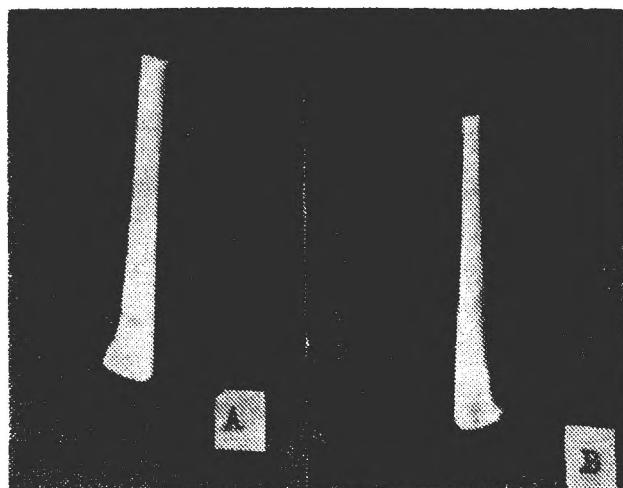


Fig. 4. *Dendrochen blanchardi* (Milne—Edwards, 1863) — right radius (LPUB 272), distal fragment. A — Cranial aspect. B — Caudal aspect.

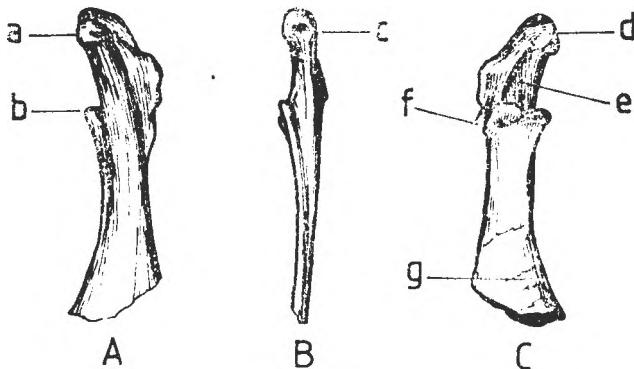


Fig. 5. *Dendrochen blanchardi* (Milne—Edwards, 1863) — left coracoid (LPUB 270 a), shoulder extremity. A — Ventral aspect. B — Medial aspect. C — Dorsal aspect. a — Processus acrocoracoideus. b — Processus procoracoideus. c — Facies articularis clavicularis. d — Impressio ligamenti acrocoracohumeralis. e — Sulcus musculi supracoracoidei. f — Facies articularis humeralis. g — Impressio musculi sternocoracoidei.

Dendrochen natator (Milne-Edwards, 1867—71)

Syn. *Anas natator* Milne-Edwards, 1867—71

Locus typicus: Saint-Gérand-le-Puy (Allier, France).

Stratum typicum: Miocene, Aquitanian.

Material: right humerus, fragment distal (LPUB 273/3), right entire ulna (LPUB, 274/4).

Locality: Kishinev (R. Moldova).

Table 2

Measurements of *Dendrochen blanchardi* (Milne—Edwards 1868)
remains

| Remains and measurements | Referred material | | Saint-Gérand-le-Puy | | |
|---------------------------------|---------------------|--------------------|---------------------|------------------|-----------|
| | Number of remains | Size (mm) | Number of remains | Size limits (mm) | Mean (mm) |
| Coracoid : | (Mălușteni—Berestî) | | | | |
| — length of entire bones | 1 | estimated to 38—40 | 71 | 37.1—44.2 | 40.8 |
| Humerus : | (Credința) | | | | |
| — length of entire bones | 1 | 73.73 | 71 | 69.1—79.2 | 74.9 |
| — breadth of proximal epiphysis | 1 | 17.25 | 111 | 14.5—18.4 | 16.5 |
| — thickness of shaft | 1 | 5.81 | 209 | 4.2—6.0 | 5.1 |
| — breadth of distal epiphysis | 1 | 12.00 | 227 | 9.4—12.3 | 11.2 |
| Radius : | (Credința) | | | | |
| — length of entire bones | 1 | estimated to 57—60 | 70 | 59.3—68.9 | 63.2 |
| — breadth of distal epiphysis | 1 | 5.2 | 114 | 5.0—6.1 | 5.6 |
| — thickness of shaft | 1 | 2.6 | 105 | 2.1—2.7 | 2.4 |

Table 3

Measurements of *Dendrochen sator* (Milne—Edwards, 1867—71)
remains

| Remains and measurements | Referred material | | Saint-Gérand-le-Puy | | |
|---------------------------------|-------------------|--------------------|---------------------|------------------|-----------|
| | Number of remains | Size (mm) | Number of remains | Size limits (mm) | Mean (mm) |
| Humerus : | (Kishinev) | | | | |
| — length of entire bones | 1 | estimated to 59—60 | 3 | 56.7—62.5 | 58.8 |
| — breadth of shaft | 1 | 4.7 | 4 | 4.7—4.8 | 4.7 |
| — breadth of distal epiphysis | 1 | 9.8 | 4 | 9.2—9.8 | 9.5 |
| Ulna : | (Kishinev) | | | | |
| — length of entire bones | 1 | 56.9 | 8 | 50.8—58.8 | 56.9 |
| — breadth of proximal epiphysis | 1 | 6.7 | 10 | 6.2—6.9 | 6.7 |
| — breadth of shaft | 1 | 3.8(!) | 11 | 3.2—3.6 | 3.3 |
| — breadth of distal epiphysis | 1 | 4.7 | 10 | 4.6—5.7 | 5.2 |

Age: Upper Miocene (Middle Sarmatian, Lower Bassarabian).

Size (Table 3).

Description and remarks: the approximate length of whole humerus in about 56—58 mm (absence of caput humeri); the condylus exter-

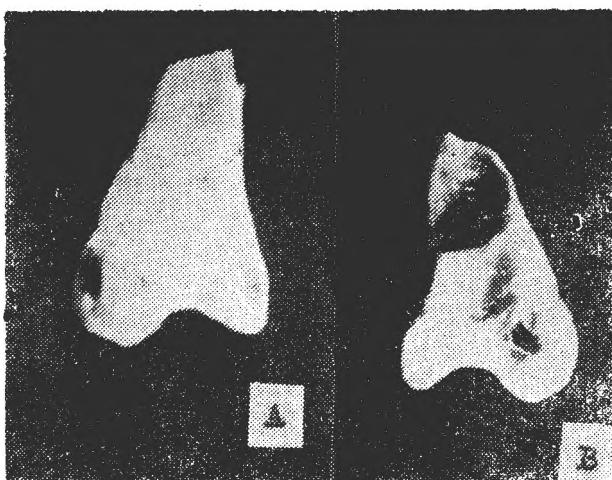


Fig. 6. *Anserobranta tarabukinii* Kurochkin et Ganea, 1972—right femur (LPUB 271), distal fragment. A—Cranial aspect. B—Caudal aspect.

nus is narrow and the fossa oleocranii is less deep; the condylus metacarpalis of ulna is blunt and broad; the tuberculum carpale is quite blunt [1—6].

Subfamily *Anserinae* Vigors, 1825

Genus *Anserobranta* Kurochkin et Ganea, 1972
Anserobranta tarabukinii Kurochkin et Ganea, 1972

Locus typicus: Kishinev (R. Moldova).

Stratum typicum: Upper Miocene (Middle Sarmatian).

Material: left humerus (LPUI 60 MS), right femur, distal fragment (LPUB 271) (Fig. 6).

Locality: Kishinev (R. Moldova) — for humerus; Credința (South Dobrogea, Romania) — for femur.

Age: Upper Miocene (Middle Sarmatian, Lower Bassarabian).

Size: estimated length of entire humerus is 170—175 mm; breadth of shaft — 11.2 mm; breadth of distal epiphysis — 23.6 mm; thickness of distal epiphysis — 13.1 mm; estimated length of entire femur is 70—72 mm; breadth of the distal epiphysis — 17.6 mm; thickness of the distal epiphysis — 11.5 mm.

Description and remarks: the humerus remain was described by Macarović and Oescu [15] as *Cygnus* sp. and was recognized by Kessler [12]. The type species was described on the basis of a richer material: fragments of ulna, carpometacarpus, radius, tarsometatarsus with intermediate characters between *Anser* and *Branta*, but humerus and femur bones were lacking.

The femur and humerus fragments from Credința and Kishinev presented these characters, and their size is close to that of the recent species *Anser albifrons* Scopoli and *Branta leucopsis* Bechstein [2, 13, 16].

Conclusions. Seven waterfowl type materials from Neogene of Eastern Paratethys were revised.

1. *Dendrochen blanchardi* (Milne-Edwards, 1863) was identified on the basis of *Anas* sp. from Credința and Mălușteni — Berești;
- *Dendrochen natator* (Milne-Edwards, 1876—71) was recognized on the basis of *Anas* sp. from Kishinev;
- *Aythya* sp. from Credința becomes *Aythya chauvirae* Cheneval, 1987;
- *Anserobranta tarabukinii* Kurochkin et Ganea, 1972 was identified on the basis of *Anser* sp. from Credința and was confirmed based on the specimen from Kishinev;
- *Anas velox* Milne-Edwards, 1867—71 was reconfirmed from Credința.

2. Four new taxa for fossil bird fauna of Romania: *Aythya chauvirae*, *Dendrochen blanchardi*, *Dendrochen natator* and *Anserobranta tarabukinii* were identified.

3. There are known 29 taxa in the Eastern Paratethys from Neogene.

4. The bird fauna discovered in the Middle Sarmatian of Eastern Paratethys is represented by a typical marine association (*Procellariiformes*, *Pelecaniformes*, *Anseriformes* etc.). They lived on the Cretaceous limestone islands. The fauna described from Mălușteni—Berești is a typical steppe—forest steppe association.

5. The list of species includes paleornithological assemblages similar to those from Saint-Gérand-le-Puy in France, but with different taxa.

REF E R E N C E S

1. Baumel, J. J., King, A. S., Lucas, A. M., Breazile, J. E., Evans, H. E., *Nomina anatomica avium*. Acad. Press, London, 1979.
2. Brodkorb, P., *Catalogue of fossil birds, Part 2 (Anseriformes through Galliformes)*, „Bull. Florida State Museum”, 8 (3), 1964, 195—335.
3. Cheneval, J., *Les Anatidae (Aves, Anseriformes) du gisement aquitanien de Saint-Gérand-le-Puy (Allier, France)*, „Actes du Symp. Georges Cuvier, Montbéliard — France”, 1982, 85—99.
4. Cheneval, J., *Les oiseaux aquatiques (Gaviiformes à Anseriformes) du gisement aquitanien de Saint-Gérand-le-Puy (Allier, France): Révision systématique*, „Paleovertebrata”, 14 (2), 1984, 33—115.
5. Cheneval, J., *Les Anatidae (Aves, Anseriformes) du miocène de France. Révision systématique et évolution*, „Doc. Lab. Géol. Lyon”, 99, 1987, 137—157.
6. Cheneval, J., *Fossil burd study, paleological and paleoenvironmental consequences: example from the Saint-Gérand-le-Puy deposits (Lower Miocene, Allier, France)*, „Palaeogeogr., Palaeoclimatol. Palaeoecol.”, 73, 1989, 295—309.
7. Godina, A. I., David, A. I., *Neogenovye mestorozhdeniya pozvonochnykh na territorii Moldavskoi SSR*, pp. 20—32, Știința, Kishinev, 1974.
8. Grigorescu, D., Kessler, E., *The Middle Sarmatian avian fauna of South Dobrogea*, „Rev. Roum. Géol., Géophys. Géogr., Sér. Géol.”, 21, 1977, 93—108.
9. Grigorescu, D., Kessler, E., *New contributions to the knowledge of the Sarmatian birds from South Dobrogea in the frame of the Eastern Paratethys avifauna*, „Rev. Roum. Géol., Géophys. Géogr., Sér. Géol.”, 32, 1988, 91—97.

10. Hanganu, E., Grigorescu, D., *Ostracofauna din nisipurile sarmatiene ale Dobrogei de Sud (sectorul Cobadin — Cotu Văii)*, „Stud. Cercet. Geol.” 26 (2), 1981, 309—313.
11. Kessler, E., *On some bird remains from the Pliocene of Mălușteni, in the Laboratory of Paleontology — University of Bucharest, in 75 years of the Laboratory of Paleontology — University of Bucharest*, pp. 287—293, 1984.
12. Kessler, E., *Noi contribuții privind studiul avifaunei din Paratethys*, „Crisia”, 14, 1984, 521—532.
13. Kurochkin, E. N., Ganea, I. M., *Ptitsy srednogo sarmata Moldavii, pozvonochnye Neogena i Pleistotsena Moldavit*, Știinta, Kishinev, 1972.
14. Lambrecht, K., *Handbuch der Paleornithologie*, Borntraeger, Berlin, 1933.
15. Macarovică, N., Oescu, C. V., *Quelques vertébres fossiles trouvés dans les calcaires recifales de Chișinău*, „An. Acad. Rom., Mem. Sect. Științ., Ser. III”, 17, 1941, 351—379.
16. Mikovský, J., Svec, P., *Review of the Tertiary waterfowl (Aves, Anseridae) of Aslt*, „Vest. ČS. Spolec. Zool.”, 50, 1986, 249—272.
17. Terzea, E., *Remarques sur la biostratigraphie du Pliocène de sud de la Plaine Roumaine (Zone de Turnu-Măgurele)*, „Trav. Inst. Spéol. 'Em. Racoviță'', 20, 1981, 113—126.
18. Woelfle, E., *Vergleichende morphologische Untersuchungen an Einzelknochen des postkranialen Skeletts in Mitteleuropa vorkommender Enten, Halbgänse und Säger*, Diss., Ludwig-Maximilian-Univ., München, 1967.

CULTIVAREA MASIVĂ A TULPINELOR BACTERIENE
PRODUCĂTOARE DE LEVAN NECESAR PENTRU INDUCEREA
SINTEZEI LEVANAZEI

MIHAIL DRAGAN-BULARDA*, ȘTEFAN KISS*, DANIELA PASCA**,
RADU CRIȘAN**, VASILE MUNTEAN** și ELENA MANOLACHE*

SUMMARY. — **Massive Cultivation of Bacterial Strains Producing Levan Necessary for Induction of Levanase Synthesis.** Several levan-producing bacterial strains were isolated from different sources (soil, therapeutic mud, saliva). They were cultured on sucrose-containing media and their capacity to produce levan was evaluated by paper-chromatographic analysis of the culture liquids. Two *Bacillus* strains (UBB—B26 and UBB—B55) producing great amounts of levan were selected for massive cultivation. The levan separated from their mass cultures can be used for induction of levanase synthesis in microorganisms.

Levanele sunt polizaharide bacteriene, mai precis fructane, polimeri naturali ai tructozei, la care legăturile principale sunt de tipul β ($2 \rightarrow 6$), iar ramificările se realizează prin legături α ($2 \rightarrow 1$). Din acest motiv, ele se mai numesc și β ($2 \rightarrow 6$)—D—fructane [4]. Levanele au o greutate moleculară mică, în general mai mică de 5000 [4].

Biosinteza levanului necesită enzima levansucrază (EC 2.4.1.10) (sucrozo—6—fructoziltransferază) [3], care manifestă specificitate pentru zaharoză [6].

Cele mai multe cercetări privind biosinteza levanului au vizat levansucraza din *Bacillus subtilis*, *Aerobacter levanicum* și *Streptococcus salivarius*. Levansucraza de *Bacillus subtilis* s-a dovedit a fi o enzimă exocelulară și induată, în timp ce levansucraza de la *Aerobacter levanicum* este endocelulară și constitutivă [1].

Este încă incert dacă levansucraza este un complex enzimatic sau doar o singură enzimă. Sub acțiunea levansucrazei, cîte un rest de fructofuranozil se leagă treptat la gruparea hidroxilică de la atomul de C 6 al restului terminal nereducător de fructoză din lanțul de levan în curs de creștere [4].

Levanaza este o polizaharidază (2,6— β —fructanohidrolază; EC 3.2.1.65) [3], produsă de mai multe microorganisme (bacterii, actinomicete, micromicete); hidrolizează lanțurile de levan [9]. S-a dovedit că levanaza este o enzimă induată (adaptativă). Din acest motiv, la mediul pentru cultivarea microorganismelor producătoare de levanază este nevoie de substratul enzimei (levan), care reprezintă și inductorul enzimatic [7, 8].

În această lucrare sunt prezentate rezultatele noastre privind izolarea unor tulpi microbiene levanosintetizante și cultivarea masivă a acestora pentru producerea de levan, necesar pentru inducerea levanazei.

* Universitatea Babes-Bolyai, Catedra de biologie vegetală, 3400 Cluj, România

** Institutul de Cercetări Biologice, 3400 Cluj, România

Material și metodă. Mediul nutritiv utilizat pentru izolarea microorganismelor levanosintetizante a avut următoarea compozitie [5]: zaharoză 100 g, KCl 2,5 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1 g, peptonă 0,5 g, apă distilată 396 ml. Sterilizarea s-a efectuat la 105°C, 30 minute, în 3 zile consecutive. Inocularea mediului s-a efectuat cu mai multe surse mixte de microorganisme (sol, nămol terapeutic, salivă). S-au efectuat 3 serii de experiențe.

O primă serie a avut drept scop izolarea de microorganisme levanosintetizante (în eprubete), selectându-le pe cele mai productive. Incubarea a avut loc la 30°C, timp de 10 zile. Analiza culturilor obținute în vederea detectării sintezei levanului s-a efectuat prin metoda cromatografiei pe hirtie [10], tehnică circulară. Hirtia utilizată a fost Whatman 1. Cantitatea lichidului analizat a fost de 9 μl . Developarea a durat 2,5 ore, la temperatura camerei. Sistemul de dizolvanți a conținut: *n*-propanol-acetat de etil—apă în proporție de 6:1:3 vol./vol./vol. Cromatogramele dezvoltate au fost detectate, utilizând un reactiv pe bază de uree și acid o-fosforic, care relevază cetoze libere (fructoza) și cele combinate (levanul).

În a doua serie au fost selectate 5 tulpi microbiene, care au fost cultivate în condiții statice (pe medii nutritive neagitate), în baloane de 750 ml (400 ml mediu nutritiv/balon). Incubarea a avut loc la 30°C, tot 10 zile. Analiza cromatografică a stabilit intensitatea sintezei levanului. Cantitatea levanului sintetizat s-a determinat prin precipitarea lui cu alcool etilic în proporție de 3:1 (3 părți alcool și o parte lichid de cultură centrifugat în prealabil la 4500—5000 turări/minut, timp de 30—60 minute). Precipitatul obținut din 100 ml lichid de cultură s-a uscat în exicator cu CaCl_2 siccum și apoi s-a stabilit cantitatea acestuia la balanța analitică. Levanul obținut a fost verificat cromatografic, dovedindu-se a fi pur, lipsit de impurități (cetoze libere).

În a treia serie de experiențe s-a determinat creșterea a două tulpi microbiene care s-au dovedit a fi cele mai productive în sinteza levanului, cultivarea lor având loc în baloane de 1000 ml (800 ml mediu nutritiv/balon). Pentru cultivare s-au folosit două concentrații de zaharoză (25% și respectiv 15%). Din culturile celor două tulpi s-au efectuat preparate microscopice. Acestea s-au colorat prin metoda Gram, respectiv prin metoda Scheffer—Fulton [2].

Rezultate. Rezultatele obținute la cele 3 serii de experiențe le prezintăm în Tabelele 1—3 și în Fig.1 și 2.

În Tabelul 1 redăm rezultatele obținute la prima serie de experiențe. Din examinarea tabelului putem desprinde că din cele 10 tulpi izolate

Tabel 1

Izolarea bacteriilor levanosintetizante în vederea cultivării lor masive pentru sinteza levanului

| Sursa de inocul | Creșterea culturii bacteriene | Intensitatea sintezei levanului |
|-----------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| Sol din Delta Dunării | Bună | +++ |
| Sol din Delta Dunării | Bună | +++ |
| Sol din Delta Dunării | Satisfăcătoare | ++ |
| Sol din Delta Dunării | Foarte bună | ++++ |
| Sol cernoziomic | Foarte bună | ++++ |
| Sol aluvial | Foarte bună | ++++ |
| Nămol terapeutic | Bună | +++ |
| Nămol terapeutic | Foarte bună | ++++ |
| Nămol terapeutic | Foarte bună | ++++ |
| Salivă | Satisfăcătoare | ++ |

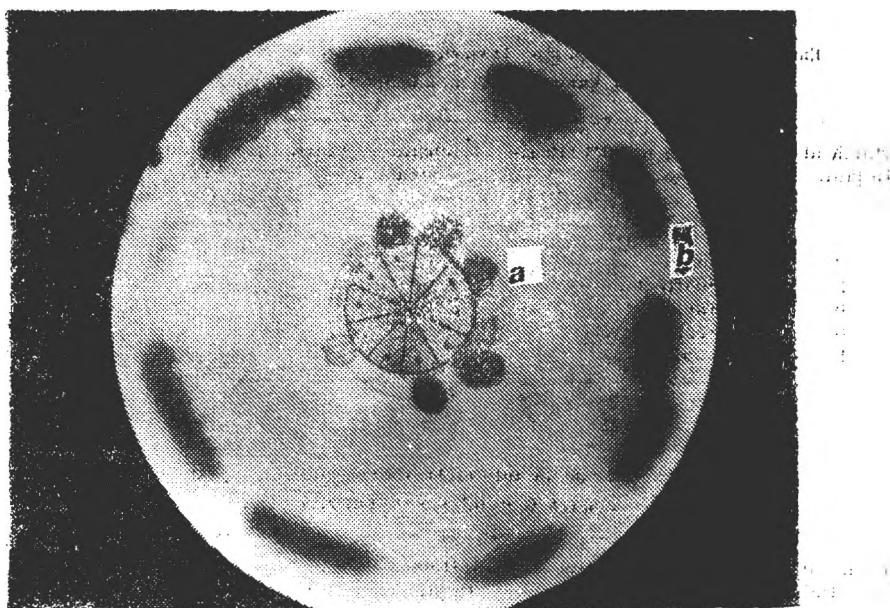


Fig. 1. Intensitatea sintezei levanului la cele 10 tulpini bacteriene izolate.
1-10 — Culturile celor 10 tulpini izolate (vezi Tabelul 1).
a — Levan. b — Zaharoză.

(toate bacteriene), 5 s-au dovedit a fi foarte active în sinteza levanului (+++). Din aceste 5 tulpini bacteriene, 3 au fost izolate din sol, iar două din nămol. În cromatograma din Fig.1 sunt vizualizate rezultatele privind intensitatea sintezei levanului. Se observă că spotul de levan este intens la amestecurile 4, 5, 6, 8, 9 și mai puțin intens sau chiar slab la celelalte 5 lichide de cultură (de la punctele 1, 2, 3, 7 și 10). Se mai poate constata că nu toată cantitatea de zaharoză a fost transformată în levan la nici unul din cele 10 lichide de cultură. Pe baza acestor rezultate am selectat 5 tulpini bacteriene (cele cu numerele de pe cromatogramă 4, 5, 6, 8 și 9), care să fie testate pentru cultivarea masivă, în vederea sintezei levanului. Aceste tulpini au fost cultivate în cadrul celei de-a doua serii de experiențe. Rezultatele pe care le-am înregistrat sunt inserate în Tabelul 2. Se poate constata că, și în condiții de cultivare masivă, creșterea s-a dovedit a fi bună și foarte bună, iar intensitatea sintezei levanului să fie bună și foarte bună. Cele mai active tulpini bacteriene, în privința cantității de levan sintetizat, s-au găsit a fi cele notate prin UBB—B26 și UBB—B55 (de la punctele 5 și 8 din cromatograma prezentată în Fig.1), fără a se distinge net de celelalte 3 tulpini bacteriene.

Tabel 2

**Caracterizarea celor 5 tulpini bacteriene selectate în urma cultivării lor masivă
în baloane (400 ml mediu nutritiv/balon)**

| Numărul tulpinii | Crescerea la 30°C/10 zile | Intensitatea sintezei levanului | Cantitatea levanului sintetizat (g/100 ml lichid de cultură) |
|------------------|---------------------------|---------------------------------|--|
| 4 | Bună | +++ | 1,100 |
| 5 | Foarte bună | ++++ | 1,250 |
| 6 | Bună | +++ | 1,050 |
| 8 | Foarte bună | ++++ | 1,300 |
| 9 | Bună | +++ | 1,150 |

Tabel 3

Caracterizarea celor două tulpini bacteriene utilizate pentru cultivarea lor masivă (800 ml mediu nutritiv/balon)

| Numărul tulpinii studiate | Concentrația zaharozei în mediu (%) | Crescerea tulpinii | Intensitatea sintezei levanului | Cantitatea levanului sintetizat (g/100 ml lichid de cultură) |
|---------------------------|-------------------------------------|--------------------|---------------------------------|--|
| (UBB—B26) | 25 | Foarte bună | ++++ | 1,300 |
| | 15 | Foarte bună | ++++ | 1,290 |
| (UBB—B55) | 25 | Foarte bună | +++ | 1,309 |
| | 15 | Foarte bună | +++ | 1,310 |

În a 3-a serie de experiențe s-a testat cultivarea masivă pentru obținerea levanului la cele două tulpini: 5 (UBB—B26) și 8 (UBB—B55). Datele obținute sunt trecute în Tabelul 3, respectiv sunt vizualizate în Fig.2. Din analiza acestora reiese că cele două tulpini sunt foarte apropiate ca valoare, indiferent dacă au fost cultivate pe mediu cu 25% zaharoză sau doar cu 15% zaharoză. Așa cum au arătat și datele publicate de Han [4], la *Bacillus polymyxa* a crescut cantitatea de levan odată cu creșterea conținutului în zaharoză de la 3—16%. Datele noastre demonstrează că sințeza levanului nu a crescut în intensitate, dacă mediul a conținut 25% zaharoză.

Din analiza microscopică a preparatelor efectuate din cultura celor două tulpini bacteriene a reieșit că ambele sunt Gram-pozitive, sporulate (prezintă endosporii) și, fiind aerobe, aparțin genului *Bacillus*.

Concluzii. 1. S-a reușit izolarea din sol și din nămol a 5 tulpini bacteriene active în sințeza levanului.

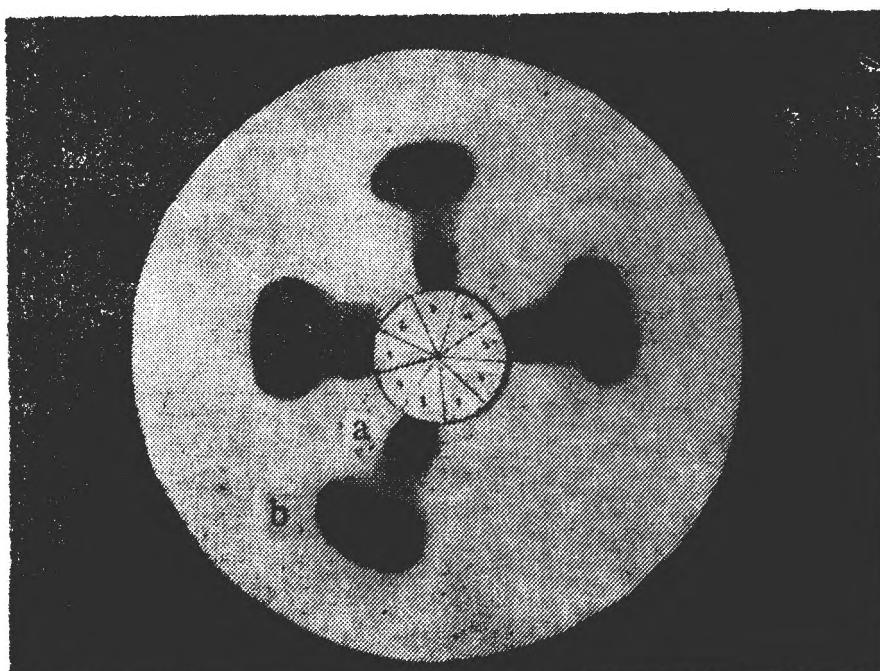


Fig. 2. Sinteză levanului la cele două tulpini bacteriene selectate, cultivate masiv pentru producerea levanului.

1 — Tulipa 5 (UBB—B26) crescută pe mediul cu 25% zaharoză. 3 — Tulipa 5 (UBB—B26) crescută pe mediul cu 15% zaharoză. 5 — Tulipa 8 (UBB—B55) crescută pe mediul cu 25% zaharoză. 8 — Tulipa 8 (UBB—B55) crescută pe mediul cu 15% zaharoză.

a — Levan. b — Zaharoză.

(2, 4, 6, 7, 9 — Segmente pe hirtia chromatografică neutilizate pentru analize.)

2. Tulpinile bacteriene izolate au avut o creștere bună și foarte bună pe mediul nutritiv utilizat, manifestând un randament bun în sinteza levanului.

3. Două tulpini bacteriene (UBB—B26 și UBB—B55) s-au prestat cel mai bine pentru cultivarea masivă în vederea producției de levan.

4. Pe baza caracterelor de creștere și pe baza examinării microscopice s-a stabilit că cele două tulpini bacteriene aparțin genului *Bacillus*, fiind Gram-pozițive, sporulate și aerobe.

BIBLIOGRAFIE

1. Dedonder, R., *Levensucrase from Bacillus subtilis*, in Neufeld, E.F., Grinsburg, V. (Eds.), *Methods in Enzymology*, Vol. 8, p. 500—505, Acad. Press, New York, 1966.
2. Drăgan-Bularda, M., *Lucrări practice de microbiologie generală*, p. 54, 78, Univ. Babeș-Bolyai, Cluj, 1983.
3. *Enzyme Nomenclature 1978*, Acad. Press, New York, 1979.

4. Han, Y. W., *Microbial levan*, „Adv. Appl. Microbiol.”, 35, 1990, 171—194.
5. Hestrin, S., Feingold, D.S., Avigad, G., *The mechanism of polysaccharide production from sucrose. III. Donor — acceptor specificity of the levan-sucrase from Aerobacter levanicum*, „Biochem. J.”, 64, 1956, 340—351.
6. Iizuka, M., *Levansucrase*, „J. Jap. Soc. Starch Sci.”, 35, 1988, 141—148.
7. Kiss, S., Drăgan-Bularda, M., *Formarea și descompunerea levanelor în sol*, „Lucr. Conf. Nat. Microbiol. Gen. Apl.” (București, 1968), 1970, 483—486.
8. Kiss, S., Drăgan-Bularda, M., Lörinczi, F., Rădulescu, D., *Contribuții la studiul ciupercilor levanolitice din sol*, „Contrib. Bot.” (Cluj), 1969, 403—410.
9. Murakami, H., Kuramoto, T., Mizutani, K., Nakano, H., Kitahata, S., *Purification and some properties of a new levanase from Bacillus sp. No. 71*, „Biosci. Biotechnol. Biochem.”, 56, 1992, 608—613.
10. Wright, S. W., Ulstrom, S. A., Szweczak, J. T., *Studies on carbohydrates in body fluids. I. Identification by means of paper chromatography*, „Amer. Med. Assoc. J. Dis. Childr.”, 93, 1957, 173—181.

IZOLĂRI DE MICROORGANISME PRODUCĂTOARE DE LEVANAZĂ ȘI DEXTRANAZĂ

MIHAEL DRAGAN-BULARDĂ*, STEFAN KISS*, DANIELA PASCA**, RADU CRIŞAN**, ELENA MANOLACHE* și VASILE MUNTEAN**

SUMMARY. — Isolation of Microorganisms Producing Levanase and Dextranase. On elective nutrient media containing mineral salts and levan or dextran, thirty levanolytic and/or dextranolytic microbial strains were isolated from soil, lake sediment and saliva samples. Two bacterial strains (a *Bacillus* sp. and a *Pseudomonas* sp.) producing both levanase and dextranase were selected for obtaining mutants through UV irradiation. The results have shown that the mutations had little effect on the synthesis of levanase but led to increased synthesis of dextranase. A mutant of *Bacillus* sp. and another one derived from the *Pseudomonas* sp. were the best in regard to levanase and dextranase syntheses.

Levanele sunt polimeri ai D-fructozei, alcătuind lanțuri prin legături β —2,6 iar ramificările pot apărea prin legături β —2,1 [4, 5]. Levanazele (E.C. 3.2.65) sunt enzime care catalizează hidroliza legăturilor β —2,6, în principal, producind fructoză sau levanoooligozaharide [6, 9, 10]. S-a demonstrat că unele ciuperci microscopice izolate din sol dispun de levanază [7], iar la 3 tulpieni de *Penicillium* s-a precizat că levanaza este o enzimă constitutivă, fiind elaborată de miceliu și eliminată în lichidul de cultură [8].

Dextranele sunt polimeri ai D-glucozei, alcătuind lanțuri prin legături α —1,6, iar ramificările se produc prin legături α —1,3 și α —1,4. Dextranazele (E.C. 3.2.1.11) sunt enzime capabile de hidroliza legăturilor α —1,6, în principal, rezultând izomaltoză și glucoză. Ele sunt produse de bacterii și ciuperci [11]. Din sol s-a reușit izolarea unor micromicete dextranolitice [1], respectiv a unor micromicete dextranolitice și levanolitice [3].

Lucrarea de față se ocupă cu izolarea unor tulpieni microbiene care produc levanază sau/și dextranază cu un randament ridicat, pentru eventuala utilizare a lor în practică.

Material și metodă. Pentru izolarea și cultivarea tulpinilor microbiene levanolitice sau/și dextranolitice am utilizat, drept mediu bazal, mediul mineral având următoarea compozitie: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3,3 g, K_2HPO_4 12,25 g, KH_2PO_4 4,08 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,125 g, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,0022 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,0144 g, $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 0,02 g, CaCl_2 siccum 0,183 g, apă distilată 1000 ml [2]. La mediul bazal s-a adăugat levan (preparat obținut în Laboratorul nostru) în proporție de 0,25% (greut./vol.) sau dextran (preparat Flucka cu G.M. ~ 40.000) în proporție de 2% (greut./vol.). Mediile repartizate în eprubete sau în baloane au fost sterilizate la 121°C timp de 30 minute.

Pentru inoculare s-au folosit diferite surse: sol, nămol de lac și salivă. Dint-un număr de 30 tulpieni microbiene izolate, prezintând capacitate levanolitice sau/și dextranolitice, au fost selectate două tulpieni bacteriene (nr. 1 și 4) care

* Universitatea Babes-Bolyai, Catedra de Biologie vegetală; 3400 Cluj, România;

** Institutul de Cercetări Biologice; 3400 Cluj, România.

s-au dovedit capabile de a produce atât levanază cât și dextranază. Pe baza analizelor microscopice (în principal, colorația Gram, respectiv colorația Scheffer-Fulton pentru evidențierea endosporilor), tulipina nr. 1 (3LDM) s-a identificat ca o specie de *Bacillus*, iar tulipina nr 4 (4LDM) ca o specie de *Pseudomonas*.

Cele două tulpini au fost supuse mutagenezei prin iradiere cu raze UV ($\lambda = 254$ nm), timp de 30 sau 40 minute, utilizând Universal UV Lampe Typ TL-00. Din tulipina nr.1 s-au obținut după 30, respectiv 40 minute de iradiere, două mutante: tulipina nr.2 (3LD30) și tulipina nr.3 (3LD40). Tulipina nr.4 a dat naștere, în urma iradierii de 30 minute, tulpinii nr.5 (4LD30).

Tulpinile de origine și mutantele lor au fost cultivate în baloane de 250 ml conținând cete 100 ml mediu nutritiv cu levan sau cu dextran. O serie de culturi au fost agitate (~60 mișcări/minut) și o altă serie de culturi au rămas neagitate (culturi statice). Cultivarea a avut loc la 30°C și a durat 10 zile. Apoi, culturile au fost centrifugate, timp de o oră la 5000 turări/minut, pentru separarea biomasei (sediment) de lichidul de cultură (supernatant). Greutatea biomasei a fost stabilită prin uscare sedimentului la 40°C timp de 3–5 zile.

Biomasa uscată la aer și lichidul de cultură au fost folosite apoi pentru evidențierea activității levanazei și dextranazei endocelulare, respectiv extracelulare. În acest scop, s-au preparat amestecuri de reacție compuse din 100 mg biomasă + 2 ml toluen (antiseptic) + 9 ml apă distilată + 1 ml soluție de levan 2,5% (greut./vol.) sau 1 ml soluție de dextran 20% (greut./vol.), respectiv din 9 ml lichid de cultură + 2 ml toluen + 1 ml soluție de levan 2,5% sau 1 ml soluție de dextran 20%. S-au preparat și amestecuri de reacție fără enzime (fără biomasă și lichid de cultură) sau fără substrat enzimatic (levan și dextran). Toate amestecurile de reacție au fost incubate la 37°C timp de 10 zile. După incubare, amestecurile de reacție au fost analizate prin cromatografie pe hârtie, tehnică circulară. Volumul analizat din fază apoasă: 10 μl. Hirtia: Whatman 1. Developarea cromatogramelor, într-un sistem de dizolvanți alcătuit din n-propanol-acetat de etil-apă (6:1:3 vol./vol./vol.), timp de 2,5 ore la temperatură laboratorului. Revelarea cromatogramelor s-a efectuat cu un reactiv pe bază de uree și acid α-fosforic [12] care detectează cetozele libere și combinate (fructoză, oligofructozide, levan) în cazul amestecurilor de reacție preparate pentru evidențierea activității levanazie și cu un reactiv conținând AgNO₃ [13] pentru detectarea zaharurilor reducătoare (glucoză, izomaltoză, oligozaharide) în cazul amestecurilor de reacție preparate pentru evidențierea activității dextranazice. Intensitatea activității enzimatiche s-a notat prin semne de +.

Rezultate. Tabelul 1 arată că, pe mediul cu levan, în culturi agitate, tulpinile de origine (nr. 1 și 4) au produs mai multă biomasă și au manifestat o activitate levanazică endocelulară puțin mai ridicată decât mu-

Tabel 1
Activitatea levanazică și dextranazică în biomasa bacteriană

| Numărul tulpinii | Codul | Condițiile de cultivare | Biomasa (g/l mediu) | | Activitatea* | |
|------------------|-------|-------------------------|---------------------|------------------|--------------|--------------|
| | | | Mediu cu levan | Mediu cu dextran | levanazică | dextranazică |
| 1 | 3LDM | | 1,107 | 0,587 | ++++ | ++ |
| 2 | 3LD30 | | 0,118 | 0,181 | ++ | ++++ |
| 3 | 3LD40 | Culti | 0,180 | 0,226 | ++ | ++++ |
| 4 | 4LDM | agitare | 0,239 | 0,477 | ++++ | ++ |
| 5 | 4LD30 | | 0,165 | 0,166 | +++ | ++++ |
| | | | | | | |
| 1 | 3LDM | | 0,228 | 0,626 | ++++ | ++ |
| 2 | 3LD30 | | 0,311 | 0,186 | +++ | +++ |
| 3 | 3LD40 | Culti | 0,158 | 0,207 | ++++ | ++++ |
| 4 | 4LDM | static | 0,297 | 0,763 | +++ | ++ |
| 5 | 4LD30 | | 0,201 | 0,156 | ++++ | ++++ |

* ++++ — Activitate foarte puternică; hidroliza totală a substratului enzimatic.

+ ++ și ++ — Activitate puternică, dar fără hidroliza totală a substratului enzimatic.

tanțele lor (tulpinile nr. 2 și 3, respectiv nr. 5); o situație similară se constată și în culturile agitate, cu două excepții: tulipina nr. 2 a produs mai multă biomasă decât tulipina nr. 1, și activitatea levanazică endocelulară a fost mai pronunțată în tulipina nr. 5 decât în tulipina nr. 4. Pe mediul cu dextran, atât în culturile agitate cât și în cele statice, biomasa produsă a fost mai mare la tulpinile de origine decât la mutantele lor, în schimb activitatea dextranazică endocelulară a devenit mai pronunțată în mutantă.

Din Tabelul 1 se mai poate constata că tulipina nr. 1 pe mediul cu levan a produs mult mai multă biomasă, iar tulipina nr. 4 pe mediul cu dextran a produs mult mai puțină biomasă în culturi agitate decât în cele statice. În același timp, biomasa produsă de mutantă nu a prezentat mari deosebiri în funcție de condițiile de cultivare (mediu cu levan sau cu dextran, culturi agitate sau statice).

Rezultatele redate în Tabelul 2 dovedesc că activitatea levanazică extracelulară a fost foarte pronunțată la tulpinile nr. 1—3 și 5 în culturile agitate și la toate tulpinile în culturile statice; această activitate în culturi agitate a fost mai puternică la tulipina nr. 5 (mutantă) decât la tulipina nr. 4 (tulpina de origine). Activitatea dextranazică extracelulară a fost mult mai puternică la toate mutantelor decât la tulpinile de origine în culturile agitate, și la tulpinile nr. 2 și 3 față de tulipina nr. 1 în culturile statice.

Generalizând rezultatele obținute în studierea activității levanazice și dextranazice endo- și extracelulare a tulpinilor de origine și a mutantelor lor devine evident că tulpinile de origine s-au distins printr-o activitate levanazică mai mare în comparație cu activitatea lor dextranazică; sinteza levanazei a fost puțin afectată de mutații, în schimb activitatea dextranazică a mutantelor a devenit mai pronunțată față de cea a tulpi-

Tabel 2

Activitatea levanazică și dextranazică în lichidul de cultură bacteriană

| Numărul tulpinii | Codul | Condițiile de cultivare | Lichid de cultură (ml) | | Activitatea* | |
|------------------|-------------------|-------------------------|------------------------|------------------|--------------|--------------|
| | | | Mediu cu levan | Mediu cu dextran | levanazică | dextranazică |
| 1 | 3LD _M | | 9 | 9 | ++++ | ± |
| 2 | 3LD ₃₀ | | 9 | 9 | +++ | +++ |
| 3 | 3LD ₄₀ | Culturi agitate | 9 | 9 | +++ | +++ |
| 4 | 4LD _M | | 9 | 9 | ++ | ± |
| 5 | 4LD ₃₀ | | 9 | 9 | +++ | ++ |
| 1 | 3LD _M | | 9 | 9 | ++++ | ± |
| 2 | 3LD ₃₀ | | 9 | 9 | +++ | ++ |
| 3 | 3LD ₄₀ | Culturi statice | 9 | 9 | +++ | +++ |
| 4 | 4LD _M | | 9 | 9 | +++ | + |
| 5 | 4LD ₃₀ | | 9 | 9 | +++ | + |

* ++++ — Activitate foarte puternică: hidroliza totală a substratului enzimatic.

+++ și ++ — Activitate puternică, dar fără hidroliza totală a substratului enzimatic.

+ și ± — Activitate slabă.

nilor de origine; tulpinile nr. 3 și 5 (mutante) pot fi considerate cele mai bune în privința sintezei levanazei și a dextranazei.

Concluzii. 1. Din 30 tulpini microbiene levanolitice sau/și dextranolitice izolate din probe de sol, sediment de lac și salivă, au fost selectate două tulpini bacteriene (*Bacillus* sp. și *Pseudomonas* sp.) capabile de a produce astăzi levanază și dextranază.

2. Aceste două tulpini au fost supuse mutagenezei prin iradiere cu raze UV. Mutățiile au afectat puțin sinteza levanazei, dar au dus la creșterea sintezei dextranazei.

3. O mutantă provenită de la *Bacillus* sp. și una derivată din *Pseudomonas* sp. au fost cele mai bune în privința sintezei levanazei și a dextranazei.

B I B L I O G R A F I E

1. Deaconu-Pelea, M., Kiss, S., Lőrinczi, F., Drăgan-Bularda, M., Aplicarea metodei cu pastă de caolin pentru izolari de micromicete polizaharidolitice, „Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Biol.”, 18 (2), 1973, 135—143.
2. Dedonder, R., Péaud-Lenoë, C., Études sur la lévane-sucrase de *Bacillus subtilis*. I. Production de lévanes et de lévane-sucrase par des cultures de *Bacillus subtilis*, „Bull. Soc. Chim. Biol.”, 39, 1957, 483—497.
3. Drăgan-Bularda, M., Kiss, S., Lőrinczi, F., Rădulescu, D., Studiul unor micromicete producătoare de dextranază și levanază, „Contrib. Bot.” (Cluj), 1977, 163—171.
4. Feingold, D.S., Gehatia, M., Structure and properties of levan, a polymer of D-fructose produced by cultures and cell-free extracts of *Aerobacter levanicum*, „J. Polymer Sci.”, 23, 1957, 783—790.
5. Han, Y.M., Microbial levan, „Adv. Appl. Microbiol.”, 35, 1990, 171—194.
6. Hestrin, S., Goldblum, J., Levanpolyase, „Nature”, 178, 1953, 1046—1047.
7. Kiss, S., Drăgan-Bularda, M., Lőrinczi, F., Rădulescu, D., Contribuții la studiul ciupercilor levanolitice din sol, „Contrib. Bot.” (Cluj), 1969, 403—410.
8. Lőrinczi, F., Drăgan-Bularda, M., Kiss, S., Rădulescu, D., Studii privind levanaza unor micromicete din sol, „Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Biol.”, 18 (1), 1973, 145—149.
9. Murakami, H., Kuramoto, T., Mizutani, K., Nakano, H., Kitahata, S., Purification and some properties of a new levanase from *Bacillus* sp. No. 71, „Biosci. Biotechnol. Biochem.”, 56, 1992, 608—613.
10. Murakami, H., Murol, H., Kuramoto, T., Tamura, Y., Mizutani, K., Nakano, H., Kitahata, S., Purification and some properties of a levansucrase from *Streptomyces* sp. No. 7—3, „Agric. Biol. Chem.”, 54, 1990, 2247—2255.
11. Tsuru, D., Hiraoka, N., Fukumoto, J., Studies on mold dextranases. IV. Substrate specificity of *Aspergillus carneus* dextranases, „J. Biochem.” (Tokyo), 71, 1972, 653—660.
12. Wise, C.S., Dimler, R.J., Davis, H.A., Rist, C.E., Determination of easily hydrolyzable fructose units in dextran preparations, „Anal. Chem.”, 27, 1955, 33—36.
13. Wright, S.W., Ulstrom, R.A., Szewczak, J.T., Studies on carbohydrates in body fluids. I. Identification by means of paper chromatography, „Amer. Med. Assoc. J. Dis. Childr.”, 93, 1957, 173—181.

ANALIZA BACTERIOLOGICĂ A NĂMOLURIILOR DIN LACURILE SALINE URSU ȘI NEGRU DE LA SOVATA

VASILE MUNTEAN*

SUMMARY. — **Bacteriological Analysis of Muds from the Salt Lakes Ursu and Negru in Sovata.** Mud samples collected seasonally in 1992 were analysed for determining the counts of bacteria from the following 7 physiological groups: aerobic heterotrophs, ammonifiers, denitrifiers, desulphofiers, iron-reducers, levan-formers and levanolytic bacteria. Bacteria from each group were present in the studied muds. There were seasonal variations in bacterial counts. The largest number of bacteria was found in autumn, and the smallest in winter. The best represented group was that of the aerobic heterotrophs. Their number was 10^5 — 10^8 cells/g dry mud. The ammonifiers were also well represented (10^5 — 10^7 cells/g dry mud). The number of denitrifiers ranged from 10^2 to 10^4 cells/g dry mud. The smallest number (10 — 10^2 cells/g dry mud) was that of the desulphofiers and iron-reducers. In the Negru lake the ratio between levan-formers and levanolytic bacteria was unrelevant, but in the case of the Ursu lake this ratio was higher than 1, indicating the presence of favourable conditions for the formation of a high-quality mud as concerns its plasticity.

Nămoulurile lacurilor saline Ursu și Negru din stațiunea balneoclimatică Sovata au fost studiate amănumit din punct de vedere enzimologic [3, 5]. Nu au fost publicate însă cercetări asupra unor grupuri fiziologice bacteriene implicate în ciclurile biogeochimice ale elementelor. Scopul acestei lucrări este de a completa această lacună și a obține o imagine de ansamblu asupra activității biologice în aceste habitate. Contribuția bacteriilor la procesul de peloidogeneză este esențială. Deschiderea relațiilor ecologice care se stabilesc între diferite grupe fiziologice bacteriene are o deosebită importanță teoretică și poate constitui premisa unei activități practice de optimizare a calității terapeutice a nămoulurilor.

Material și metode. În anul 1992 au fost efectuate analize bacteriologice asupra nămoulurilor din lacurile saline Ursu și Negru din stațiunea balneoclimatică Sovata. Cercetările au fost făcute pe câte o probă de nămol din fiecare lac, în toate cele 4 anotimpuri. Probele din lacul Ursu au fost prelevate din zona plutei, iar cele din lacul Negru din zona centrală. Eșantioanele de nămol au fost prelevate în baloane sterilizate, apoi supuse analizelor în laborator.

S-au efectuat analize bacteriologice cantitative, determinându-se numărul bacteriilor aparținătoare următoarelor grupe fiziologice: heterotrofe aerobe, ammonificatoare, denitrificatoare, desulfovicioare, fier-reducătoare, levanosintetizante și levanolitice.

Numărul bacteriilor heterotrofe aerobe a fost determinat pe un mediu cu bulion de carne agarizat.

Numărul bacteriilor ammonificatoare a fost determinat folosind un mediu cu apă peptonată.

* Institutul de Cercetări Biologice, 3400 Cluj, România

Numărul bacteriilor denitrificatoare a fost determinat folosindu-se mediul lui De Barjac [8].

Numărul bacteriilor desulfoficate au stabilit utilizându-se mediul Van Delden [2].

Numărul bacteriilor fier-reducătoare s-a stabilit cu ajutorul mediului Ottow [7].

Numărul bacteriilor levanosintetizante și cel al bacteriilor levanolitice s-a determinat cu ajutorul metodelor elaborate de Kiss și Drăgan-Bulardă [4].

S-au preparat diluții de nămol cuprinse între 10^{-1} și 10^{-7} . Din fiecare diluție de nămol cuprinsă între 10^{-1} și 10^{-4} s-au inoculat cinci eprubete cu mediu pentru cultivarea bacteriilor desulfoficate, fier-reducătoare, levanosintetizante și levanolitice. Din fiecare diluție de nămol cuprinsă între 10^{-4} și 10^{-7} s-au inoculat cinci eprubete cu mediu pentru cultivarea bacteriilor amonificate și denitrificate, respectiv cinci două cutii Petri conținând mediu pentru cultivarea bacteriilor heterotrofe aerobe. Alegerea diluțiilor s-a făcut după încercări prealabile, pentru încadrarea în limitele de variație ale numărului de bacterii apartinătoare fiecărui grup fiziologic studiat în probele de nămol.

În toate cazurile volumul inoculului a fost de 1 ml, iar operațiile s-au efectuat în condiții sterile.

Incubarea s-a făcut la 28°C și a durat 7 zile pentru bacteriile heterotrofe aerobe, respectiv 10 zile pentru celelalte grupe fiziologice.

Pentru determinarea numărului bacteriilor heterotrofe aerobe s-a citit numărul de colonii din fiecare cutie Petri, s-a făcut media valorilor probelor paralele de la diluția cea mai semnificativă și s-a înmulțit cu valoarea inversă a diluției respective.

Culturile bacteriilor amonificate au fost analizate cu ajutorul reactivului Nessler, care în prezența NH_3 se colorează în galben sau portocaliu.

Activitatea bacteriilor denitrificate a fost evidențiată cu ajutorul reactivelor Griess I și Griess II, care în prezența nitritilor rezultați din procesul de denitrificare colorează mediu în roz sau roșu.

Culturile bacteriilor desulfoficate au fost analizate folosind benzi de hârtie de filtru îmbibate într-o soluție de acetat de plumb 10%. În prezența HCl concentrat, H_2S format sub acțiunea bacteriilor desulfoficate se degajă, colorând în negru sau brun benzile cu acetat de plumb.

Ionii de Fe^{2+} , rezultați în urma reducerii fierului trivalent din mediu datorită activității bacteriilor fier-reducătoare, s-au evidențiat cu ajutorul reactivului cu α,α' -dipiridil, care în prezența ionilor colorează mediu în roz sau roșu.

Culturile bacteriilor levanosintetizante și levanolitice au fost examineate prin metoda cromatografiei pe hârtie, tehnică circulară, folosind hârtie Whatman 1. Cromatogramele au fost dezvoltate într-un sistem de dizolvanți format din n -propanol-acetat de etil-apă (6:1:3 vol./vol./vol.). Detectarea s-a făcut cu un reactiv pe bază de uree și acid α -fosforic, care evidențiază în mod specific cetozele libere și combinate, dând o colorație albastră cu levanul, zaharoză și fructoza, în urma încălzirii cromatogramelor la $100-110^{\circ}\text{C}$ [9].

Cu excepția bacteriilor heterotrofe aerobe, numărul cel mai probabil al bacteriilor/g nămol umed s-a calculat pe baza tabelului statistic publicat de Alexander [1], luându-se în considerare triplete de diluții succesive la care s-a consemnat existența activității fiziologice respective. În final, numărul cel mai probabil al bacteriilor s-a raportat la 1 g nămol substanță uscată.

Rezultate. Rezultatele analizelor bacteriologice sezoniere sunt prezente în Tabelul 1. Se constată că toate cele 7 grupe fiziologice sunt prezente în nămolarile celor două lacuri în toate anotimpurile.

Valorile cele mai mari se înregistrează în cazul bacteriilor heterotrofe aerobe, acest grup participând la transformarea substanțelor organice din nămol, jucând un rol important în procesul de peloidizare.

Microflora bacteriană heterotrofă aerobă este mai bine reprezentată în nămolul lacului Ursu, valorile oscilând de la peste 6 milioane

Tabel 1

Rezultatele analizelor bacteriologice ale nâmolurilor din lacurile Ursu și Negru
(numărul celulelor/g nâmol substanță uscată)

| Lacul | Sezonul | Bacterii mezofile aerobe | Bacterii amonificatoare | Bacterii de-nitrificatoare | Bacterii desulfoficate-toare | Bacterii fier-reducătoare | Bacterii levanosintetizante | Bacterii levanolitice |
|-------|-----------|--------------------------|-------------------------|----------------------------|------------------------------|---------------------------|-----------------------------|-----------------------|
| Ursu | Iarna | 6.867.369 | 4.439.511 | 1.304 | 88 | 33 | 13.041 | 1.498 |
| | Primăvara | 21.847.070 | 121.648 | 1.936 | 52 | 422 | 6.951 | 1.117 |
| | Vara | 146.889.400 | 2.649.769 | 37.442 | 576 | 80 | 12.384 | 10.230 |
| | Toamna | 223.356.730 | 6.700.000 | 29.036 | 63 | 638 | 17.230 | 17.230 |
| Negru | Iarna | 552.922 | 1.132.174 | 974 | 631 | 160 | 7.372 | 1.632 |
| | Primăvara | 7.573.025 | 284.890 | 3.353 | 144 | 468 | 6.491 | 11.179 |
| | Vara | 16.248.675 | 3.249.735 | 95.372 | 60 | 423 | 7.771 | 9.890 |
| | Toamna | 94.696.000 | 16.287.000 | 45.454 | 79 | 613 | 34 | 3.068 |

iarna, la peste 223 de milioane bacterii/g nămol substanță uscată toamna. În lacul Negru aceste valori coboară iarna sub un milion, iar toamna ajung la aproape 100 de milioane.

Foarte bine reprezentate sunt și bactériile amonificatoare, cu valori de ordinul milioanelor/g nămol substanță uscată, singura excepție, constituind-o în ambele lacuri sezonul de primăvară, când numărul amonificatoarelor scade cu un ordin de mărime.

Numărul bacterilor denitrificatoare oscilează între puțin sub 1 000 (iarna în lacul Negru) și aproape 100 000 (vara în același lac).

Valorile cele mai mici se înregistrează în cazul bacteriilor desulfocifatoare, fiind de ordinul zecilor sau sutelor de bacterii/g nămol substanță uscată. Fără îndoială că în acest caz intervin și probleme legate de metodologie, dificultatea identificării acestui grup fiziologic bacterian fiind subliniată și de alți autori [6].

Valori de același ordin de mărime se înregistrează și în cazul bacteriilor fier-reducătoare.

Numărul bacteriilor levanosintetizante și levanolitice este de ordinul 10^3 — 10^4 , cu o singură excepție, toamna în lacul Negru, când scade sub 100. În lacul Ursu, raportul între numărul bacteriilor levanosintetizante și levanolitice este supraunitar în 3 sezoane, toamna înregistrându-se aceeași valoare pentru ambele grupe. Polizaharidul bacterial levan, având o structură ramificată, conferă nămolului plasticitate, aderență la epiderma celor supuși tratamentului balnear. De aceea, predominanța bacteriilor levanosintetizante față de cele levanolitice este un aspect pozitiv, nămolul caracterizat printr-un astfel de raport fiind de calitate superioară.

În cazul lacului Negru nu se poate trage o concluzie semnificativă din acest punct de vedere, deoarece iarna raportul este favorabil bacteriilor levanosintetizante, iar în celelalte sezoane celor levanolitice.

Concluzii. 1. Se înregistrează semnificative oscilații sezoniere ale numărului de bacterii aparținând celor 7 grupe fiziologice studiate. În general, valorile maxime sunt consemnate toamna, ca urmare a unui aport sporit de material organic din coloana de apă. Valorile minime sunt înregistrate iarna.

2. Se poate afirma că în nămolul lacului Ursu activitatea microbială este mai intensă decât în nămolul lacului Negru. Luând în considerare raportul dintre bacteriile levanosintetizante și levanolitice, cu implicațiile lui asupra plasticității nămolului, se poate deduce că și sub aspect practic, al efectului util pe care îl are asupra calității terapeutice a nămolului, activitatea microbială în sedimentele lacului Ursu este superioară celei din sedimentele lacului Negru.

BIBLIOGRAFIE

- Alexander, M., *Most-probable-number method for microbial populations*, în Black, C. A., Evans, D. D., White, J. L., Ensminger, L. E., Clark, F. E. (Eds.), *Methods of Soil Analysis*, p. 1467—1472, Amer. Soc. Agron., Madison, 1965.

2. Allen, O. N., *Experiments in Soil Bacteriology*, Third Ed., p. 31, Burgess, Minneapolis, 1957.
3. Bulgăreanu, V.A., Kiss, S., Rădulescu, D., Drăgan-Bulardă, M., Hannich, D., *Influence of limnogeological conditions on the enzymatic and nonenzymatic catalytic activities in the sediments of salt lakes in Sovata*, „Stud. Univ. Babes-Bolyai, Biol.”, 26 (1), 1981, 68—72.
4. Kiss, S., Drăgan-Bulardă, M., *Formarea și descompunerea levanelor*, Microbiologia (Conf. Nat. Microbiol. Gen. Apl., București, 1968), Soc. Științe Biol., Secț. Microbiol., București, 1970, 483—486.
5. Kiss, S., Rădulescu, D., Drăgan-Bulardă, M., Bulgăreanu, V.A., Nicula, G., *Contributions to the enzymological study of therapeutic muds*, „Stud. Univ. Babes-Bolyai, Biol.”, 24 (2), 1979, 57—63.
6. Oren, A., *Anaerobic degradation of organic compounds at high salt concentrations*, „Antonie van Leeuwenhoek”, 54, 1988, 267—277.
7. Ottow, J.C.G., *Evolution of iron-reducing bacteria in soil and the physiological mechanism of iron reduction in Aerobacter aerogenes*, „Z. Allg. Mikrobiol.”, 8, 1968, 441—443.
8. Pochon, J., *Manuel technique d'analyse microbiologique du sol*, p. 59—60, Masson, Paris, 1954.
9. Wise, C.S., Dimler, R.J., Davis, H.A., Rist, C.E., *Determination of easily hydrolysable fructose units in dextran preparations*, „Anal. Chem.”, 27, 1955, 33—36.

ACTIVITATEA BIOLOGICĂ A UNOR NOI FUNGICIDE ROMÂNEȘTI

LUCIA NEDELCU* și MARIUS SAFTA**

SUMMARY. — Biological Activity of Some New Romanian Fungicides.

The biological activity of three oxime derivatives (SN 343, SN 350, and SN 384, synthesised in the Organic Chemistry Centre in Timișoara) against the phytopathogenic fungi *Pythium debaryanum* and *Phytophthora infestans* was tested under both *in vitro* and *in vivo* conditions. In the *in vitro* experiments, potato-glucose-agar was used as a nutrient medium for the fungi, whereas the *in vivo* experiments were carried out with tomato plants, cv. Florida. Five commercially available fungicide preparations containing cymoxanil, metalaxyl, benalaxyl, propamocarb, and aluminium ephosite, respectively, served for comparison. The results have shown that under *in vitro* conditions the activity of SN 343 and SN 384 against *Pythium debaryanum* was similar to that of the cymoxanil-containing Curzate 50 WP preparation. At the same time, SN 343 and SN 384 were the most active fungicides against *Phytophthora infestans*. Under *in vivo* conditions, SN 384 proved to be the best of the three newly synthesised oxime derivatives: it prevented the attack of *Phytophthora infestans* on the foliage of experimentally infected tomato plants.

În cadrul Centrului de Chimie Organică (CCO) de la Timișoara au fost sintetizați derivați oximici, a căror activitate fungicidă a fost testată *in vitro* și *in vivo* [1, 2].

În lucrarea de față am studiat activitatea biologică a 3 derivați oximici sintetizați la CCO asupra ciupercilor fitopatogene *Pythium debaryanum* Hesse și *Phytophthora infestans* (Mont.). De By, agenți cauzali a două boli de mare importanță practică: cădere și putrezirea plantelor și, respectiv, mana. Pentru comparare au servit 5 produse fungicide din import.

Material și metodă. Derivații oximici sintetizați la CCO și luati în studiu au fost produsele SN 343, SN 350 și SN 384. Formula lor structurală este redată în Fig. 1. Fungicidele servind pentru comparare au fost produsele Curzate 50 WP (Du Pont de Nemours, SUA), Ridomil 25 WP (Ciba Geigy, Elveția), Galben 25 WP (Montedison, Italia), Previcur N (Schering, Germania) și Aliette (Rhône Poulenc, Franța). Formula structurală a substanței active din aceste produse este redată tot în Fig. 1.

S-au efectuat experiențe atât *in vitro* cât și *in vivo*.

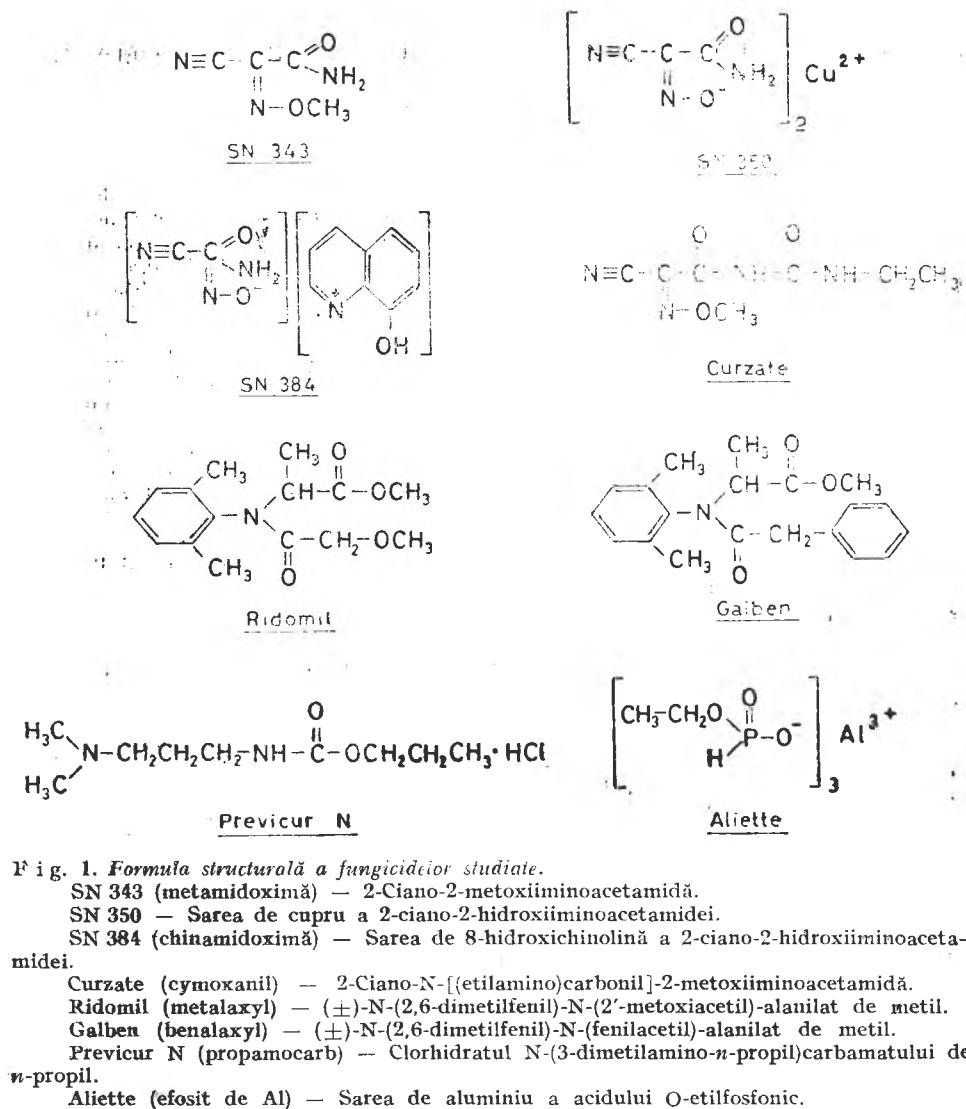
În experiențele efectuate *in vitro* s-a studiat activitatea biologică a produselor asupra celor două ciuperci fitopatogene prin metoda includerii în mediul nutritiv CGA (cartof-glucoză-agar) a diferitelor cantități din produse [3]. Culturile au fost examineate după diferite duri de incubare.

Prin experiențele efectuate *in vivo* s-a studiat eficacitatea, precum și acțiunea sistemică, preventivă și curativă a produselor, la plante de tomate, soiul Florida.

Eficacitatea produselor a fost studiată în condiții de seră. S-a lucrat cu semințe de tomate libere de infectii și cu o cultură de *Pythium debaryanum* de 5 zile obținută pe mediul CGA. Solul folosit a fost sterilizat în autoclav la 1,8 at-

* Institutul de Cercetări pentru Protecția Plantelor, 71592 București 18, România

** Centrul de Chimie Organică, 1900 Timișoara, România



F i g. 1. Formula structurală a fungicidelor studiate.

SN 343 (metamidoximă) — 2-Ciano-2-metoxiiminoacetamidă.

SN 350 — Sarea de cupru a 2-ciano-2-hidroxiiminoacetamidei.

SN 384 (chinamidoximă) — Sarea de 8-hidroxichinolină a 2-ciano-2-hidroxiiminoacetamidei.

Curzate (cymoxanil) — 2-Ciano-N-[(etilamino)carbonil]-2-metoxiiminoacetamidă.

Ridomil (metalaxyl) — (\pm)-N-(2,6-dimetilfenil)-N-(2'-metoxiacetyl)-alanilat de metil.

Galben (benalaxyil) — (\pm)-N-(2,6-dimetilfenil)-N-(fenilacetyl)-alanilat de metil.

Previcur N (propamocarb) — Clorhidratul N-(3-dimetilamino-n-propil)carbamatului de n-propil.

Aliette (efosit de Al) — Sarea de aluminiu a acidului O-etylfosfonic.

mosfere, timp de 3 ore. În cutii de plastic cu latura de 12 cm s-au introdus cîte 50 de semințe, în 5 rânduri. Sursa de infecție s-a preparat din 2/3 sol și 1/3 inocul de agar. După omogenizare, amestecul s-a repartizat uniform în fiecare cutie. Produsele s-au aplicat în diferite doze, într-un volum de 3 l/m². După 10 zile, s-a notat intensitatea atacului fungic pentru evaluarea efectului produselor.

Acțiunea sistemică, preventivă și curativă a produselor s-a studiat cu plante de tomate infectate experimental cu *Phytophthora infestans*.

Pentru studierea acțiunii sistemică a produselor s-au folosit plante de aproximativ 20 cm înălțime, care au fost tratate rediculăr cu 30 mg s.a./plantă și infectate ulterior cu o suspensie de spori și micelii de *Phytophthora infestans* din-

tr-o cultură de 17—19 zile pe mediul CGA. Apoi, plantele au fost introduse în pungi de plastic pentru menținerea unei umidități ridicate. Incubarea a avut loc în boxe termostatate la $20 \pm 1^\circ\text{C}$. După 10 zile de la infecție, s-a notat intensitatea atacului fungic.

Studierea acțiunii preventive a produselor s-a realizat cu plante de tomate având 3 etaje de frunze. Ele au fost tratate cu diferite doze din produse. După 24 ore, frunzele din etajele 2 și 3 au fost detasate, apoi infectate cu spori și micelii de *Phytophthora infestans* (dintr-o cultură de 17 zile) și introduse în camere umede pentru incubare la $20 \pm 1^\circ\text{C}$. În cursul incubării s-a notat, periodic, intensitatea atacului fungic.

Tabel 1

Activitatea biologică în vitro a unor fungicide față de *Pythium de baryanum*

| Varianta | Vârstă culturii (ore) | Ecuată dreptei de regresie | DL—50 | DL—90 | Coeficient de corelație |
|---------------|-----------------------|----------------------------|-------|--------|-------------------------|
| SN 343 | 24 | $y = 4,85 + 1,16x$ | 1,32 | 16,4 | 0,931 |
| | 48 | $y = 4,47 + 1,25x$ | 2,60 | 29,0 | 0,887 |
| SN 350 | 24 | $y = 0,32 + 3,02x$ | 57,7 | 153,2 | 0,999 |
| | 48 | $y = 0,43 + 3,02x$ | 62,8 | 166,6 | 0,997 |
| SN 384 | 24 | $y = 4,44 + 2,01x$ | 1,8 | 8,1 | 0,956 |
| | 48 | $y = 4,52 + 2,05x$ | 1,7 | 7,1 | 0,995 |
| Curzate 50 WP | 24 | $y = 4,90 + 1,66x$ | 1,1 | 6,9 | 0,965 |
| | 48 | $y = 3,65 + 2,32x$ | 3,8 | 13,1 | 0,910 |
| Ridomil 25 WP | 24 | $y = 5,71 + 1,74x$ | 0,39 | 2,12 | 0,998 |
| | 48 | $y = 5,77 + 1,50x$ | 0,30 | 2,17 | 0,833 |
| Previcur N | 24 | $y = 4,41 + 0,54x$ | 11,7 | 2521,5 | 0,857 |
| | 48 | $y = 4,87 + 0,49x$ | 1,8 | 721,9 | 0,963 |
| Aliette 80 WP | 24 | $y = -3,48 + 4,00x$ | 131,7 | 272,2 | 0,865 |
| | 48 | $y = -2,19 + 3,57x$ | 103,6 | 236,5 | 0,851 |

Tabel 2

Activitatea biologică în vitro a unor fungicide față de *Phytophthora infestans*

| Varianta | Concentrația substanței active (%) | Diametrul coloniei (cm) după | |
|---------------------|------------------------------------|------------------------------|---------------------|
| | | 10 zile | 17 zile de incubare |
| SN 343 | 0,1 | 0,00 ^{***} | 0,00 ^{**} |
| SN 350 | 0,1 | 0,52 ^{***} | 0,80 ^{***} |
| SN 384 | 0,01 | 0,00 ^{***} | 0,00 ^{***} |
| Curzate 50 WP | 0,1 | 0,06 ^{***} | 0,36 ^{***} |
| Ridomil 25 WP | 0,01 | 1,22 ^{***} | 2,06 ^{***} |
| Galben 25 WP | 0,01 | 1,30 ^{***} | 2,78 ^{***} |
| Previcur N | 0,1 | 1,44 ^{***} | 3,22 ^{***} |
| Aliette 80 WP | 3,00 | 0,90 ^{***} | 3,50 ^{***} |
| Netratată infectată | — | 2,82 | 6,50 |
| DL 5% | = | 0,60 | 0,42 |
| DL 1% | = | 0,81 | 0,57 |
| DL 0,1% | = | 1,08 | 0,75 |

Acțiunea curativă a produselor a fost studiată cu frunze de tomate detașate, introduse în camere umede și infectate cu spori și miceliu de *Phytophthora infestans*. După 24 ore de la infecție, frunzele au fost tratate cu produsele de testat și reintroduse în camere umede pentru incubare în boxe termostatațe la $20 \pm 1^\circ\text{C}$. După 8 zile de la tratament, s-a notat intensitatea atacului fungic.

Rezultate și discuții. Rezultatele obținute în studierea activității biologice *in vitro* a produselor sunt prezentate în Tabelele 1 și 2. Se poate vedea din Tabelul 1 că față de *Pythium debaryanum* produsele SN 343 și SN 384 au avut o activitate biologică similară cu cea a produsului Curzate 50 WP. Activitatea biologică a produsului SN 350 s-a dovedit a fi slabă. Produsul cel mai activ a fost Ridomil 25 WP. Produsul Previcur N nu a prezentat activitate biologică în privința DL-90, iar produsul Aliette 80 WP a fost lipsit de activitate biologică atât în privința DL-50 cât și a DL-90.

Datele Tabelului 2 arată că produsele testate au inhibat creșterea miceliului de *Phytophthora infestans*. Față de varianta nefrata, dar infectată, inhibiția creșterii a fost foarte semnificativă. Produsele cele mai bune au fost SN 384 și SN 343 care în concentrație de 0,01%, respectiv 0,1% au inhibat complet creșterea miceliului ciupercii atât la 10 cât și la 17 zile de incubare. Se mai poate constata că produsul Aliette 80 WP nu a fost capabil să oprească creșterea miceliului, deși acest produs s-a utilizat într-o concentrație foarte mare (3%), confirmându-se datele din literatură cu privire la lipsa activității lui biologice *in vitro* [4, 9].

Din rezultatele obținute în studierea eficacității produselor testate (v. Tabelul 3) reiese că SN 343, SN 350 și SN 384 au asigurat 32,66–56,06% plante sănătoase, comparativ cu varianta nefrata infectată la care s-au obținut numai 11,33% plante sănătoase. În aceleași condiții, la varianta neinfectată plantele sănătoase au reprezentat 69,33% din totalul plantelor. Sub acțiunea celorlalte produse testate, pantele au rămas sănătoase în proporții de peste 50%, ceea ce este în concordanță cu datele din literatură [5–7, 10]. Eficacitatea mai slabă a produselor SN se datorează, probabil, faptului că, nefiind condiționate, aplicarea lor a fost neuniformă.

Din Tabelul 4 se poate vedea că în privința acțiunii sistemică se remarcă produsele Curzate 50 WP, Ridomil 25 WP și Galben 25 WP, în privința acțiunii preventive — aceste 3 produse și SN 384, iar în privința acțiunii curative — produsele Ridomil 25 WP și Galben 25 WP, asigurând un folaj practic neatacat de ciupercă. În condiții similare, celelalte produse au determinat numai o protecție parțială a frunzelor. Rezultatele înregistrate sunt în concordanță cu cele publicate de alți autori [4, 8].

Aprofundarea studiilor asupra produselor SN 343, SN 350 și SN 384 este deosebit de utilă, în perspectiva introducerii lor în practică.

Concluzii. 1. Activitatea biologică *in vitro* a produselor SN 343 și SN 384 față de *Pythium debaryanum* a fost similară cu cea a produsului Curzate 50 WP, iar față de *Phytophthora infestans* SN 343 și SN 384 s-au dovedit a fi produsele cele mai active.

Tabel 3
Efectuata unor fungicide în combaterea ciuperlei *Pythium debaryanum*
prin tratament la sol

| Varianta | Concentrația substanței active (%) | Plante răsărite și sănătoase (%) | Semnificație față de varianța | |
|------------------------|---|--|----------------------------------|----------------------------|
| | | | ne tratată infecțată | ne tratată ne infecțată |
| SN 343 | 0,1 | 56,06 | × × × | — 000 |
| | 0,05 | 42,00 | × × × | — 000 |
| SN 350 | 0,1 | 38,66 | × × × | — 000 |
| | 0,05 | 44,00 | × × × | — 000 |
| SN 384 | 0,1 | 40,66 | × × × | — 000 |
| | 0,05 | 32,66 | × × × | — 000 |
| Curzate 50 WP | 0,1 | 54,00 | × × × | — 000 |
| | 0,05 | 55,33 | × × × | — 000 |
| Ridomil 25 WP | 0,1 | 55,66 | × × × | — 000 |
| | 0,05 | 66,66 | × × × | — 000 |
| Galben 25 WP | 0,1 | 54,66 | × × × | — 000 |
| | 0,05 | 49,33 | × × × | — 000 |
| Previcur N | 0,15 | 72,00 | × × × | — 000 |
| | 0,1 | 58,00 | × × × | — 00 |
| | 0,05 | 53,33 | × × × | — 000 |
| Aliette 80 WP | 0,25 | 63,33 | × × × | — 000 |
| | 0,15 | 62,66 | × × × | — 000 |
| | 0,1 | 54,00 | × × × | — 000 |
| Ne tratată infectată | — | 11,33 | — | — 000 |
| Ne tratată neinfecțată | — | 69,33 | × × × | — — |
| DL, 5% | — | 6,75 | | |
| DL, 1% | — | 9,02 | | |
| DI, 0,1% | — | 11,86 | | |

Tabel 4
Activitatea biologică *in vivo* a unor fungicide față de *Phytophthora infestans*

| Varianta | Concentrația substanței active (%) | Acțiunea* | | |
|----------------------|---|------------|------------|----------|
| | | sistemnică | preventivă | curativă |
| SN 343 | 0,1 | + | + | + |
| SN 350 | 0,1 | + | + | + |
| SN 384 | 0,1 | + | 0 | + |
| Curzate 50 WP | 0,1 | 0 | 0 | + |
| Ridomil 25 WP | 0,1 | 0 | 0 | 0 |
| Galben 25 WP | 0,1 | 0 | 0 | 0 |
| Previcur N | 0,15 | +++ | ++ + | + - + |
| Aliette 80 WP | 0,15 | + | ++ | ++ |
| Ne tratată infectată | — | ++ + | ++ + | ++ + |

* Se apreciază pe baza mărimi suprafetei foliare atacate de ciupercă. Lipsa atacului: 0. Suprafața foliară atacată în proporție de 5-10%: ±; 10-25%: +; 25-50%: ++; 50-75%: ++ +; 75-100%: + + +

2. În cercetările efectuate *in vivo* s-a remarcat produsul SN 384 care a prevenit atacul lui *Phytophthora infestans* asupra foliajului plantelor de tomate infectate experimental.

B I B L I O G R A F I E

1. Alexandri, A. A., Baicu, T., Safta, M., Contribuții la cunoașterea acțiunii derivatilor oximici. I. Acțiunea biologică „*in vitro*”, „An. Inst. Cercet. Prot. Plant.”, 18, 1985, 165–171.
2. Alexandri, A. A., Baicu, T., Safta, M., Iliescu, H., Contribuții la cunoașterea acțiunii derivatilor oximici. II. Acțiunea biologică „*in vivo*”, „An. Inst. Cercet. Prot. Plant.”, 18, 1985, 173–182.
3. Baicu, T., Metode de testare a produselor fitofarmaceutice, p. 176, Centr. Inform. Docum. Agric. Silvic, București, 1968.
4. Bertrand, A., Ducret, J., Debourg, J. C., Horière, D., Étude des propriétés d'une nouvelle famille de fongicides: les monoéthyl phosphites métalliques; caractéristiques physico-chimiques et propriétés biologiques, „Phytatrie-Phytopharmacie”, 26 (1), 1977, 3–18.
5. Beyries, A., Molot, P. M., Relation entre la systémie du prothiocarbe et son efficacité vis-à-vis du *Phytophthora infestans* de la tomate (par traitement du sol), „Phytatrie-Phytopharmacie”, 25 (3), 1976, 201–207.
6. Bouchot, D., Ellal, G., Huriaux, M., Louvet, J., Études sur les modes d'action de fongicides spécifiques des *Phythium sp.*, agents de la fonte des semis, „Phytatrie-Phytopharmacie”, 25 (3), 1976, 209–222.
7. Geypens, M., Effectivity of typical antiphycomycete fungicides against *Pythium sp.*, „Abstr. Pap., 3rd Int. Congr. Plant Pathol. (München, 1978)”, 1978, 383.
8. Klopping, H. P., Delp, C. J., 2-Cyano-N-(ethylaminocarbonyl)-2-(methoxyimino)-acetamide, a new fungicide, „J. Agric. Food Chem.”, 28, 1980, 467–468.
9. Nedelcu, L., Alexandri, A. A., Cîteva aspecte privind acțiunea biologică a unor fungicide sistemică antiperonosporice utilizate în protejarea tomielor, „Lucr. Științ., A X-a Conf. Naț. Prot. Plant. (Timișoara, 1978)”, 1978, 120–125.
10. Urech, P. A., Eberle, J., Ruess, W., Chemical control of downy mildews through soil application of Ridomil, „Abstr. Pap., 3rd Int. Congr. Plant Pathol. (München, 1978)”, 1978, 359.

STUDIUL UNOR PROCESE FIZIOLOGICE LA DOUĂ LINII CELULARE DE *BERBERIS PARVIFOLIA SPRAGUE*

CONSTANTIN DELIU*, ANA NICOARĂ*, CORNELIA MUNTEANU-DELIU**,
VICTOR BERCEA*, MARTIN KEUL* și DORINA TIRNOVEANU**

SUMMARY.— Study of Some Physiological Processes in Two Cell Lines of *Berberis parvifolia* Sprague. *Berberis parvifolia* cell lines obtained by cloning small cell aggregates, followed by their selection according to their colour, show several physiological and metabolic characteristics, concerning growth and synthesis of proteins, starch and protoberberine alkaloids, which differentiate them. There are clear relationships between the primary and the secondary metabolism of the cells cultured *in vitro*. Thus, intensity of the synthesis of proteins is directly proportional to that of the synthesis of secondary metabolites. In low-productive cell lines, which grow well, but synthesize small amounts of alkaloids, the primary metabolic processes are much more intense. The cells of such lines show a quick nutrient uptake from the medium, but the primary precursors are directed mainly towards the biosynthesis of cell structural components, as well as towards energy storage in form of starch. On the contrary, the highly productive cell lines use the precursors mainly for alkaloid biosynthesis.

Producerea principiilor farmacologic active prin intermediul culturilor de suspensii celulare realizate din plante medicinale este o biotehnologie importantă, atât din punct de vedere practic, cât și teoretic. În anii din urmă s-au obținut succese remarcabile în acest sens. Câteva exemple, cum ar fi elucidarea căii de biosinteză (la nivel enzimatic) a alcaloizilor protoberberinică [7, 21] sau introducerea în sistem industrial a culturilor celulare de *Coptis japonica* pentru obținerea berberinei [6] vin să confirme justitatea afirmației făcute mai sus.

Mult mai puține sunt însă datele cu privire la interrelația care există între procesele metabolice din cadrul suspensiilor celulare crescute în sistemul „batch“. Pentru a lămuri câteva din aceste aspecte, anumite linii celulare de *Berberis parvifolia* Sprague, selectate de noi, au fost analizate din punct de vedere al conținutului lor în metaboliți secundari (alcaloizi totali) și primari (proteine și amidon). De asemenea, la câteva dintre linii s-au urmărit și modificările metabolice care au loc pe tot parcursul ciclului lor de creștere.

Material și metode. a) *Cultura celulară.* Linile celulare au fost izolate prin clonarea de mici agregații celulare și selecția după culoare a coloniilor calusale formate din ele [4]. Suspensiile celulare inițiale din aceste colonii au fost cultivate în vase Erlenmeyer de 300 ml ce conțineau 50 ml mediu nutritiv. Vasele au fost plasate pe un agitator rotativ (100 rpm) la întuneric și la $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

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

** Universitatea Babeş-Bolyai, Catedra de biologie vegetală, 3400 Cluj-Napoca, România

*** Universitatea de Medicină și Farmacie, 3400 Cluj-Napoca, România

Mediul de cultură a constat din săruri minerale după rețeta dată de G a m b o r g și colab.[8], la care s-au adăugat: zaharoză (30 g/l), tiamină (5 mg/l), pirodoxină (1 mg/l), acid nicotinic (1 mg/l), acid α -naftilacetic (1,5 mg/l și benzildenină (0,3 mg/l) cu un pH de 5,5. Celulele au fost subcultivate la un interval de 14 zile cu o rată a diluției de 1:6. Cresterea a fost măsurată prin căntăriri ale biomasei celulare recoltată și uscată la 50°C timp de 24 ore. Au fost determinați de asemenea următorii parametri: indicele de creștere, creșterea absolută, rata specifică de creștere și timpul de dublare, după formulele date de Rose și Martin [17] și de S i n g e r [19].

b) *Anaizele chimice*. Pentru analiza cantitativă a alcaloizilor totali (tetrahidroizochinolinici), biomasa celulară uscată (substanță uscată) a fost supusă unei extracții cu metanol la cald, prin refluxare. Apoi alcaloizii s-au precipitat cu reineckat de amoniu și au fost expuși la un schimb ionic cu Dowex 1 × 4. Reziduul uscat reprezintă alcaloizii totali sub formă de hidrați sau cloruri [16].

Glucidele reducătoare, respectiv amidonul, din substanță uscată și zaharoză, din mediul nutritiv s-au dozat după metoda fotocolorimetrică S o m o g y i [20] și N e l s o n [15]. Proteinele totale au fost determinate din biomasa uscată după metoda spectrofometrică a lui L o w r y și colab. [14]. Fosfații din mediul de cultură a suspensiilor celulare s-au dozat prin fotocolorimetria complexului rezultat în urma reacției dintre molibdatul de amoniu și fosfații din mediu în prezența unui reducător [13], iar azotații prin fotocolorimetria compusului ce rezultă din reacția dintre azotații din mediu și acidul fenoldisulfonic, în prezența hidroxidului de sodiu [18].

Rezultate și discuții. Cu toate că realizarea de culturi celulare din mai multe specii de *Berberis* a fost semnalată încă din anul 1981 de către H i n z și Z e n k [10], până în prezent nu am constatat ca acești autori să utilizeze selecția de linii celulare înalt productive. Cei doi autori arătau că suspensiile celulare de *B. stolonifera* produc spontan cantități mari de alcaloizi protoberberinici (alcaloidul major fiind iatrorizina) și, probabil, din acest motiv au considerat că nu mai este necesar să utilizeze alte metode pentru mărirea productivității acestor culturi de suspensii celulare.

Inițierea suspensiilor celulare de *Berberis parvifolia* a fost realizată de noi în anul 1985 [5] cu rezultate promițătoare. Totuși, după un anumit timp am observat că ele sintetizează cantități mai reduse de alcaloizi, astfel că s-a trecut la aplicarea mai multor metode care să conducă la intensificarea biogenezei compușilor secundari. Una dintre ele a fost selecția de linii celulare prin clonarea de mici aggregate [4], obținând linii aşa cum este 177 (selectată după o a doua clonare) cu productivitate remarcabilă (1,4 g/l alcaloizi totali) [3]. Dintre alcaloizii acumulați de celelalte linii, berberina este compusul major, ea fiind sintetizată, într-o proporție de 50%, iar iatrorizina reprezentând doar 30% din totalul metaboliștilor secundari.

În afară de linii celulare înalt productive: 77 sau 163 (induse din colonii calusale portocalii), s-au selectat și linii slab productive: 114 sau 149 (selectate din colonii gaben-alburii). În general, am remarcat că suspensiile care sintetizează cantități mari de alcaloizi cresc mult mai slab decât celelalte, exceptie făcând linia 177 (Fig. 1). De asemenea, liniile înalt productive se caracterizează printr-un conținut ridicat de proteine. Aceste observații ne-au condus la ideea existenței unor corelații strânse între metabolismul primar și cel secundar. Prezența unui paralelism între intensitatea sintezei de alcaloizi și cea de proteine totale poate fi explicată

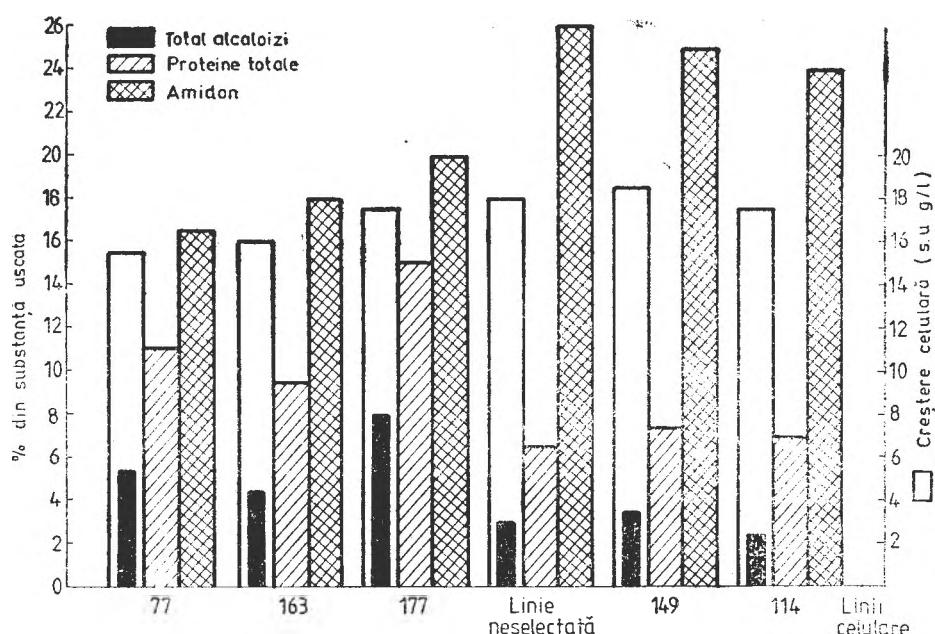


Fig. 1. Continutul în proteine, amidon și alcaloizi totali la câteva linii celulare de *Berberis parvifolia* obținute după prima clonare. Linia 177 a fost izolată după o a doua clonare. Durata de cultivare: 14 zile. Mărimea inoculului: cca 2 g s.u./l.

prin faptul că precursorii, aşa cum sunt aminoacizii, sunt canalizați cu preponderență spre biogeneza metaboliștilor secundari și a enzimelor ce catalizează reacțiile de formare a acestora. În privința stocării glucozei sub formă de amidon, se constată că există un raport invers proporțional între acest proces și cel al acumulării alcaloizilor în celule (Fig. 1).

Analizele efectuate asupra primelor suspensiile celulare de *B. parvifolia* au scos în evidență faptul că sinteza alcaloizilor parcurge o curbă sigmoidă aproape paralelă cu cea a creșterii celulare. Aceste determinări s-au realizat și la câteva linii celulare. S-au luat astfel în studiu o linie înalt productivă (77) și una slab productivă (149). Ambele linii au fost cultivate în același mediu Gamborg modificat. În afara creșterii și sintezei alcaloizilor, au mai fost analizate și absorbția azotațiilor, fosfațiilor și a zaharozei din mediul de cultură al suspensiilor, precum și acumularea amidonului pe toată perioada ciclului de creștere a celor două linii celulare. Scopul acestor determinări a fost acela de a stabili care sunt corelațiile dintre acești parametri, respectiv dintre absorbția nutrientilor din mediul, creștere și acumularea alcaloizilor și a amidonului în celule.

Astfel, din Fig. 2 rezultă că, în momentul în care concentrația anionilor NO_3^- din mediu scade mai mult de jumătate față de nivelul inițial, suspensiile intră în fază logaritmică a creșterii. În acest timp fosfatul este complet epuizat din mediu. Diferența dintre cele două linii constă în vi-

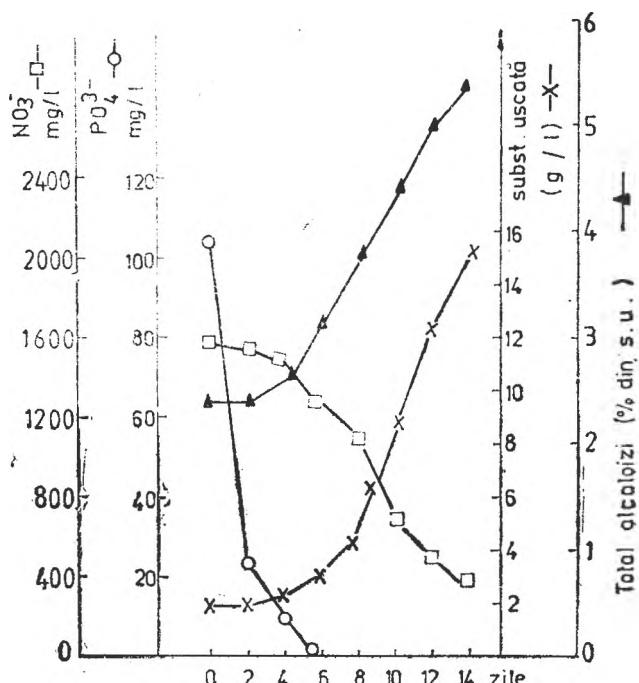


Fig. 2. Creșterea celulară și acumularea alcaloizilor la linia celulară 77 de *Berberis parvifolia* în raport cu absorția din mediu de către celule a azotului și fosforului.

teza proceselor respective. Dacă celulele liniei 77 absorb mult mai încet, atât fosfatul, cât și azotatul și intră în faza exponențială doar în ziua a 8-a de cultură (Fig. 2), linia 149 etalează un metabolism mult mai accentuat (Fig. 3). Rezultate similare despre absorția acestor nutrienți au mai fost obținute și de alți cercetători [1, 9], cu alte specii de plante, dar nici una nu vizează linii celulare. Celulele liniei 149 încorporează rapid tot azotatul și fosfatul din mediu după cca 12–13 zile, moment în care este epuizată de fapt și zaharoza (Fig. 4), cultura intrând în faza staționară (Fig. 3). În schimb, linia 77 mai crește și după ziua a 14-a, deoarece la această dată, în mediul ei de cultură se mai găsesc încă NO_3^- și zaharoză (Fig. 2 și 4).

Referindu-ne la relația dintre acumularea alcaloizilor și a celorlalți metabolici analizați, se poate observa că, la ambele linii, sinteza compușilor secundari începe practic în momentul epuizării complete a fosforului din mediu. Cu toate că Breuling [1] sau Hinz și Zenk [10] neagă influența directă a amoniului, azotatului sau a fosfatului asupra conținutului în alcaloizi la suspensiile celulare de *Berberis*, experiențele noastre efectuate cu *B. parvifolia* demonstrează contrariul. Testând efectul acestor nutrienți asupra biosintezei alcaloizilor berberinici, am constatat o stimulare a ei la concentrații reduse de PO_4^{3-} [3]. Rezultate ase-

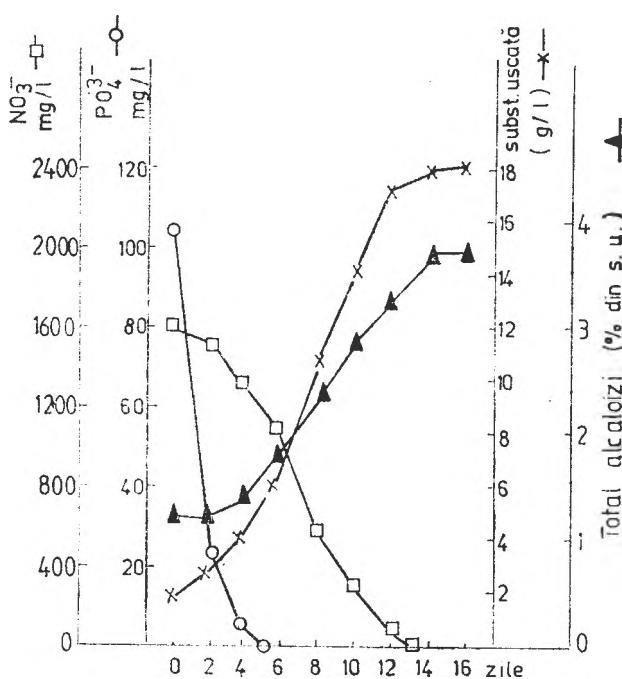


Fig. 3. Creșterea celulară și acumularea alcaloizilor la linia celulară 149 de *Berberis parvifolia* în raport cu absorbția din mediu de către celule a azotului și fosforului.

mănătoare au fost obținute și de alți autori la culturi celulare de *Catharanthus* [11] și de *Nicotiana* [12].

În ceea ce privește sinteza metabolitilor secundari, diferențele dintre cele două linii sunt nete, alcaloizii acumulându-se în cantități mult mai mari în celulele liniei 77 și într-un ritm destul de constant, în timp ce la linia 149 producerea lor este mai intensă doar spre sfârșitul etapei liniare din faza exponentională a ciclului de creștere.

În general așa cum arăta și Cresswell și colab. [2], cu privire

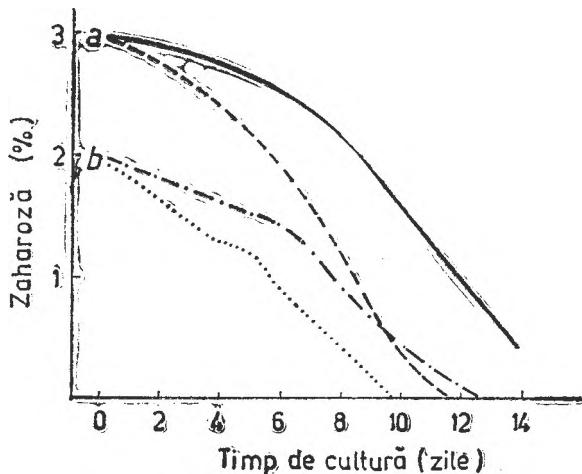


Fig. 4. Consumul zaharozei din mediu de către celulele a două linii celulare de *Berberis parvifolia*. Concentrația inițială a zaharozei: a - 3%; b - 2%. Linia celulară 77: — și - - - . Linia celulară 149: - - - și

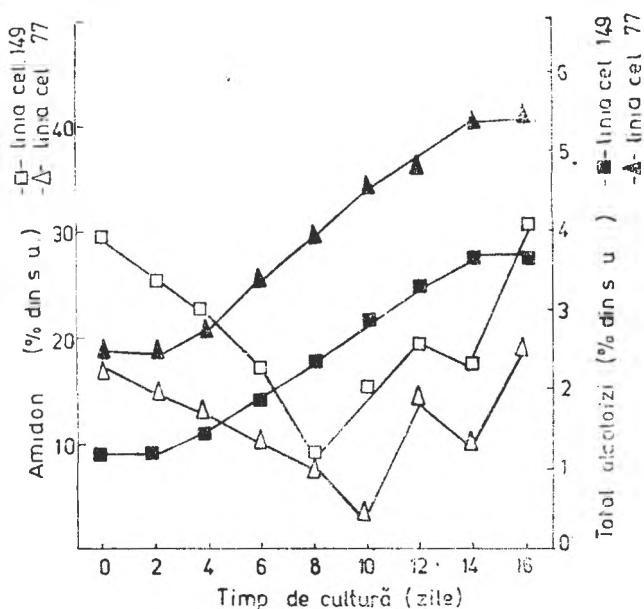


Fig. 5. Acumularea alcaloizilor și a amidonului în două linii celulare de *Berberis parvifolia* (77 și 149).

la necesarul de energie, în prima fază a ciclului unei culturi (faza de lag), are loc o acumulare a carbonului și azotului în celule intr-un fond comun necesar proceselor metabolice ulterioare. Totuși, în cazul suspensiilor celulare de *Berberis parvifolia* se observă o scădere treptată a cantității de amidon la ambele linii celulare (Fig. 5). Probabil că această utilizare a resurselor interne de glucoză, provenită din scindarea amidonului, se datorează în special capacitatea slabe de absorbție a zaharozi din mediu (Fig. 4) de către celule, asociată cu necesarul mare de energie reclamată pentru asimilarea azotului, mai ales când acesta se găsește sub forma lui oxidată, în concentrații mari (așa cum este cazul mediului Gamborg). În continuare, cantitatea de amidon scade, el fiind utilizat ca sursă de carbon și energie necesare procesului intens de înmulțire a celulelor, suspensia intrând în faza exponențială, pentru că treptat el să se acumuleze spre sfârșitul acestei etape. În același timp, se observă și o remobilizare a rezervelor de amidon care nu sunt probabil folosite pentru sinteza componentelor structurale (linia 149) ci îndeosebi pentru cea a metaboliștilor secundari, în cazul liniei 77 (Fig. 5). Diferențele între cele două linii în ceea ce privește acumularea amidonului sunt evidente. Astfel, este clar că în cazul liniei 149, linie care crește bine, dar acumulează cantități scăzute de alcaloizi, fluxul precursorilor primari este orientat cu preponderență spre stocarea lor sub formă de amidon și înspre biosintiza componentelor celulare structurale, față de linia 77 în care procesele se desfășoară într-un raport invers.

Tabel 1

Parametrii de creștere la două linii celulare de *B. parvifolia*

| Linia celulără | Substanță uscată (g/l) ziua 0 | Substanță uscată (g/l) ziua 14 | Indice de creștere | Creștere absolută | Rata specifică de creștere | Timpul de dublare (zile) | Total alcaloizi (%) din s.u.) |
|----------------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------|-------------------|----------------------------|--------------------------|-------------------------------|
| 77 | 2,1 | 15,50 | 7,38 | 0,96 | 0,17 | 4,33 | 5,40 |
| 149 | 2,2 | 18,01 | 8,18 | 1,13 | 0,19 | 3,63 | 3,56 |

Aceste deosebiri dintre cele două linii se evidențiază și în cazul unor parametri de creștere: indicele de creștere, creșterea absolută, rata specifică de creștere și timpul de dublare (calculate în funcție de biomasa celulară uscată) (Tabel 1).

Din tabel se observă clar că linia 77 crește mai slab decât linia 149, ea având nevoie de cca 7—8 zile pentru ca celulele să treacă din faza de lag (întârziere) a ciclului lor de creștere în cea exponențială, față de 5—6 zile, cât sunt necesare liniei 149. De asemenea, cantitatea de biomasă celulară se dublează într-un timp mult mai îndelungat în cazul liniei 77, iar rata specifică de creștere este mai mică.

Concluzii. 1. Prin clonarea de mici aggregate celulare au fost izolate mai multe linii celulare, înalt și slab productive, de *Berberis parvifolia*.

2. Liniile celulare etalează anumite caracteristici fiziologice și metabolice care le diferențiază una de alta (creștere celulară, conținut în proteine, amidon și alcaloizi).

3. Între sinteza proteinelor și cea a alcaloizilor protoberberinici există un raport direct proporțional.

4. În liniile celulare slab productive procesele metabolice primare sunt mult mai intense, precursorii fiind direcționati cu precădere spre biosinteza componentelor structurale celulare și pentru sinteza de amidon. În schimb, la liniile celulare înalt productive precursorii sunt utilizati mai mult pentru biosinteza alcaloizilor.

BIBLIOGRAFIE

1. Breuling, M., *Fermentation von Zellkulturen von Berberis wilsoniae Hemsl. and Wils.*, Diss., Univ. Tübingen, 1986.
2. Cresswell, R.C., Fowler, M.W., Stafford, A., Stepan-Sarkissian, G., *Inputs and outputs: primary substrates and secondary metabolism*, în Kurz, W.G.W. (Ed.), *Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures*, Vol. 2, pp. 14—26, Springer-Verlag, Berlin, 1989.
3. Deliu, C., *Cultiuri de ţesuturi și celule la plante medicinale din familiile Berberidaceae, Rutaceae și Dioscoreaceae în scopul obținerii de principii active din punct de vedere farmacologic*, Teză Dr., Univ. Babeș-Bolyai, Fac. Biol., Cluj-Napoca, 1991.
4. Deliu, C., Tămasă, M., Ghiran, D., Munteanu-Deliu, C., *Alkaloid productivity in various Berberis parvifolia cell lines*, „Contrib. Bot.” (Cluj-Napoca), 1989, 171—177.

5. Deliu, C., Tămaș, M., Pitea, M., *Conținutul în alcaloizi la Berberis parvifolia cultivată in vitro*, „Lucr. Al III-lea Simp. Naț. de Culturi de Celule și Tesuturi Vegetale” (București), 1985, 249—253.
6. Fujita, Y., *Industrial production of shikonin and berberine*, in Yamada, Y. (Ed.), *Application of Plant Cell and Tissue Culture*, pp. 228—253, Wiley, New York, 1988.
7. Galneder, E., Zenk, M. H., *Enzymology of alkaloid production in plant cell culture*, in Niijikamp, H.J.J., Van der Plas, L.H.J., Van Aartrijck, J., (Eds.), *Progress in Plant Cellular and Molecular Biology*, pp. 567—576, Kluwer, Dordrecht, 1990.
8. Gamborg, O.L., Miller, R.A., Ojima, K., *Nutrient requirements of suspension cultures of soybean cells*, „Exp. Cell Res.”, 50, 1968, 151—158.
9. Haibrock, K., *Correlation between nitrate uptake, growth and changes in metabolic activities of cultured plant cells*, in Street, H. E. (Ed.), *Tissue Culture and Plant Science*, pp. 363—378, Acad. Press, London, 1974.
10. Hinz, H., Zenk, M. H., *Production of protoberberine alkaloids by cell suspension cultures of Berberis species*, „Naturwissenschaften”, 67, 1981, 620—621.
11. Knobloch, K. H., Berlin, J., *Influence of medium composition on the formation of secondary compounds in cell suspension cultures of Catharanthus roseus (L) G. Don*, „Z. Naturforsch.”, 35C, 1980, 551—556.
12. Knobloch, K. H., Beutnagel, G., Berlin, J., *Influence of accumulated phosphate on culture growth and formation of cinnamoyl putrescines in medium-induced cell suspension cultures of Nicotiana tabacum*, „Planta”, 153, 1981, 582—585.
13. Koch, O. G., Koch, G. A., *Handbuch der Spurenanalyse*, Springer-Verlag, Berlin, 1964.
14. 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.
15. Nelson, N. J., *A photometric adaption of Somogyi method for determination of glucose*, „J. Biol. Chem.”, 153, 1944, 375—376.
16. Pitea, M., *Cercetări asupra unor alcaloizi din planta Berberis vulgaris L.*, Teză Dr., Inst. Med. Farm., Fac. Farm., Cluj, 1970.
17. Rose, D., Martin, S. M., *Parameters for growth measurement in suspension cultures of plant cells*, „Can. J. Bot.”, 52, 1974, 903—912.
18. Salzman, S., *Determinarea azotului*, în Obrejaianu, G. (Red.), *Metode de cercetare a solului*, p. 431, Ed. Acad. Rom., București, 1964.
19. Singer, S. R., *Analysing growth in cell cultures. I. Calculating growth rates*, „Can. J. Bot.”, 64, 1986, 233—237.
20. Somogyi, M., *Notes on sugar determination*, „J. Biol. Chem.”, 195, 1952, 19—23.
21. Zenk, M. H., Rueffert, M., Amann, M., Deus-Neumann, B., *Benzylisoquinoline biosynthesis by cultivated plant cells and isolated enzymes*, „J. Nat. Prod.”, 48, 1985, 725—738.

IN VITRO TUBERIZATION IN SOME POTATO CULTIVARS

MARIA ZAPIRTAN*

SUMMARY. — Four potato cultivars (Mureşan, Caty, Super and Désirée) were studied. Cv. Mureşan was the most receptive to *in vitro* tuber induction. The best results were obtained on culture media to which zeatin plus β -indolylacetic acid or benzyladenine plus α -naphthalacetic acid (each in an 0.5 mg/l amount) were added. The December–February period was found to be the most favourable time for *in vitro* tuberization.

In vitro tuberization aims at obtaining seed tubers that can be used e.g. for *in vitro* multiplication, micropropagation, selection and conservation of valuable cultivars. This process is influenced by several factors: photoperiod, temperature, season, endogenous hormones and, last but not least, the nature and concentration of sugar, mineral salts and phytohormones in the culture medium. *In vitro* tuberization also depends on the nature of cultivars [2, 6].

Wang and Hu [5] reported on *in vitro* mass tuberization and virus-free potato production in Taiwan. They established that the *in vitro* mass tuber production was optimal when the incubation was carried out at 20°C and the culture medium contained sucrose (8%) and benzyladenine (10 mg/litre). Over a period of 4 months, about 36,000 dormant minitubers were harvested from the 20-m² area of an aseptically incubated container. After 3 successive plantings into soil, a considerable amount (1,800 kg) of virus-free seed potatoes was obtained.

Kodo *et al.* [3] found that, under *in vitro* conditions, salicylic acid in 10⁻⁵ M concentration exhibited a potato tuber-inducing effect.

Ahloowalia [1] presented an integrated system of potato micropropagation for minituber seed production. Minicultures were obtained from stable cultivars cloned on the revised medium of Murashige and Skoog [4] and micropropagated serially. After 80 days of culturing in a growth chamber, the minicultures produced minitubers of about 5–25 mm in diameter. On a small experimental field, the minitubers were compared to standard seed tubers selected for high productions. There were no significant differences between the productivity performances of minitubers and standard tubers or between the numbers of tubers. The 15–20-mm minitubers behaved better than the 5–10-mm microtubers.

The experiments with zeatin, coumarin and chlorocholine chloride (CCC) [6] showed that the *in vitro* tuberization mainly depended on the nature of cultivars, while the effects of coumarin and CCC were season-dependent. In other experiments, tuberization could be induced by a bilayer technique: a liquid medium containing sucrose (8%), ben-

zyladenine (5 mg/l) and CCC (500 mg/l) was added to a solid medium [2].

The principal objective of our present study was to contribute to a better understanding of the role played in tuberization by the hormonal mixtures added to the culture media.

Material and methods. For the experiments, minicuttings formed of 1-2 nodes were used. They were cultured *in vitro* on a basal medium consisting of macroelements, trace elements, mineral salts and FeEDTA as used in the revised medium of Murashige and Skoog [4], vitamins (thiamine, HCl, pyridoxine.HCl and nicotinic acid, 1 mg/l each, and meso-inositol, 100 mg/l), sucrose (30 g/l), agar-agar (6 g/l), pH 5.7. Then, the revised Murashige-Skoog medium (MS) and the basal medium (BM) were used for preparing 5 media by addition of charcoal or phytohormones: benzyladenine (BA), α -naphthalacetic acid (NAA), gibberellic acid (GA_3), zeatin (Z) and β -indolylacetic acid (IAA). The media had the following composition:

1 — MS 1/2 (MS in which the concentration of mineral salts was reduced to half);

2 — MSC 1/2 — MS 1/2 + charcoal (5 g/l);

3 — BM + BA (1 mg/l) + NAA (0.1 mg/l) + GA_3 (0.1 mg/l);

4 — BM + BA (0.5 mg/l) + NAA (0.5 mg/l); and

5 — BM + Z (0.5 mg/l) + IAA (0.5 mg/l).

The minicuttings cultured on these media were examined periodically for assessing the evolution of cultures and determining the number of minitubers/flask and the number and length of the shoot and root neformations.

Four potato cultivars (Mureşan, Caty, Super and Désirée) were cultured *in vitro* in a growth chamber (temperature: 25°C; illumination intensity: 2000 lx for 8 hours/day).

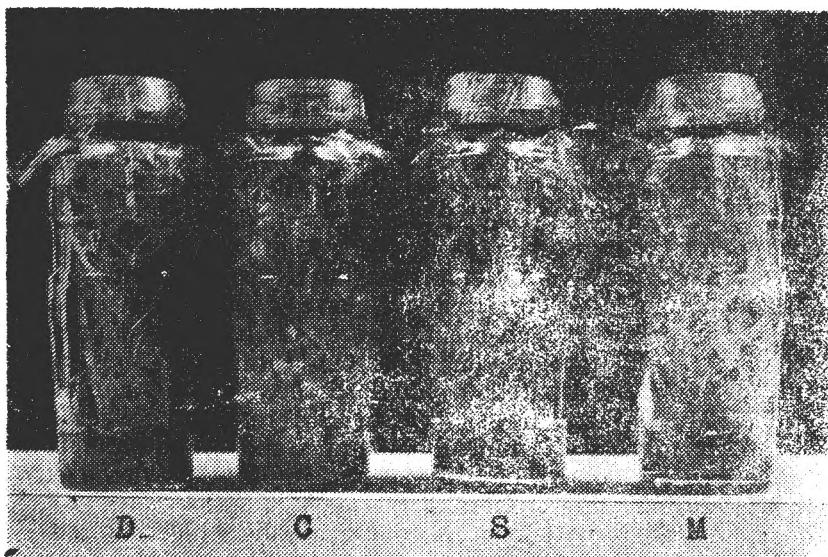


Fig. 1. Evolution of the minicuttings of 4 potato cultivars on culture medium 3 (BM + BA + NAA + GA_3). Appearance of the callus was followed by formation of minitubers on the nodes along the shoots and on the area in contact with the culture medium. D — Cv. Désirée. C — Cv. Caty. S — Cv. Super. M — Cv. Mureşan.

In vitro tuberization in 4 potato cultivars

| Cultivar | Culture medium | Shoot neofor- | | Root neoforma- | | Tubers No./flask | Notes |
|----------|----------------|---------------|----------------|----------------|----------------|---------------------|---------------------------|
| | | No. | Length (cm) | No. | Length (cm) | | |
| Mureşan | 1 | 10 | 10.0 | 3 | 2.5 | — | Thin roots and neoplasms |
| | 2 | 12 | 8.5 | 5 | 2.0 | 5 | Good evolution |
| | 3 | 20 | 12.0 | 15 | 8.2 | 5 | Very good evolution |
| | 4 | 20 | 10.0 | 12 | 6.5 | 8 | Very good evolution |
| | 5 | 19 | 9.5 | 15 | 4.8 | 12 | Best evolution |
| Caty | 1 | 2 | 5.0 | 3 | 2.0 | — | Poor evolution |
| | 2 | 5 | 6.2 | 7 | 4.2 | 2 | Slightly better evolution |
| | 3 | 15 | 8.0 | 9 | 5.3 | — | Multiplication |
| | 4 | 15 | 12.0 | 8 | 1.8 | 2 | Slightly better evolution |
| | 5 | 13 | 15.0 | 7 | 1.2 | — | Slightly better evolution |
| Super | 1 | 3 | 4.8 | 2 | 2.0 | — | Poor evolution |
| | 2 | 4 | 8.0 | 5 | 3.2 | 2 | Thin shoots |
| | 3 | 25 | 10.0 | 15 | 5.5 | 3 | 0.8—1-cm tubers |
| | 4 | 12 | 5.8 | 18 | 8.0 | 4 | Good evolution |
| | 5 | 16 | 6.5 | 20 | 12.0 | 5 | Good steady evolution |
| Désirée | 1 | 2 | 4.2 | 3 | 1.6 | — | Poor evolution |
| | 2 | 4 | 2.8 | 2 | 1.5 | 2 | Good evolution |
| | 3 | 18 | 12.0 | 6 | 5.2 | 2 | 1-cm tubers |
| | 4 | 14 | 4.9 | 19 | 7.6 | 5 | Very steady evolution |
| | 5 | 12 | 8.5 | 30 | 10.0 | 5 | 1-cm tubers |

Results. Fig. 1 shows the calluses and minitubers formed *in vitro* in the 4 potato cultivars studied. Details on the tuberization are presented in Table 1.

One can see from this table that, of the cultivars studied, cv. Mureşan was most receptive to the charcoal and hormonal mixtures added to the culture media; it had the highest regenerative capacity and exhibited a nearly steady *in vitro* evolution. On media 3—5, cv. Mureşan produced 19—20 shoots (9.5—12 cm long) and 12—15 roots (4.8—8.2 cm long). In this cultivar, 5—8 minitubers (per flask) appeared on media 2—4, whereas the minitubers were most numerous (12/flask) on medium 5 (BM + Z + IAA) (Fig. 2). It should be emphasized that evolution of this cultivar was good even on medium 2 (MS 1/2 + charcoal) (Fig. 3).

The *in vitro* tuberization in cv. Caty was quite poor. Regeneration of neoplasms on media 1 and 2 was weak. Two minitubers (per flask) appeared on media 2 and 4. Medium 3 favoured the multiplication and rooting with no tuberization, but with the generation of a whitish-farinaceous callus mass on the contact area of the explants with the me-

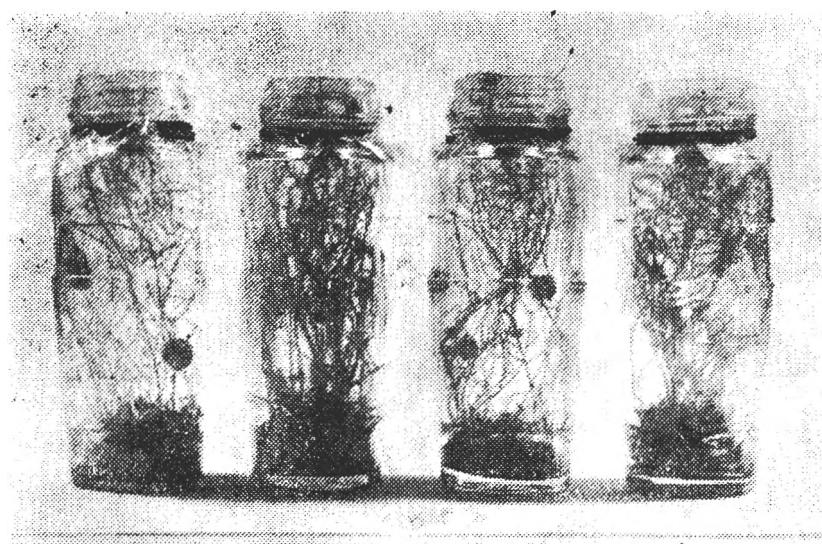


Fig. 2. Minitubers formed in cv. *Mureşan* on medium 5 (BM + Z + IAA).

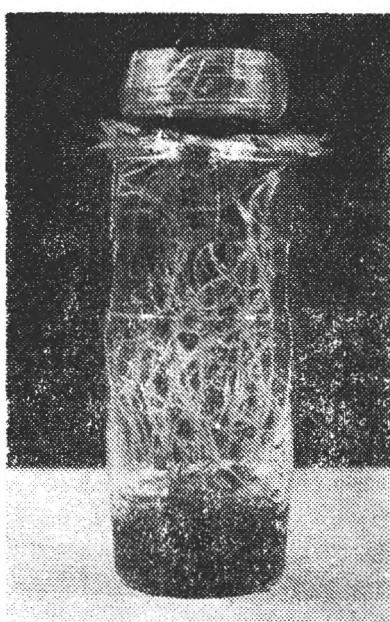


Fig. 3. Evolution of the minicuttings of cv. *Mureşan* on medium 2 (MS 1/2 + charcoal).

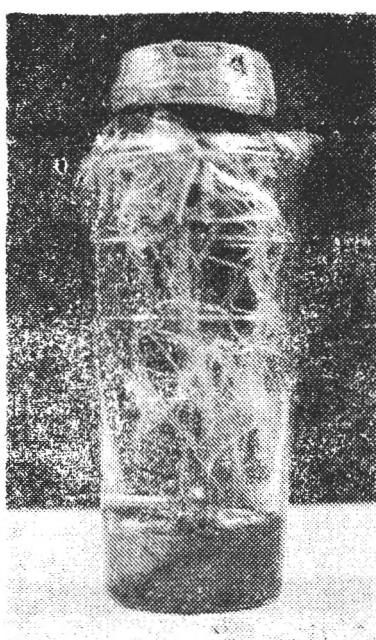


Fig. 4. Evolution of the minicuttings of cv. *Super* on medium 3 (BM + BA + NAA + GA₃).

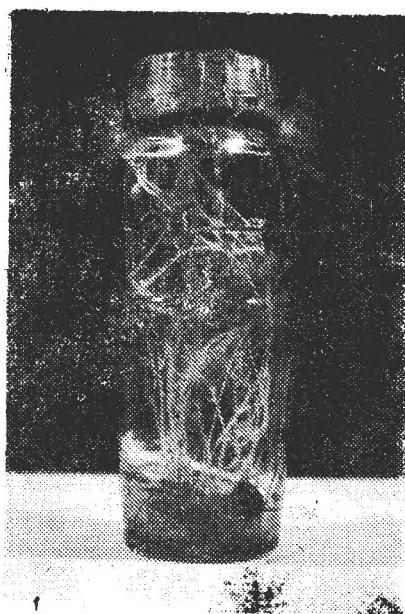


Fig. 5. Minitubers formed in cv. Désirée on medium 4 (BM + BA + NAA).

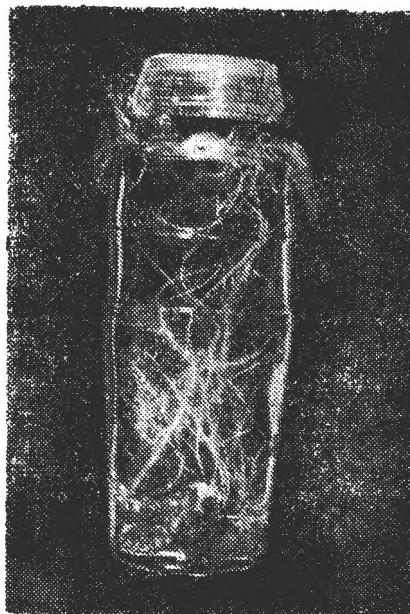


Fig. 6. Minitubers formed in cv. Désirée on medium 5 (BM + Z + IAA).

dium. Six months later, this zone generated small-diameter minitubers in an impressive number.

Cv. Super produced 3 minitubers of 0.8—1 cm in diameter on medium 3 (BM + BA + NAA + GA₃) (Fig. 4). The best results were, however, obtained on media 4 and 5. The behaviour of cv. Désirée was similar to that of cv. Super (Figs. 5 and 6).

Our results prove that for *in vitro* tuberization the nature of cultivars and the hormonal balance in the culture medium play a key role. Our other results over a period of about 6 years indicated that the season is also essential for the *in vitro* tuberization, the most favourable period being between December and February.

Conclusions. 1. Of the 4 potato cultivars studied (Mureşan, Caty, Super and Désirée), cv. Mureşan was the most receptive to charcoal and hormonal mixtures added to the culture media.

2. The *in vitro* tuberization of cvs. Mureşan, Super and Désirée was strongest on media 4 and 5, containing benzyladenine + α -naphthalacetic acid, and zeatin + β -indolylacetic acid, respectively.

3. The minitubers appeared on the nodes along the shoots and on the area in contact with the culture medium.

4. The most favourable period for *in vitro* tuberization was found to be between December and February.

REFERENCES

1. Ahloowalia, B.S., *Potato micropropagation for minituber seed production*, Abstr., 7th Int. Congr. on Plant Tissue and Cell Culture (Amsterdam, 1990), p. 86.
2. Cachiță, C.D., Zăpirțan, M., *Potato tuberogenesis using in vitro bilayer technique*, Abstr., 4th Natl. Symp. on Plant Cell and Tissue Culture (Cluj-Napoca, 1989), pp. 108—110.
3. Kodo, Y., Takahashi, K., Kikuta, Y., *Potato tuber-inducing activities of salicylic acid and related compounds*, „J. Plant Growth Regul.”, **11**, 1992, 215—219.
4. Murashige, T., Skoog, A., *Revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures*, „Physiol. Plant.”, **15**, 1962, 473—487.
5. Wang, P.-J., Hu, C.-Y., *In vitro mass tuberization and virus-free seed potato production in Taiwan*, „Amer. Potato J.”, **59**, 1982, 33—37.
6. Zăpirțan, M., Cachiță, C.D., Draica, C., *Potato shoot behaviour on media containing zeatin, coumarin or cicocel (CCC)*, Abstr., 4th Natl. Symp. on Plant Cell and Tissue Culture (Cluj-Napoca, 1989), pp. 106—108.

CONTRIBUȚII LA STUDIEREA COMPONENTELOR HUMUSULUI DIN UNELE SOLURI ALE ROMÂNIEI

VICTOR MICLAUŞ*, TEODOR LECHINTĂN*, VASILE MICLAUŞ**
și GEORGETA MARIN***

SUMMARY. — Contributions to the Study of Humus Components in Some Soils of Romania. Characterization of soils from the viewpoint of their agroproductive capacity requires the study of both physico-chemical soil parameters and qualitative composition of humus.

The authors have investigated some representative soils from the steppe, forest-steppe and forest zones. An alluvial gley (azonal) soil from the Danube Delta was also studied.

The results have shown that the humin, a substance insoluble in alkali, represented 43—81% of the humus content in the soils studied. The ratio between total carbon in humic acids and total carbon in fulvic acids was highest in the steppe soils (chernozems) and decreased towards the forest soils (albic luvisols). The humic acid fractions I (free humic acids and humic acids bound to mobile sesquioxides) and II (humic acids bound to calcium) had characteristic values: fraction I was most abundant in strongly leached soils, whereas fraction II was present in highest amounts in the steppe and forest-steppe soils. Fraction I in the soils studied increased in the order: steppe soils < forest-steppe soils < forest soils. An exceptional situation was encountered in the case of the deltaic soil which contains large quantities of nonhumified organic matter.

Având în vedere importanța deosebită a humusului atât în procesul de formare a solului cît și pentru fertilitatea acestuia, caracterizarea agroproductivă reclamă, pe lîngă mulți alți indici fizico-chimici folosiți pînă în prezent, și cunoașterea compoziției calitative a humusului.

Remarcăm faptul că materia minerală a solului intotdeauna este amestecată cu cantități variabile de materie organică de origine vegetală, animală sau microbiană, cum sunt resturile vegetale rămase în solul agricol după recoltarea culturilor (frunze, tulipini, rădăcini), îngrășăminte organice, microorganismele moarte și, în mai mică măsură, resturile animale (viermi). Toate acestea reprezintă sursa de material pentru formarea humusului, component specific solului. După Duchaufour [5], „humusul reprezintă materia organică intermediară între lumea vie și lumea minerală”, având influență hotărîtoare asupra fertilității și evoluției solurilor.

Humusul influențează proprietățile agrologice ale solului, fiind un corectiv de bază [8]: imprimă coeziune solurilor prea „ușoare” și le afinează pe cele „grele”; mărește permeabilitatea pentru aer și apă, acționând ca un regulator al umidității; favorizează formarea de aggregate

* Universitatea de Științe Agricole, Catedra de pedologie, 3900-Craiova, România

** Universitatea Babes-Bolyai Catedra de tehnologie alimentară, 3400-Craiova, România

*** Institutul de Proiectare și Cercetare „Delta Dunării”, 8800 Tulcea, România

structurale hidrostabile cu influență în atenuarea fenomenelor de gonflare și contractie. Sub aspectul proprietăților chimice, la fel ca și argila, humusul are însușirea de a fixa cationii indispensabili nutriției plantelor (K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}) și de a îi elibera pe măsura cerințelor plantelor, fie prin trecerea în soluție, fie prin schimb cu alte baze. Sub aspectul proprietăților biologice, humusul reprezintă suportul vieții din sol, servind ca sursă de energie și de elemente nutritive pentru microorganisme.

Pe lîngă toate cele prezentate mai sus, humusul determină adesea și tipul de pedogeneză. În raport de natura sa (mull, moder sau mor), el asigură stabilitatea profilului sau, din contră, provoacă și întreține degradarea solului prin iluviere.

Influențele benefice asupra proprietăților agroproductive ale solului se realizează, însă, gradat în raport cu calitatea humusului, de componentele (fracțiunile) acestuia. Prin încrarea de față se aduc contribuții tocmai la cunoașterea acestor componente.

În țara noastră sunt puține date cu privire la compoziția calitativă a humusului, deși România este considerată, pe bună dreptate, un adevărat „muzeu de soluri”. O primă contribuție, pe această linie, o considerăm pe cea adusă de către Cernescu [1, 2], care a reușit să separe din conținutul total de humus, humusul hidrosolubil. S m a r a n d a c h e [11] încearcă, pentru prima dată în România, fracționarea humusului după metoda Tiurin [13], obținând rezultate interesante. Ulterior, Daniliuc [3, 4] aduce importante date cu privire la compoziția humusului din cernoziomuri. Preocupările pe această linie au existat și în cadrul Institutului Agronomic din Cluj, dar acestea au fost limitate și au vizat alte tipuri de sol [7, 10]; în ultimii 5 ani, cercetările au fost reluate, iar rezultatele obținute de către noi fac obiectul prezentei lucrări.

Material și metodă. Acceptînd ideea, după care compoziția „amestecului” ce constituie humusul variază evident în raport de condițiile de mediu (mai întii de climă și apoi de vegetație), pentru studiul componentelor humusului am cercetat unele soluri mai răspîndite din zona de stepă, silvostepă și pădure, alături de un sol aluvial gleizat, recent emers din Delta Dunării.

Probele de sol recoltate au fost analizate în laborator, determinîndu-se pH-ul, $CaCO_3$, gradul de saturare în baze, raportul C:N, precum și fracțiunile granulometricice de bază (nisip, lut, argilă), după metode STAS, utilizate în laboratoarele de pedologie și agrochimie:

- pH-ul, potentiometric (aparat MW 84) cu electrod de sticlă în suspensie apoasă, raport sol:apă = 1:2,5;
- carbonații cu aparatul Scheibler;
- V%, prin calcul, în raport de S_B și S_H ;
- N total prin metoda Kjeldahl;
- humusul prin metoda Walkley-Black, modificarea Gogoașă.

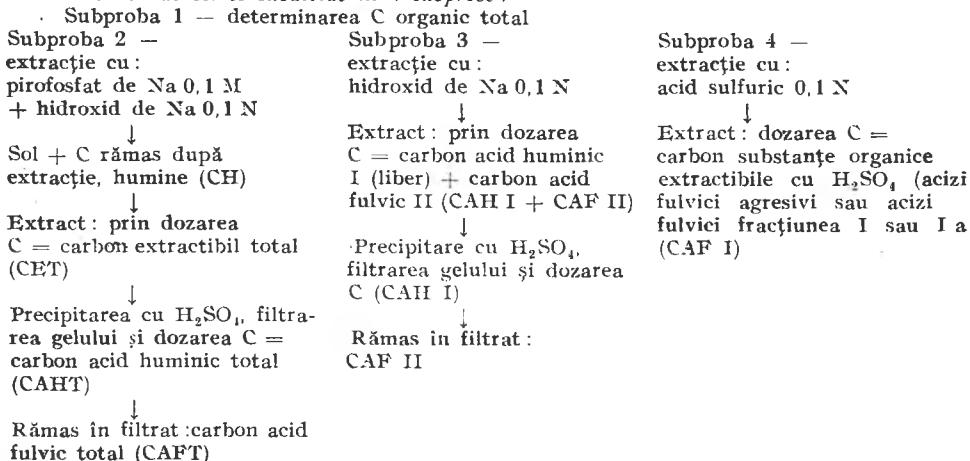
Pentru fracționarea humusului s-a folosit schema chimică prezentată în Taboul 1 [12].

Rezultate și discuții. Separarea compușilor humici de materia organică proaspătă, eventual în starea de hemic sau histic, este foarte delicată și nu se poate efectua riguros în starea actuală de cunoaștere, cel puțin din două motive: existența unor produși intermediari slab definiți și dificultatea găsirii unor reactivi care să permită „izolarea” în mod selectiv a compușilor humici fără a-i altera.

Tabel 1

Schema de fracționare chimică [12]

1. Proba de sol se subdivide în 4 subprobe:



2. Relații de calcul:

- C organic total din sol — CET = C organic din humine (CH)
- CET — CHAT = CAFT
- (CAH I + CAF II) — CAH I = CAF II
- CAHT — CAH I = CAH II, acizi huminici legați de calciu, caracteristici molișurilor
- CAFT — (CAF I + CAF II) = CAF III, acizi fulvici caracteristici mai ales molișurilor

Lăsind la o parte încercările de separare cu bromură de acetil sau cu bromoform-benzen, subliniem că cea mai mare parte a cercetătorilor consacrați în acest domeniu [2, 3, 9, 13, 14] au rămas la alcali, cu toate inconvenientele pe care acești reactivi le prezintă (la pH 13, ei sunt foarte duri și pot forma chiar compuși humici care nu au existat în sol).

Rezultatele obținute în fracționarea humusului arată mari deosebiri de la un sol la altul, în raport de arealul bioclimatic. Din acest considerent sătem puși în situația de a prezenta mai întâi principali parametri fizico-chimici ai solurilor luate în studiu, care acoperă aproximativ 130.150 km², adică 54,7% din suprafața țării [6].

Cerniozom vermic. Ocupă o suprafață de cca 19.300 km² (8,2% din suprafața țării). Are un profil de tip: Am-AC-Cca.

Ap: 0—25 cm, negru-bruniu închis (10YR 2/2) în stare umedă, glemular, lutos;

Am: 25—67 cm, negru slab brun (10YR 2/2) în stare umedă, glemular-coprolitic, lutos;

AC: 67—84 cm, brun închis (10YR 3/3) în stare umedă, poliedric subangular, lutos, prezintă crotovine și pseudomicelii;

Cca: 84—133 cm, brun deschis (10YR 4/2) în stare umedă, poliedric subangular, cu numeroase eflorescențe de CaCO_3 , lutos.

Din datele analitice prezentate în Tabelul 2 rezultă că acest sol este nediferențiat textual pe profil, conține carbonați sub adincimea de 70 cm și este eubazic; raportul C:N indică un humus de tip mull calcic.

Cernoziomuri argiloiluviale. Sunt răspândite în arealul bioclimatic de silvostepă pe o suprafață de cca 25.000 km² (10,6% din suprafața țării). Așa profilul de tip: Am-Bt-Cca.

Am: 0—27 cm, negru (10YR 2/1) în stare umedă, structură glomerulară hidrostabilă, lutos;

Tabel 2

Date analitice obținute la cernoziomul vermic de la Urileasca, Câmpia Dunării
(Pm = 440 mm; Tm = 11,1°C) (Sol etalon [15])

| Orizont | Adincimea (cm) | Nisip (2,0—0,02 mm) (%) | Argilă (<0,002 mm) (%) | Humus (%) | CaCO_3 (%) | pH in H_2O | C : N | V (%) |
|---------|-------------------|-------------------------------|------------------------------|--------------|------------------------|----------------------------------|-------|----------|
| Amp | 0—15 | 1,5 | 28,7 | 3,2 | 0 | 6,7 | 9,1 | 87,8 |
| Am | 28—43 | 1,7 | 30,3 | 2,8 | 0 | 7,1 | — | 91,9 |
| A/C | 70—82 | 1,2 | 27,1 | 2,0 | 3,8 | 8,1 | — | 100,0 |
| Cca | 85—100 | 0,9 | 26,7 | 1,0 | 12,6 | — | — | 100,0 |

Tabel 3

Date analitice obținute la cernoziomul argiloiluvial de la Călan — Poligon,
Câmpia Transilvaniei
(Pm = 600 mm; Tm = 8,4°C)

| Orizont | Adincimea (cm) | Nisip (2,0—0,02 mm) (%) | Argilă (<0,002 mm) (%) | Humus (%) | CaCO_3 (%) | pH in H_2O | C : N | V (%) |
|---------|-------------------|-------------------------------|------------------------------|--------------|------------------------|----------------------------------|-------|----------|
| Am | 10—25 | 18,7 | 37,9 | 5,9 | 0 | 6,25 | 15 | 72 |
| A/B | 30—40 | 21,2 | 48,9 | 3,1 | 0 | 6,80 | — | 87 |
| Bt | 40—60 | 21,1 | 46,6 | 1,9 | 0 | 6,93 | — | — |

Tabel 4

Date analitice obținute la cernoziomul argiloiluvial de la Petrești, Câmpia Carei
(Pm = 570 mm; Tm = 9,8°C)

| Orizont | Adincimea (cm) | Nisip (2,0—0,02 mm) (%) | Argilă (<0,002 mm) (%) | Humus (%) | CaCO_3 (%) | pH in H_2O | C : N | V (%) |
|------------------|-------------------|-------------------------------|------------------------------|--------------|------------------------|----------------------------------|-------|----------|
| Amp ₁ | 0—20 | 40,2 | 30,4 | 2,49 | 0 | 6,62 | 8—10 | 87 |
| Am ₂ | 25—30 | 36,7 | 31,6 | 2,92 | 0 | 6,40 | — | 85 |
| Bt | 60—80 | 33,3 | 36,7 | 1,25 | 0 | 7,18 | — | — |

AB: 27—40 cm, brun gălbui închis (10YR 4/4) în stare umedă, poliedric-bulgăros, luto-argilos;

Bt: 40—80 cm, brun gălbui (10YR 5/4) în stare umedă, prismatic-poliedric, argilo-lutos, dur la uscare, compact.

Datele analitice prezentate în Tabelele 3 și 4 arată că aceste soluri sunt diferențiate pe profil în privința texturii, sunt lipsite de CaCO_3 pe primii 100 cm, au reacție slab acidă; raportul C:N este mai ridicat față de cernoziomuri, indicând prezența acizilor fulvici în compoziția humusului; gradul de saturare în baze scade pînă la 72%.

Luvisol albic pseudogleizat. Ocupă (împreună cu solul brun luvic) aproximativ 61.000 km² (~ 25% din suprafața țării). Are un profil de tip: Ao-Ea-Bt-C.

Ao: 0—15 cm, cenușiu brun (10YR 5/2) în stare umedă, slab structurat glomerular-grăunțos, lutos;

Ea: 15—34 cm, cenușiu deschis (10YR 6/1) în stare umedă, luto-nisipos, nestructurat, bobovine mici;

EB: 34—51 cm, brun-cenușiu închis (10YR 4/1) în stare umedă, bulgăros, lutos,

Btw: 51—120 cm, brun gălbui închis (10YR 4/4) în stare umedă, prismatic, coeziv, argilo-lutos; pete vineții și concrețiuni feromanganice.

Din datele analitice redate în Tabelul 5 se poate constata că acest sol are o puternică diferențiere texturală pe profil, reacție acidă și un raport C:N ce indică predominanța acizilor fulvici în compoziția humusului, alături de o slabă mineralizare a materiei organice.

Tabel 5

Date analitice obținute la luvisolul albic, pseudogleizat de la Făget—Mănăstur
(Pm = 620 mm; Tm = 8,2 °C)

| Orizont | Adîncimea (cm) | Nisip (2,0—0,02 mm) (%) | Argilă (<0,002 mm) (%) | Humus (%) | CaCO ₃ (%) | pH în H ₂ O | C:N | V (%) |
|---------|-------------------|-------------------------------|------------------------------|--------------|--------------------------|------------------------------|-----|----------|
| Ao | 0—10 | 27,5 | 24,6 | 4,41 | 0 | 5,11 | 16 | 63 |
| Ea | 15—30 | 28,8 | 22,4 | 1,44 | 0 | 5,39 | — | 72 |
| Btw | 60—80 | 16,2 | 41,7 | 0,75 | 0 | 5,86 | — | 81 |

Tabel

**Date analitice obținute la solul aluvial, gleizat pe sol turbos de la Uzlină,
Delta Dunării**
(Pm = 420 mm; Tm = 10,7 °C)

| Orizont | Adîncimea (cm) | Nisip (2,0—0,02 mm) (%) | Argilă (<0,002 mm) (%) | Humus (%) | CaCO ₃ (%) | pH în H ₂ O | C:N | V (%) |
|-------------|-------------------|-------------------------------|------------------------------|--------------|--------------------------|------------------------------|------|------------------|
| Ao | 0—17 | 27,27 | 42,4 | 7,14 | 6,33 | 7,71 | 13,6 | 100 _g |
| Ao/G | 17—30 | 33,53 | 42,9 | 4,92 | 8,10 | 7,89 | — | 100 |
| CGo | 30—50 | 37,90 | 39,2 | 3,04 | 0,40 | 7,29 | — | 100 |
| Am (fossil) | 60—86 | 18,90 | 48,8 | 14,20 | 10,60 | 7,88 | — | 100 |

Tabel 7

Date analitice privind fracționarea humusului

| Solul | pH | C organic (%) | CET (%) | CAHT (%) | CAFT (%) | CH (%) | CAHT (%) | Fracțiuni ale CAFT | | Fracțiuni ale CAFT | | |
|--|------|---------------|---------|----------|----------|--------|----------|--------------------|------|--------------------|------|------|
| | | | | | | | | I | | II | | III |
| | | | | | | | | (%) | (%) | (%) | (%) | (%) |
| Cernoziom vermic (Urleasca) | 6,70 | 1,77 | 0,76 | 0,64 | 0,12 | 1,01 | 5,3 | 2,5 | 33,6 | 1,6 | 1,2 | 5,4 |
| | | | 42,7 | 36,1 | 6,6 | 57,3 | | 6,9 | 93,1 | | 18,2 | 81,8 |
| Cernoziom argiloiluvial (Căian) -- finăț -- | 5,77 | 6,84 | 2,25 | 1,52 | 0,73 | 4,59 | 2,1 | 9,9 | 13,2 | 2,6 | 10,5 | 0,2 |
| | | | 32,9 | 22,2 | 10,7 | 67,1 | | 44,6 | 55,4 | | 98,1 | 1,9 |
| Cernoziom argiloiluvial (Căian) 0--20 cm | 5,46 | 3,80 | 2,14 | 1,29 | 0,85 | 1,66 | 1,5 | 14,7 | 19,2 | 2,6 | 11,1 | 11,3 |
| | | | 56,3 | 33,9 | 22,4 | 43,7 | | 43,4 | 56,6 | | 49,6 | 50,4 |
| -- arabil -- 20--40 cm | 5,84 | 2,60 | 1,24 | 0,91 | 0,33 | 1,36 | 2,8 | 3,1 | 31,9 | 5,8 | 10,8 | 1,9 |
| | | | 47,7 | 35,0 | 12,7 | 52,3 | | 8,9 | 91,1 | | 85,0 | 15,0 |
| Cernoziom argiloiluvial (Petrești) | 6,62 | 1,46 | 0,78 | 0,50 | 0,28 | 0,68 | 1,8 | 9,6 | 24,6 | 7,5 | 9,6 | 9,6 |
| | | | 53,4 | 34,2 | 19,2 | 46,6 | | 28,1 | 71,9 | | 50,0 | 50,0 |
| Luvisol albic (Făget, Mănăstur) | 5,11 | 3,13 | 1,14 | 0,71 | 0,43 | 1,99 | 1,6 | 18,5 | 4,2 | 8,9 | 12,9 | 0,8 |
| | | | 36,4 | 22,7 | 13,7 | 63,6 | | 81,5 | 18,5 | | 94,2 | 5,8 |
| Sol aluvial, gleizat (Uzlina, Deltă) | 7,71 | 2,45 | 0,45 | 0,27 | 0,18 | 2,00 | 1,5 | 0,8 | 10,2 | 14,3 | 5,3 | 2,0 |
| | | | 18,4 | 11,0 | 7,3 | 81,7 | | 7,4 | 92,6 | | 72,6 | 27,4 |

Sol aluvial glezat, pe sol turbos (de Deltă, grinduri și luncă). Ocupă 24.600 km² (10,1% din suprafața țării), avind profilul de tip: Ao-AC-C.
 Ao: 0—17 cm, brun închis (10YR 3/3) în stare umedă, slab structurat grăunțos, luto-argilos, slab carbonatat;
 Ao/CGo: 17—30 cm, brun cenușiu închis (10YR 4 2) în stare umedă, structură poliedrică slab dezvoltată, resturi de cochilii, vinișoare de CaCO₃;
 CGo: 3—50 cm, cenușiu (10YR 5/1) în stare umedă, poliedric mic, marmorat pe fețele elementelor structurale, separații feromanganice sub formă de pete și concrețiuni;
 Am (fossil): 86 cm +, negru (10YR 2/1) în stare umedă, afectat alternativ de procese oxidative, respectiv reducătoare.

Datele analitice prezentate în Tabelul 6 indică un conținut de humus și CaCO₃ variabil pe profil și mai mare în Am (fossil), reacție slab alcalină, saturatie în baze (V=100%); raportul C:N este specific arealului bioclimatic de silvostepă.

Concluzii. Analizând datele obținute la fractionarea humusului (Tabel 7) conform schemei din Tabelul 1, se pot desprinde mai multe concluzii.

I. Humina reprezintă principala materie organică din sol; este inclusibilă în reactivi alcalini. Cantitatea ei se calculează făcând diferența între C organic total din sol și CET. Chimic, numai o destrucție a silicatiilor (cu care formează „complexe stabile”) cu HF (acid fluorhidric) permite eliberarea ei din sol. În solurile studiate, humina reprezintă 43,7—81,7% din totalul substanțelor humice Hotărtoare pentru acumularea huminei sint condițiile hidrotermice și cantitatea de materie organică brută.

2. Acizii huminici totali (CAHT) au valori maxime în solurile din zona de stepă

3. Acizii fulvici totali se găsesc în cantități mai mari în solurile cu procese de eluviere (areale bioclimatice de silvostepă și pădure).

4. Raportul CAHT:CAFT are valori maxime în solurile de stepă (cernoziomuri) și descrește spre solurile cu podzolire argiloiluvială (lesiveuri).

5. Fracțiunile acizilor huminici (I — acizi huminici liberi sau legați de sescvioxizi mobili și II — acizi huminici legați de calciu) prezintă unele valori caracteristice: fracțiunea I este maximă în solurile debazificate (lesiveuri sau luvisoluri albice), în timp ce fracțiunea II prezintă valori mai mari în cernoziomuri și cernoziomuri argiloiluviale.

6. Dintre fracțiunile acizilor fulvici, fracțiunea I (acizi fulvici agresivi crește de la cernoziomurile din stepă la solurile de pădure (debazificate). O situație de excepție se întâlnește la solurile din Delta Dunării, cu conținut ridicat în materie organică nehumificată.

BIBLIOGRAFIE

1. Cernescu, N., Cicolti, M., Raportul H:F față de valorile V și pH la solurile zonale, „Stiința Solului”, No. 3—4, 1964, 27—35.
2. Cernescu, N., Popea, F., Humusul și raportul C/N în profilul tipurilor zonale de sol, Inst. Geol. Rom., București, 1941.

3. Daniliuc, D., *Contribuții la cunoașterea calitativă a humusului pe profil la cîteva cernoziomuri*, în *Probleme de pedologie*, p. 137—146, Ed. Acad. Rom., București, 1958.
4. Daniliuc, D., *Determinarea humusului*, în *Metode de cercetare a solului*, p. 403—418, Ed. Acad. Rom., București, 1964.
5. Duchaufour, P., *L'évolution des sols*, Masson, Paris, 1968.
6. Florea, N., Munteanu, I., Raport, C., Chițu, C., Oprea, N., *Geografia solurilor României*, Ed. Științ., București, 1968.
7. Florescu, M., Bilaus, I., Neamțu G., *Caracterizarea generală a humusului dintr-un cernoziom incipient levigat și un sol brun gălbui, mediu podzolit*. I., „Lucr. Științ. Inst. Agron. Cluj, Agric.”, 21, 1965, 59—69.
8. Ionescu, M., *Materia organică a solului*, Ed. Ceres, București, 1977.
9. Kononova, M. M., *Humus of virgin and cultivated soils*, în *Gieseking, J. (Ed.), Soil Components*, Vol. 1. *Organic Components*, p. 475—526, Springer, Berlin, 1975.
10. Miclăuș, V., *Soluri podzolite și podzolice*, Ed. Ceres, București, 1970.
11. Smarandache, E., *Rolul acizilor humici în procesele de solificare*, „Bul. Științ. Acad. Rom., Secț. Științe Biol., Agron., Geol. Geogr.”, 3 (3), 1951, 17—26.
12. Stoica, E., Răută, C., Florea, N., *Metode chimice de analiză a solului*, p. 85—107, Inst. Cercet. Pedol. Agrochim., București, 1986.
13. Tiurin, I. V., *K metodike analiza dlia sravnitel'nogo izuchenija sostava poci-vennogo peregoна ili gumusa*, „Tr. Pociv. Inst. im. Dokuceaeva”, 38, 1951, 36—52.
14. Zanelli, S., *Distribuția substanțelor humice în unele soluri de munte din Masivul Bucegi*, în *Solurile Munților Bucegi*, p. 133—140, Ed. Acad. Rom., București, 1971.
15. *** *Ghidul excursiilor Conf. Naț. Știința Solului (Brăila)*, Publ. Soc. Naț. Rom. Știința Solului, București, 1982.

TESTING OF SOME SYNTHETIC DERIVATES OF L-GLUTAMIC ACID AS INHIBITORS OF SOIL UREASE ACTIVITY

MARINELA SIMIHAIAN*, STEFAN KISS**, DANIELA PAŞCA*
and CARMEN SUCIU***

SUMMARY. — Three glutamyl-nitroanilides and the corresponding free nitroanilines were tested as inhibitors of urease activity in a leached chernozem and an alluvial soil. The well-known urease inhibitor hydroquinone served for comparison. The inhibitory effect was estimated by registering the time necessary for complete hydrolysis of urea in reaction mixtures prepared from soil, urea and distilled water or solution of test compounds and incubated at laboratory temperature. It was found that the inhibitory effect of the compounds tested decreased in the following order: hydroquinone > aniline > γ -L-glutamyl-p-nitroanilide = γ -L-glutamyl-m-nitroanilide = γ -L-glutamyl-2-methoxy-p-nitroanilide > p-nitroaniline = m-nitroaniline = 2-methoxy-p-nitroaniline. The glutamyl moiety in glutamyl-nitroanilides enhanced the urease-inhibiting effect of nitroanilines.

The increase of food production to meet the growing needs related to demographic explosion is largely conditioned by the efficiency of agricultural fertilizers. Urea has gradually become the most important nitrogen fertilizer in world agriculture. But efficiency of urea is in general reduced due to excessive activity of a soil enzyme, the urease. One way to increase efficiency of urea is the inhibition of soil urease activity. In the last three decades, multilateral investigations were performed in a series of countries from Europe, North America, Asia, Australia and Africa to identify unpolluting and inexpensive chemical compounds to be used as inhibitors of soil urease activity ([3], pp. 93—298).

In the present paper we describe experiments carried out to evaluate the effect of three γ -L-glutamyl-nitroanilides on soil urease activity, as there are no literature data available on studies dealing with amino acyl nitroanilides as inhibitors of soil urease activity. Only m-nitroacetanilide and o-, m- and p-nitroanilines were tested, by Bremer and Douglas [1]. They used three Iowa soils. The reaction mixtures were prepared from 10 g of soil, 1 ml of toluene, 5 ml of urea solution containing 10 mg of urea-N and 5 ml of distilled water or 5 ml of the solution of test compound at a rate of 50 ppm (on soil basis) and incubated at 37°C for 5 hours. After incubation, the unhydrolysed urea was extracted and estimated colorimetrically. The results have shown that the urease-inhibiting effect of m-nitroacetanilide like that of the three nitroanilines was very weak: less than 1%.

* Institute of Biological Research, 3400 Cluj, Romania

** Babeş-Bolyai University, Department of Plant Biology, 3400 Cluj, Romania

*** Babeş-Bolyai University, Faculty of Chemistry, 3400 Cluj, Romania

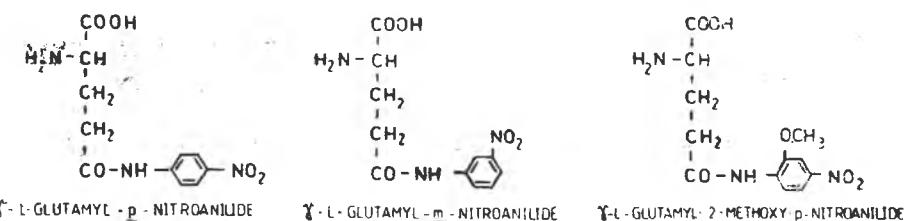


Fig. 1. Structural formulae of the glutamyl-nitroanilides tested.

Material and methods. The three glutamyl-nitroanilides tested were: γ -L-glutamyl-*p*-nitroanilide, γ -L-glutamyl-*m*-nitroanilide and γ -L-glutamyl-2-methoxy-*p*-nitroanilide (Fig. 1). The method of their synthesis is described by Cristea *et al.* [2]. Some data referring to these compounds are presented in Table 1. The free nitroanilines (*i.e.*, *p*-nitroaniline, *m*-nitroaniline and 2-methoxy-*p*-nitroaniline) as well as aniline were also tested. The well-known urease inhibitor hydroquinone served for comparison.

A heavy-textured soil (leached chernozem) and a light-textured (alluvial) soil were used for testing.

The reaction mixtures had the following composition: 5 g of air-dried soil plus 1 ml of 0.6% urea solution plus 9 ml of distilled water or 9 ml of acidic 0.6% solution of glutamyl-nitroanilide or hydroquinone at 2% rate by weight of urea (*i.e.* 0.12 mg of compound to 6 mg of urea) or 9 ml of aqueous solution of free nitroaniline or aniline in an amount equimolecular to that of the glutamyl-nitroanilide. Reaction mixtures without soil were also prepared. The incubation took place at laboratory temperature. At 1–2-day intervals, drops were taken from the aqueous phase of the reaction mixtures for detecting the unhydrolysed urea. The drops were placed on chromatographic paper, and, after drying, sprayed with a chromogenic reagent¹ to visualise the yellow spot of urea. The time (days) necessary for complete urea hydrolysis was registered. This time is shorter for reaction mixtures containing no urease inhibitors than for those with added inhibitors. In other words, prolongation of this time indicates that the test compound manifested an inhibitory effect on the soil urease activity.

Results. Surprisingly, the two soils used behaved similarly in regard of their urease activity. Therefore, the data included in Table 2

Table 1

Some data on the glutamyl-nitroanilides tested

| Compound | Yield in synthesis (%) | Melting point (°C) | $[\alpha]_{D}^{25}$ c = 1 in 0.5 N HCl |
|--|------------------------|--------------------|--|
| γ -L-Glutamyl- <i>p</i> -nitroanilide* | 82 | 187 | +34 |
| γ -L-Glutamyl- <i>m</i> -nitroanilide** | 71 | 194 | +36 |
| γ -L-Glutamyl-2-methoxy- <i>p</i> -nitroanilide** | 60 | 191 | +27 |

* Used as a substrate for the determination of γ -glutamyl transpeptidase activity in blood [4].
 ** New product [2].

¹ The reagent is prepared as follows: 1 g of *p*-dimethylaminobenzaldehyde is dissolved in 30 ml of absolute ethanol, then 7.6 ml of syrupous (89%) *o*-phosphoric acid, 22.4 ml of distilled water and 180 ml of absolute ethanol are added ([3], p. 115).

Table 2

Effect of γ -L-glutamyl-nitroanilides and free nitroanilines on soil urease activity as compared with the effect of hydroquinone and aniline

| Compound | Time necessary for complete hydrolysis of urea (days) |
|--|---|
| No (control) | 11 |
| Hydroquinone | 32 |
| γ -L-Glutamyl- <i>p</i> -nitroanilide | 18 |
| <i>p</i> -Nitroaniline | 15 |
| γ -L-Glutamyl- <i>m</i> -nitroanilide | 18 |
| <i>m</i> -Nitroaniline | 15 |
| γ -L-Glutamyl-2-methoxy- <i>p</i> -nitroanilide | 18 |
| 2-Methoxy- <i>p</i> -nitroaniline | 15 |
| Aniline | 25 |

are valid for both soils. One can see from this table that each compound tested had an inhibitory effect on soil urease activity. Hydroquinone was the strongest inhibitor prolonging the time necessary for complete urea hydrolysis from 11 to 32 days. The three γ -L-glutamyl-nitroanilides tested brought about a 7-day delay in complete urea hydrolysis. The delay caused by equimolecular amounts of the free nitroanilines was shorter, lasting only 4 days. This means that the glutamyl moiety in glutamyl-nitroanilides enhanced the urease-inhibiting effect of nitroanilines. Consequently, the presence of nitro group or of nitro and methoxy groups in nitroanilines attenuated the inhibitory effect of their aniline moiety.

In comparison with the 5-hour incubation experiments of Bremer and Douglas [1], in which the three nitroanilines exhibited a very weak inhibitory effect on soil urease activity, in our experiments, which lasted many days, the urease-inhibiting effect of *p*- and *m*-nitroanilines was more evident.

Conclusions. 1. The three γ -L-glutamyl-nitroanilides tested inhibited soil urease activity to a larger extent than did the corresponding free nitroanilines.

2. The urease-inhibiting effect of these compounds did not reach that exerted by aniline and, especially, by hydroquinone.

REFERENCES

1. Bremer, J. M., Douglas, L. A., *Inhibition of urease activity in soils*, „Soil Biol. Biochem.”, 3, 1971, 297—307.
2. Cristea, I., Mager, S., Suciu, C., Plătăreanu, G., *New γ -L-glutamylamide derivatives, Part I*, „Rev. Roum. Chim.” (in press).
3. Kiss, S., Stefanic, G., Pașca, D., Drăgan-Bulardă, M., Zborovschi, E., Crișan, R., *Enzimologia mediului înconjurător*, Vol. 1, Ed. Ceres, București, 1991.
4. Orłowski, M., *Properties of purified hog kidney γ -glutamyl transpeptidase*, „Arch. Immunol. Ther. Exp.”, 13, 1965, 535—537.

ENZYMOLOGICAL EVALUATION OF THE EFFICIENCY OF THE MEASURES APPLIED FOR BIOLOGICAL RECULTIVATION OF LEAD AND ZINC MINE SPOILS

ȘTEFAN KISS*, DANIELA PAŞCA**, MIHAIL DRĂGAN-BULARDĂ*, RADU CRIŞAN** and VASILE MUNTEAN**

SUMMARY. — Recultivation plots installed on lead and zinc mine spoils in the 1987—1988 period were sampled from their 0—30-cm layer and analysed enzymologically in 1992. The analytical data served for calculation of the enzymatic indicator considered as an index of the biological quality of spoils and, implicitly, as an indicator of the recultivation efficiency. The enzymatic indicators of differently recultivated plots made it possible to draw the conclusions that covering the spoils with a soil layer is the most important measure for rapid recultivation of raw and young spoils, and NPK fertilisation is the minimum treatment for the recultivation of old spoils.

The biological recultivation experiments started on 14 small (7-m^2) spoil plots in 1987 and on two larger (50-m^2) spoil plots in 1988 at the lead and zinc mine in Rodna, Bistrița-Năsăud district and the results obtained in the enzymological analyses of spoils sampled from the 0—10-cm layer in the 1987—1989 period were already described [8] and the conclusions drawn were that for rapid recultivation of raw and young spoils the measures to be applied should include covering with soil, NPK fertilisation and sowing of a grass-legume mixture, while for the recultivation of old spoils at least NPK fertilisers should be applied [8].

The present paper summarises the results registered in the enzymological analyses of spoil samples collected from three layers of the plots during 1992.

Material and methods. The recultivation measures applied to the experimental plots and described in detail in [8] are briefly presented in Table 1. It should be added that in the 1990—1992 period the plots received no fertilisers and they were not sown and moistened artificially. The spoil plots and the untreated, control places in their vicinity were sampled in spring (May 25, 1992) and in summer (August 28, 1992). The sampling depths were 0—10, 10—20 and 20—30 cm. A native, soddy soil at the foot of the spoil dump was also sampled. The samples were analysed for determination of their invertase, phosphatase, catalase and actual and potential dehydrogenase activities; the so-called catalytic activity (*i.e.*, the nonenzymatic H_2O_2 -splitting capacity) was also estimated. The analytical data served for calculation of the enzymatic indicator considered as an index of the biological quality of spoils (and soils) and, implicitly, as an index of the recultivation efficiency [8]. Individual values of the seasonal and global enzymatic indicators can be arranged in a decreasing order showing the position of each spoil plot and control place (and that of the native soil) in this hierarchy.

* Babes-Bolyai University, Department of Plant Biology, 3400 Cluj, Romania

** Biological Research Institute, 3400 Cluj, Romania

Table 1

Recultivation measures applied to experimental plots

| Date of the installation of plots | Terrace no. and age | Aspect* | Plot no. | Treatment** |
|-----------------------------------|---------------------|---------|----------|--------------------|
| June 24, 1987 | V (2 years) | SW | 1 | S + FYM + NPK + RC |
| | | | 2 | FYM + NPK + RC |
| | | | 3 | NPK |
| | | C 1—3 | | No (control) |
| | | SE | 4 | S + FYM + NPK + RC |
| | | | 5 | FYM + NPK + RC |
| | | | 6 | NPK |
| | | C 4—6 | | No (control) |
| | (7 years) | SW | 7 | NPK + RC |
| | | | 8 | NPK |
| | | C 7, 8 | | No (control) |
| | | SE | 9 | NPK + RC |
| | | | 10 | NPK |
| | | C 9, 10 | | No (control) |
| July 5, 1988 | III (10 years) | SW | 11 | NPK + RC |
| | | | 12 | NPK |
| | | | C 11, 12 | No (control) |
| | | SE | 13 | NPK + RC |
| | | | 14 | NPK |
| | | | C 13, 14 | No (control) |
| | VI (5 years) | SW | I | S + NPK + RC |
| | | | C I | No (control) |
| | | SE | II | S + NPK + Spoil-15 |
| | | | C II | No (control) |

* SW — South-western. SE — South-eastern.

** S — Covering with soil. FYM — Farmyard manuring. NPK — Fertilising with NPK. RC — Sowing of ryegrass (*Lolium multiflorum*) and clover (*Trifolium pratense*). Spoil-15 — Treatment with spontaneously re-vegetated, 15-year-old spoil.

Results. Table 2 shows that in the spring of 1992 the enzymatic indicators calculated for the 0—30-cm layer of spoil plots and control places gave the highest values in plots II, I, 4, and 1, i.e., in the soil-covered spoils plots. This indicator was even higher in plot II than in the native soil. The lowest enzymatic indicators were recorded in plots 3 and 6 (i.e., in the youngest spoils treated with NPK only) and in the control places C 4—6, C 9, 10, C 1—3 and C 7, 8. Plots 11—14 installed on terrace III consisting of 10-year-old spoils were in general more enzyme-active than plots 7—10 formed on the 7-year-old spoil terrace V. At the same time, plots 11—14, fertilised and sown or only fertilised, occupied close positions, that were, however, higher than those of their control places;

Table 2
Seasonal enzymatic indicators of spoils sampled in the spring of 1992

| Position | Plot no. | Enzymatic indicator |
|----------|-------------|---------------------|
| 1 | II | 610.99 |
| 2 | Native soil | 538.94 |
| 3 | I | 525.86 |
| 4 | 4 | 501.86 |
| 5 | 1 | 501.43 |
| 6 | 11 | 403.49 |
| 7 | 14 | 374.54 |
| 8 | 10 | 335.34 |
| 9 | 13 | 334.90 |
| 10 | 12 | 322.58 |
| 11 | C 11, 12 | 271.02 |
| 12 | 2 | 269.96 |
| 13 | 7 | 265.16 |
| 14 | 5 | 262.11 |
| 15 | C I | 259.14 |
| 16 | 9 | 258.36 |
| 17 | C 13, 14 | 258.12 |
| 18 | 8 | 253.67 |
| 19 | C II | 234.81 |
| 20 | C 4-6 | 230.15 |
| 21 | 3 | 225.88 |
| 22 | C 9, 10 | 222.30 |
| 23 | C 1-3 | 212.82 |
| 24 | 6 | 192.80 |
| 25 | C 7, 8 | 181.40 |

Table 3
Seasonal enzymatic indicators of spoils sampled in the summer of 1992

| Position | Plot no. | Enzymatic indicator |
|----------|-------------|---------------------|
| 1 | Native soil | 504.39 |
| 2 | II | 492.98 |
| 3 | I | 458.40 |
| 4 | 1 | 378.69 |
| 5 | 11 | 356.46 |
| 6 | 4 | 331.86 |
| 7 | 14 | 309.45 |
| 8 | 12 | 260.62 |
| 9 | 13 | 259.22 |
| 10 | 10 | 230.67 |
| 11 | C II | 229.76 |
| 12 | C 11, 12 | 211.72 |
| 13 | C I | 203.80 |
| 14 | 9 | 200.63 |
| 15 | C 13, 14 | 199.29 |
| 16 | 5 | 191.78 |
| 17 | 2 | 190.42 |
| 18 | C 9, 10 | 188.59 |
| 19 | 7 | 185.18 |
| 20 | C 4-6 | 184.26 |
| 21 | 3 | 181.25 |
| 22 | 8 | 180.63 |
| 23 | 6 | 179.58 |
| 24 | C 1-3 | 176.54 |
| 25 | C 7, 8 | 153.17 |

Table 4

Global enzymatic indicators of spoils sampled in 1992

| Position | Plot no. | Enzymatic indicator |
|----------|-------------|---------------------|
| 1 | II | 620.99 |
| 2 | Native soil | 556.03 |
| 3 | I | 549.87 |
| 4 | 1 | 486.55 |
| 5 | 4 | 472.73 |
| 6 | 11 | 410.33 |
| 7 | 14 | 374.30 |
| 8 | 13 | 327.71 |
| 9 | 12 | 316.85 |
| 10 | 10 | 307.49 |
| 11 | C 11, 12 | 267.44 |
| 12 | C 13, 14 | 253.70 |
| 13 | C II | 250.70 |
| 14 | 5 | 249.23 |
| 15 | 2 | 248.64 |
| 16 | C I | 245.82 |
| 17 | 9 | 213.36 |
| 18 | 7 | 238.54 |
| 19 | 8 | 234.44 |
| 20 | C 9, 10 | 222.92 |
| 21 | C 4-6 | 221.24 |
| 22 | 3 | 214.33 |
| 23 | C 1-3 | 213.15 |
| 24 | 6 | 200.10 |
| 25 | C 7, 8 | 178.44 |

consequently, for recultivation of these old (more precisely, 10-year-old) spoils, NPK fertilisation was a more important measure than was sowing of the ryegrass-clover mixture.

All these trends in variation of enzymatic indicators as shown by Table 1 were similar to those observable in Tables 3 and 4.

The present results are in good agreement with those registered for the 1987-1989 period [8] and the conclusions drawn in [8] are also confirmed.

Enzymological evaluation of the efficiency of the measures applied for recultivation of mine spoils, overburdens, other wastes and exhausted peatlands is also dealt with in several recent papers (e.g. [1-7, 9-15].

Conclusions. 1. The most important measure for rapid recultivation of raw and young lead and zinc mine spoils is their covering with an at least 10 cm thick soil layer.

2. The minimum treatment for recultivation of old lead and zinc mine spoils is their fertilisation with NPK.

REFERENCES

- Bentham, H., Harris, J.A., Birch, P., Short, K.C., *Habitat classification and soil restoration assessment using analysis of soil microbiological and physico-chemical characteristics*, „J. Appl. Ecol.“, 29, 1992, 711-718.

2. Gel'tser, Yu. G., *Pokazateli biologicheskoi aktivnosti v pochvennykh issledovaniyakh*, „Pochvovedenie“, No. 9, 1990, 47—60.
3. Gilewska, M., *Rekultywacja biologiczna gruntów pogórniczych na przykładzie KWB „Konin“*, „Roczn. Akad. Roln.“ (Poznań), No. 211, 1991, 1—59.
4. Gil-Sotres, F., Trasar-Cepeda, Ma. C., Ciardi, C., Ceccanti, B., Leirós, Ma. C., *Biochemical characterization of biological activity in very young mine soils*, „Biol. Fert. Soils“, 13, 1992, 25—30.
5. González-Sangregorio, Ma. V., Trasar-Cepeda, Ma. C., Leirós, Ma. C., Gil-Sotres, F., Guitian-Ojea, F., *Early stages of lignite mine soil genesis: changes in biochemical properties*, „Soil Biol. Biochem.“, 23, 1991, 589—595.
6. Harris, J. A., Birch, P., *Land reclamation and restoration*, in Fry, J. C., Gad, G. M., Herbert, R. A., Jones, C. W., Watson-Craik, I. A. (Eds.), *Microbial Control of Pollution*, pp. 269—291, Cambridge Univ. Press, Cambridge, 1992.
7. Idrisova, Z. N., *Vliyanie biologicheskoi rekultivatsii na uluchshenie osnovnykh parametrov plodorodiya tekhnogenno narushennykh pochv*, in Okalquivanie i Intensivnoe Ispol'zovanie Meliorirovannykh Zemel' Nechernozemnoi Zony, pp. 14—15, Sel'skokhoz. Inst., Gorkii, 1990.
8. Kiss, S., Pasca, D., Drăgan-Bularda, M., Cristea, V., Blagă, G., Crișan, R., Muntean, V., Zborovschi, E., Mitroescu, S., *Enzymological analysis of lead and zinc mine spoils submitted to biological recultivation*, „Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Biol.“, 35 (2), 1990, 70—79.
9. Klubek, B., Carlson, C. L., Oliver, J., Adriano, D. C., *Characterization of microbial abundance and activity from three coal ash basins*, „Soil Biol. Biochem.“, 24, 1992, 1119—1125.
10. Lukina, N. N., *Fermentativnaya aktivnost' rekultiviruemых отвалов в Подмосковском бассейне*, „Vestn. Mosk. Univ., Ser. 17. Pochvoved.“ № 1 1991, 63—66.
11. Napiasnikova, E. V., Makarova, A. P., *Mikroorganizmy i biokhimicheskie svoistva rizosfery rastenii rekultiviruemых земель зоны KATEKA*, „Tez. Dokl. 4. Vses. Nauch. Konf. 'Mikroorganizmy v Sel'skom Khozyaistve'“ (Pushchino, 1992), 1992, pp. 144—145.
12. Ross, D. J., Speir, T. W., Cowling, J. C., Feltham, C. W., *Soil restoration under pasture after lignite mining: management effects on soil biochemical properties and their relationships with herbage yields*, „Plant Soil“, 140, 1992, 85—97.
13. Shcherbakov, A. P., Uskov, B. V., Kosolapova, A. V., *Biologicheskaya aktivnost' pochvogruntov gidrootvala pri sel'skokhozyaistvennoi rekultivatsii*, „Dokl. VASKhNIL“, No. 11, 1991, 2—4.
14. Shirokikh, A. A., Vertogradskaya, I. A., *Biologicheskie aspekty transformatsii organiceskogo veshchestva vyrabotannykh torfyanikov*, „Troy. Prom.“, No. 2, 1992, 26—27.
15. Uzbek, I. Kh., *Osobennosti fermentativnoi aktivnosti rekultivirovannykh pochv*, „Pochvovedenie“, No. 3, 1991, 91—96.

RECENZII

Ryszard J. Chróst (Editor). *Microbial Enzymes in Aquatic Environments*, Springer-Verlag, New York, 1991, XVIII + 318 pages with 122 figures and 46 tables in the text.

As the Editor mentions in the Preface, the 19 chapters included into the book are based on papers presented at the First Workshop on Enzymes in Aquatic Environments, held from 23 to 27 July 1989 at Ringberg Castle, situated in the Bavarian Alps (Germany).

Chapters 1–6 cover general aspects of extracellular enzymes and ectoenzymes in freshwater and marine ecosystems; they have the following titles (and authors): Early studies on ecto- and extracellular enzymes in aquatic environments (J. Overbeck); Extracellular enzymatic interactions: storage, redistribution, and interspecific communication (R.G. Wetzel); Environmental control of the synthesis and activity of aquatic microbial ectoenzymes (R. J. Chróst); Microbial extracellular enzyme activity: a new key parameter in aquatic ecology (H.-G. Hoppe.); Ecological aspects of enzymatic activity in marine sediments (L.-A. Meyer-Reil); Extracellular enzyme activity in eutrophic and polyhumic lakes (U. Münster).

Chapters 7–9 deal with aquatic protease and peptidase activities; Protein degradation in aquatic environments (G. Billen); Peptidase activity in river biofilms by product analysis (S.E. Jones and M.A. Lock); Aminopeptidase activity in lakes of differing eutrophication (T.R. Jacobsen and H. Rai).

Chapters 10–15 are studies on phosphohydrolases in aquatic environments: Role of ecto-phosphohydrolases in phosphorus regeneration in estuarine and coastal ecosystems (J.W. Ammerman); Bacterial phosphatases from different habitats in a small, hardwater lake (J.B. Cotner, jr. and R.G. Wetzel); Phosphatase activity in an acid, limed Swedish lake (H. Olsson); Phosphatase activities in Lake Kinneret phytoplankton (D. Wynne, B. Kaplan, and T. Berman); Filtration and buoyant density characterization of algal alkaline

phosphatase (D.A. Franck); Cyclic nucleotide phosphodiesterase activity in epilimnetic lake water (J. Barfield and D.A. Franck).

The last chapters (16–19) are devoted to different hydrolases in various aquatic habitats: Chitinase activity in estuarine waters (R.A. Smucker and C.K. Kim); Significance of extracellular enzymes for organic matter degradation and nutrient regeneration in small streams (J. Marxsen and K.-P. Witzel); Enzyme activities in billabongs of southeastern Australia (P.I. Boon); Hydrolytic activities of organisms and biogenic structures in deep-sea sediments (M. Küster, P. Jensen, and L.-A. Meyer-Reil).

The book is a valuable source of information for all interested in fundamental and applied study of freshwater or marine ecosystems, and, undoubtedly, it will stimulate further development of aquatic enzymology.

STEFAN KISS

Stephan Wirth, Entwicklung und Anwendung neuer Methoden zur Bestimmung von Enzymaktivitäten und zum Nachweis mikrobieller Populationsdichte der Horizontabfolge einer sauren Braunerde unter Buche (Development and Application of New Methods for Determination of Enzyme Activities and for Estimation of Microbial Population Densities in the Horizon Sequence of an Acid Brown Earth under Beech), Forschungszentrum Waldökosysteme der Universität, Göttingen, 1991, 158 pages (including 59 figures and 6 tables in the text) and an appendix (consisting of 17 tables on 18 pages).

The book was published as Band (Volume) 66 of the „Berichte des Forschungszentrums Waldökosysteme. Reihe A“ (Reports of the Research Centre Forest Ecosystems, Series A).

The researches described in the book were carried out on litter and soil samples collected in a 145-year-old beech forest (*Luzulo-Fagetum typicum*) located on the plateau of Solling Mountains, Germany. The soil is an Acid

Brown Earth characterized by the humus form „typical moder“. The horizon sequence studied comprised 5 distinct, clearly developed horizons: the organic horizons L, F and H, a vastly humified horizon (Ahh) between the organic litter compartment and the mineral soil compartment, and the mineral horizon (Aeh, 0–5 cm).

The substrates used in both enzymological and microbiological analyses were soluble, dye-labelled and acid-precipitable polysaccharide and protein derivatives. Fluorescein diacetate (FDA) was also used as a substrate hydrolyzable by many enzymes (proteases and also lipases and other esterases).

An extraction procedure involving sodium acetate-acetic acid buffer (pH 5; 0.5 M; 5 ml/g soil) and an assay system adapted to microtitre plates were developed for routine colourimetric determination of endo-acting cellulase, xylanase, amylase, 1,3- β -glucanase, chitinase, and protease activities and also of FDA-hydrolase activity from the 5 horizons specified above. The enzymes present in the extracts were partially purified by ammonium sulphate precipitation and dialysis against demineralized water, then assayed for pH and temperature characteristics and for activity profiles after gel permeation chromatography.

The results have shown, among other things, that the properties of polysaccharidases were very similar and remarkably stable in time. The enzymes were very active in the L and F horizons, but their activity was significantly lower in the H, Ahh and Aeh layers. Cellulase, xylanase and chitinase activities were highly correlated with total-C content and closely related to total-N content of the horizons.

Population densities (colony-forming units) of polysaccharide- and protein-degrading bacteria, actinomycetes and fungi were estimated in the H, Ahh and Aeh horizons. The nutrient media containing dye-labelled substrates were inoculated with dilutions of the horizon materials. The pour plate method was applied. The degraded, cleared zones on the plates were detected by video image analysis. Total counts of bacteria, actinomycetes and fungi were also estimated.

Microbial population densities were found to be higher in the H and Ahh

horizons than in the Aeh layer. Counts of substrate-degrading bacteria and actinomycetes were not higher than 7% of the total bacterial and actinomycete counts. Contrarily, the substrate-degrading fungi represented at least 60% of the total fungal counts. The relationship between activities of enzymes extracted from the horizons and the corresponding microbial population densities was much clearer for the fungal than for the bacterial and actinomycete populations.

By developing the new methods briefly characterized above, Dr. S. Wirth brought a valuable contribution to further development of soil enzymology.

STEFAN KISS

Gunilla Asplund, On the Origin of Organohalogens Found in the Environment, Linköping Studies in Arts and Science No. 77, Edited by the Department of Theme Research, Water and Environmental Studies, Linköping University, Linköping, Sweden, 1992, 50 pages including 19 figures and 7 tables. The book is based on 6 original papers by Dr. G. Asplund and her collaborators. Reprinted copies of these papers comprising 61 pages are enclosed to the book.

The halogenated organic compounds (organohalogens) are either man-made or natural products.

Different types of organohalogens are used in the plastic industry or as pesticides, solvents and cooling fluids. They are also formed as by-products of pulp bleaching, wastewater disinfection and waste incineration. Of all the organic compounds with a potential environmental impact, those that are chlorinated have received the most attention. Thus, DDT, polychlorinated biphenyls, dibenzo-p-dioxins, trihalomethanes and chlorophenols are all examples of halogenated organic compounds considered as very dangerous pollutants. Chlorine disinfection of drinking water may be an important source of human exposure to organohalogens but is negligible as a source of environmental pollution.

The natural production of organohalogens is smaller than their industrial production. Moreover, G. Asplund and her collaborators have presented convincing evidence that the natural pro-

duction of organohalogens is more widespread than previously assumed.

After a short review of literature on the biological production of organohalogens by more than a thousand of species (fungi, lichens, bacteria, algae, invertebrates and vertebrates as well as higher plants), the book describes the methods for determination of total amount of organohalogens in water, soil and plants. Then, the production of organohalogens in soils is dealt with. The major discovery in this respect is that the soils contain an extractable chloroperoxidase-like enzyme which catalyses chlorination of organic molecules, including humic substances, in the presence of hydrogen peroxide and inorganic chloride.

Production of organohalogens may also occur in vegetation, water bodies and sediments and the atmosphere, but the main natural sources of these compounds are the soils.

As concerns human impact on natural halogenation, G. Asplund has shown

that acidification of soils and surface waters as a result of environmental pollution caused by human activities has an enhancing effect on the enzymatic chlorination of organic compounds (the optimum pH of chloroperoxidase in soils is between 3.0 and 3.5).

The bibliographical list comprises 114 titles.

Dr. G. Asplund's excellent book, which is addressed to chemists, biologists, biochemists, and environmentalists, will, undoubtedly, stimulate further research on the production, chemical structure and biological properties of the natural organohalogens and on their fate in the environment. At the same time, the book is a useful source of information also for those working on preventing environmental pollution with man-made organohalogens.

STEFAN KISS

Tiparul executat la Imprimeria „ARDEALUL” Cluj, cda 86

In cel de al XXXVII-lea an (1992) *Studia Universitatis Babeş-Bolyai* apare in următoarele serii:

matematică (trimestrial)
fizică (semestrial)
chimie (semestrial)
geologie (semestrial)
geografie (semestrial)
biologie (semestrial)
filosofie (semestrial)
sociologie-politologie (semestrial)
psihologie-pedagogie (semestrial)
științe economice (semestrial)
științe juridice (semestrial)
istorie (semestrial)
filologie (trimestrial)
teologie ortodoxă (semestrial)

In the XXXVII-th year of its publication (1992) *Studia Universitatis Babeş-Bolyai* is issued in the following series:

mathematics (quarterly)
physics (semesterily)
chemistry (semesterily)
geology (semesterily)
geography (semesterily)
biology (semesterily)
philosophy (semesterily)
sociology-politology (semesterily)
psychology-pedagogy (semesterily)
economic sciences (semesterily)
juridical sciences (semesterily)
history (semesterily)
philology (quarterly)
orthodox theology (semesterily)

Dans sa XXXVII-e année (1992) *Studia Universitatis Babeş-Bolyai* paraît dans les séries suivantes:

mathématiques (trimestriellement)
physique (semestriellement)
chimie (semestriellement)
géologie (semestriellement)
géographie (semestriellement)
biologie (semestriellement)
philosophie (semestriellement)
sociologie-politologie (semestriellement)
psychologie-pédagogie (semestriellement)
sciences économiques (semestriellement)
sciences juridiques (semestriellement)
histoire (semestriellement)
philologie (trimestriellement)
théologie orthodoxe (semestriellement)

43 869

LEI 200