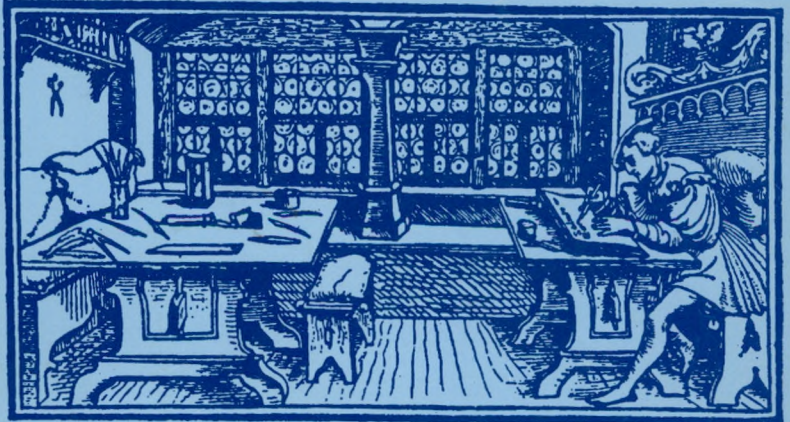


STUDIA

UNIVERSITATIS
BABES-BOLYAI

B I O L O G I A
C L U J - N A P O C A 1 9 9 6



COMITETUL DE REDACȚIE AL SERIEI BIOLOGIA:

prof. N. COMAN, prof. V. CRISTEA, prof. M. DRĂGAN - BULARDA

***(secretar de redacție), prof. S. KISS (redactor coordonator), prof. I. POP,
prof. N. TOMESCU, conf. C. TARBA, cercet. șt. I. G. RACOVIȚĂ.***

**SECRETAR GENERAL DE REDACȚIE:
*Prof. LIVIU ALBU***

STUDIA

UNIVERSITATIS BABEȘ-BOLYAI

BIOLOGIA

1-2

Redacția: 3400 CLUJ-NAPOCA, str. M. Kogălniceanu 1 Telefon 19 43 15

SUMAR — CONTENTS — SOMMAIRE — INHALT

S. KISS, M. DRĂGAN-BULARDA, D. PAȘCA, Enzymology of Technogenic Soils	3
A. RASIGA, L. S. PÉTERFI, L. MOMEU, Compoziția și structura comunităților algale din râul Someșul Cald, Transilvania, România ● Composition and Structure of Algal Communities in the Someșul Cald River, Transylvania, Romania	23
Z. BUZ, Analiza palinologică a mlaștinii Păraul Cald, Corund — județul Harghita ● Palynological Analysis of the Păraul Cald Bog, Corund — Harghita County	39
Z. BUZ, Analiza palinologică a mlaștinii Fântâna Brazilor, Corund — județul Har- ghita ● Palynological Analysis of the Fântâna Brazilor Bog, Corund — Har- ghita County	45
[Z. MĂTIC], L. A. FLOCA, A. A. HODOROGA, A. IUREZEANU, Cercetări ecolo- gice privind populațiile de Chilopode în unele tipuri de păduri din județul Bistrița-Năsăud ● Ecological Researches Concerning the Chilopod Populations from Some Forest Types in the Bistrița-Năsăud County	51
T. CEUCA, D. CRIȘAN, I. OLARU, Diplopede din Nordul Moldovei (Zona Dorne- lor), România (<i>Chordeumatida</i> — <i>Mastigophorophyllidae</i>). Notă a II-a ● Diplopede from the North of Moldavia (Dorna Area), Romania (<i>Chordeumatida</i> — <i>Mastigopho- rophyllidae</i>). Note II	57
A. CRIȘAN, I. TEODOR, Researches on <i>Chrysomelidae</i> (Coleoptera) Fauna in „Cheile Turului” în 1995	65
E. KESSLER, E. GĂL, New Taxa in the Neogene Bird Fauna from Eastern Para- tethys	73
A. VINTILĂ, G. LAZĂR-KEUL, M. KEUL, A. ANDREICA, Phytotoxische Ala- chlor-Wirkungen auf Weizenkeimpflanzen (<i>Triticum aestivum</i> L.) ● Phytotoxic Effects of Alachlor on Wheat Seedlings (<i>Triticum aestivum</i> L.)	81
A. POP, A. NICOARĂ, Heavy Metals in Three Species of Edible Mushrooms	93

D. BÁTHORY, P. GUŞ, A. NICOARĂ, V. BERCEA, Heavy Metal Contents in Soil and Cultivated Plants (<i>Zea mays</i> L., <i>Solanum tuberosum</i> L.) under the Influence of Fertilizers	97
P. KÓSA, C. TARBA, Effects of Diethylstilbestrol on Calcium Fluxes through the Inner Membrane of Rat Hepatic Mitochondria	105
N. BUCUR, M. A. RUSU, Evoluția activității transaminazelor serice în toxiciza hepatică indusă cu tetraclorură de carbon la șobolani de diferite vârste ● Evolution of the Activity of Serum Transaminases in Liver Toxicosis Induced by Carbon Tetrachloride in Rats of Different Ages	115
M. A. RUSU, N. BUCUR, M. TĂMAȘ, C. PUICĂ, Aspecte ale acțiunii sucului presat din <i>Veronica officinalis</i> asupra ficatului intoxicaat cu tetraclorură de carbon, la șobolani ● Aspects of the Action of Juice Pressed from <i>Veronica officinalis</i> on the Carbon Tetrachloride-Intoxicated Liver in Rats	121
D. COPREAN, N. COMAN, A. PROTASE, M. POPESCU, C. HAȘ, Aspecte genetice în distrofia musculară severă cu transmitere autosomal recesivă ● Genetic Aspects in the Severe Autosomal Recessive Muscular Dystrophy	127
L. A. FLOCA, O. COZAR, M. TRIFU, L. DĂRĂBAN, T. FIAT, M. BAYER, L. BERKESY, Cercetări privind impactul transferului radionuclizilor în biotopurile ecosistemului acvatic din bazinul Someșului ● Researches Concerning the Impact of the Transfer of Radionuclides into the Biotopes of Aquatic Ecosystem of the Someș Basin	135
C. TARBA, P. HINKLE, Use of Heptadecylhydroxycoumarin Fluorescence to Monitor pH Changes in the Alkalophilic Bacterium <i>Bacillus firmus</i> OF4	141
A. L. BUTIUC, M. DRĂGAN-BULARDA, Izolări de microorganisme producătoare de antibiotice ● Isolation of Microorganisms Producing Antibiotics	157
L. OPREAN, Capacități alcoologene și de multiplicare ale unor tulpini de drojzii industriale ● Alcohologenic and Multiplication Capacities of Some Industrial Yeast Strains	165
V. COȘIER, M. DIȚĂ, Reducerea microbiană a cromului hexavalent în nămolul activat ● Microbial Reduction of Hexavalent Chromium in Activated Sludge	169
N. MILOȘEVIĆ, M. GOVEDARICA, M. JARAK, V. HADŽIĆ, M. BELIĆ, Effects of Compaction on Soil Structure, Microbial Populations and Enzyme Activities	177
D. PAȘCA, V. CRISTEA, R. CRIȘAN, V. MUNTEAN, S. KISS, M. DRĂGAN-BULARDA, Potențialul enzimatic al unui sol tehnogen supus revegetării cu cătina albă (<i>Hippophaë rhamnoides</i> L.) ● Enzymatic Potential of a Technogenic Soil Submitted to Revegetation with Sea-buckthorn (<i>Hippophaë rhamnoides</i> L.)	183
M. SIMIHAIAN, E. MANOLACHE, T. PICIU, S. KISS, Study of Some Physicochemical and Enzymological Properties of a Buried Soil (Part 2)	195
V. MUNTEAN, Research on Enzymes Catalysing the Synthesis and Hydrolysis of Levans and Dextrans in Salt Lake Sediments	205
S. KISS, M. DRĂGAN-BULARDA, D. PAȘCA, Bibliography of Environmental Enzymology in Romania. II	217
Recenzii—Book Reviews—Comptes Rendus—Buchbesprechungen	
V. Cristea, La conservation de la nature en Roumanie (I. POP)	237
V. Cristea, S. Denaeyer, J.-P. Herremans, I. Goia, <i>Ocrotirea naturii și protejerea mediului în România</i> (I. POP)	237
G. W. Lüttig (Ed.), <i>Proceedings, 10 th International Peat Congress</i> (D. PAȘCA)	238
B. Ceccanti, C. Garcia (Eds.), <i>Environmental Biochemistry in Practice, Vol. 1</i> (S. KISS)	240
F. Guitián Ojea (Ed.), <i>Recuperación de las Escobreras de la Mina de Liguitos de Melrama (A Cornuña)</i> (S. KISS)	242
W. Balzer, <i>Auswirkungen langjähriger Klärschlammdüngung und daraus resultierender Schwermetallakkumulationen auf den mikrobiologischen Status verschiedener Böden</i> (S. KISS)	242

ENZYMOLGY OF TECHNOGENIC SOILS

STEFAN KISS*, MIHAIL DRĂGAN-BULARDA* and DANIELA PAȘCA**

SUMMARY. — The data published in the world literature on enzyme activities in technogenic soils after appearance of our book *Enzymology of Technogenic soils* in 1993 are summarised. The literature data published before 1993 but available to us only after 1993 will also be reviewed.

Introduction

Enzymology of technogenic soils is a rapidly developing branch of soil enzymology. This fact is reflected by the great number of papers that have appeared after publication of our book *Enzymology of Technogenic Soils* in 1993 [10]. Summarising the investigations described in these papers is the objective of our present work, in which the literature data published before 1993 but available to us only after 1993 will also be reviewed.

The practical and theoretical importance of the recultivation of mined lands and the usefulness of enzymological methods in studies of technogenic soils were emphasised, besides the authors cited in [9; 10, p. 3], also by Sutton and Dick [34] and Harris [7].

Technogenic soils from coal mine spoils

The enzymological investigations carried out by Keleberda and her collaborators in the Ukraine and published in the 1973—1976 period (see [10, p. 4—5]) were also reviewed in the book of Zaitsev *et al.* [36].

The studies performed by Bender and his co-workers in the Konin Brown Coal Basin (summarised in [10, pp. 19—22]) were amply reviewed in a synthesis work of Bender [2] dealing with the biological recultivation in Poland.

Results of the soil-enzymological investigations published by Naprasnikova and her research group in the 1982—1992 period were reviewed in [10, pp. 24—25]. In continuation of these investigations carried out at the brown coal strip mines located in the Nazarovo Basin (which belongs to the Kansk-Achinsk Fuel-Energetic Complex, Siberia, Russia), Naprasnikova [16] has described a 5-year experiment, in which spoil heaps of different ages (<1 to 10 years) were sampled

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

** Biological Research Institute, 3400 Cluj, Romania

every day during the vegetation season for determination of their enzyme activities (sampling depth was 0—5 cm). It was found again that the enzymatic potential of spoil heaps increased with their age. Counts and biomass of microorganisms in the 0—5—cm layer also increased with the age of spoil heaps.

Generalising the results obtained during studying the soil-forming processes in the technogenic landscapes created by coal strip mining in the Kuznetsk Basin (Siberia, Russia) (see [10, p. 26]), Kleven'skaya [13, 14] reiterates that the associations between microorganisms and plants, owing to accumulation of enzymes, especially of polyphenol oxidase and peroxidase in the rhizosphere, speed up the elementary pedogenetic processes in the technogenic soils.

In continuation of the investigations carried out in the brown coal area in the Rhine region, Germany and reviewed in [10, pp. 29—31], Schumacher *et al.* [25] sampled, at the beginning of March 1992, two young (< 12 years) and four old (> 25 years) recultivated spoil (loess) plots. One of the young plots contained arable soil and the other was under forest vegetation. The four old plots were used as non-manured and farmyard-manured arable lands, forest and grassland, respectively. A native arable loess soil was the control. Sampling depths were 0—15 and 15—30 cm (arable soils), Ah horizon (mostly the 5—10—cm depth) and Y1 horizon (up to 30—cm depth) (forest and grassland soils). Dehydrogenase and invertase activities, and substrate-induced respiration (CO₂ evolution from glucose-amended samples) were always highest in the old grassland soil, and lowest in the young arable soil. Both young and old forest soils were more active than the old arable soils. Surprisingly, farmyard manuring of the old arable soil did not result in increased activities and respiration. In concordance with these findings, organic C content was low in arable soils and showed important accumulations in the order: old forest soil > old grassland soil > young forest soil.

In a similar study, Schneider *et al.* [24] compared about 10— and 25—year—old recultivation spoil (loess) plots used as arable lands or forests. Samplings were made in the springs of the 1988—1993 period. Dehydrogenase activity and substrate-induced respiration determined in both whole soil aggregates (> 1.5 cm) and in their outer, middle and inner parts from the 5—10—cm layers of 10— and 25—year—old arable spoil plots did not show any significant differences depending on plot age and soil aggregate parts. Contrarily, dehydrogenase activity and respiration in the 5—10—cm layers of the forest soils were significantly higher in the 25— than in the 10—year—old plots and increased, within the soil aggregates, from the outer parts towards the inner ones, in plots of both ages. At the 20—25—cm layers of the same soils, the activity and respiration gave low values, were not age-dependent and did not show evident differences in the three parts of the soil aggregates. Organic C content was found again to accumulate in the forest soils. Abundance of different invertebrates, including earthworms, was also greater in the forest than in the arable soils. In

conclusion, it was recommended that agricultural recultivation of brown coal spoils in the studied region should begin with forest recultivation: under such conditions, the arable soils will reach a "maturity stage" more rapidly.

Many opencast coal mining sites in England were studied from soil-enzymological viewpoint, too (see [10, pp. 33—34]). Edgerton *et al.* [3] sampled soils from three restored field areas at the Erin opencast coal mining site located near Denby in Derbyshire. The areas were recultivated using stored subsoil material due to a lack of original topsoil. At sampling time (early April 1991), the three areas were 5—, 6— and 11—year—old, respectively. The 5— and 11—year—old areas were allowed to revegetate naturally. The 6—year—old area was managed as a low input—low output grass—clover ley for the first three years and then an attempt was made to create a diverse grassland. As water—logging and compaction are common problems in restoration of mine soils, a part of the 6—year—old area was subdivided into an area subjected to periodical flooding and another in which the soil was artificially compacted during restoration. Sampling depth was 0—30 cm.

Besides several physical and chemical soil properties, dehydrogenase activity (as an indicator of total soil microbial activity) and ATP concentration (taken as microbial biomass C after multiplying by the factor 168.5) were also determined. Table 1 shows that textural class is loam in the 11—year—old area and silt loam in the other areas. Dehydrogenase activity and ATP concentration increased with increasing age of the three areas, not considering the flooded and compacted 6—year—old areas. However, for both properties the increase was only significant ($p < 0.05$) between the 5— and 11—year—old areas. Flooding and compaction had a significantly ($p < 0.05$) negative influence on both properties whose values in the flooded and compacted 6—year—old areas were even lower than those measured in the 5—year—old area.

High linear correlation was found between the amount of water—stable aggregates (> 2 mm) and microbial biomass C with both values increasing with age in all areas. The highest values were registered, as expected, in the 11—year—old area, whereas the compacted 6—year—old area gave the lowest ones.

One of the conclusions drawn from the chemical and enzymological investigation of the recultivated spoils at the Meirama opencast lignite mine (Galicia, Spain) was that in these mine soils during their 7 years of recultivation establishment of C and N cycles progressed satisfactorily, although less clearly for N than for C (see [10, pp. 34—36]).

The phosphorus cycle in the Meirama lignite mine soils was also studied: Trasar—Cepeda *et al.* initiated this study in 1989 and published its results in 1993 [35].

In the spring of 1989, samples were taken from the 0—10—cm layer of 1—, 3— and 5—year—old recultivation plots. In the spring of 1990, raw spoil and the 0—10—cm layer of 4— and 7—year—old plots were sampled. Native Galician soils served for comparison. Phosphatase acti-

Table 1

Physical, chemical and microbiological properties of soils in restored areas at the Erin opencast coal mining site located near Denby in Derbyshire

(values represent means \pm standard errors; all results are expressed on an oven-dried weight basis) [3]

Age of areas	Number of replicates	Textural class	Bulk density (g/cm ³)	pH in H ₂ O	Total C (mg/g)	Total N (mg/g)	DHA* (µg TPF/g)	ATP (ng/g)
11 years	15	Loam	1.30 \pm 0.03	6.64 \pm 0.10	21.9 \pm 1.5	1.61 \pm 0.11	159.1 \pm 29.7	520 \pm 90
6 years	5	Silt loam	1.31 \pm 0.01	6.99 \pm 0.02	18.9 \pm 0.9	1.75 \pm 0.08	144.6 \pm 23.6	347 \pm 60
6 years (flooded)	5	Silt loam	1.34 \pm 0.01	6.76 \pm 0.01	18.5 \pm 2.2	1.45 \pm 0.01	74.9 \pm 8.8	123 \pm 30
6 years (compacted)	5	Silt loam	1.52 \pm 0.03	7.72 \pm 0.12	23.8 \pm 2.6	1.52 \pm 0.14	65.4 \pm 13.0	95 \pm 30
5 years	15	Silt loam	1.32 \pm 0.02	7.94 \pm 0.06	30.4 \pm 2.8	1.65 \pm 0.13	83.9 \pm 12.8	221 \pm 70

* DHA = Dehydrogenase activity. TPF = Triphenylformazan.

vity was determined in the 1989 samples, while those collected in 1990 were used for analysis of P. As Fig. 1 shows, phosphatase activity was found again to increase with mine soil age. In contrast to another 1-year-old plot in which only acid phosphatase activity was detectable (see [10, p. 34]), the soil in the 1-year-old plot studied by Tra-sar-Cepeda *et al.* manifested a slightly higher alkaline than acid phosphatase activity. The reverse was true for the older plots. Thus, the ratio of peak acid to peak alkaline phosphatase activity was 0.55, 1.05 and 1.41 in the 1-, 3- and 5-year-old plots, respectively.

The total P content was low in the raw spoil (253 $\mu\text{g P/g}$) and the majority (77%) corresponded to non-extractable forms. In the 4- and 7-year-old mine soils the total P contents were very similar and with about 100 $\mu\text{g/g}$ higher than in the spoil; this can be attributed to the P fertiliser applied at the start of recultivation. Total extractable inorganic and organic P contents increased with the age of mine soils. However, although inorganic P levels were similar to those found in native Galician soils, organic P levels were extremely low (even in the 7-year-old soil) compared with native soils of similar pH and organic matter content. The ratios C: organic P and N: organic P were

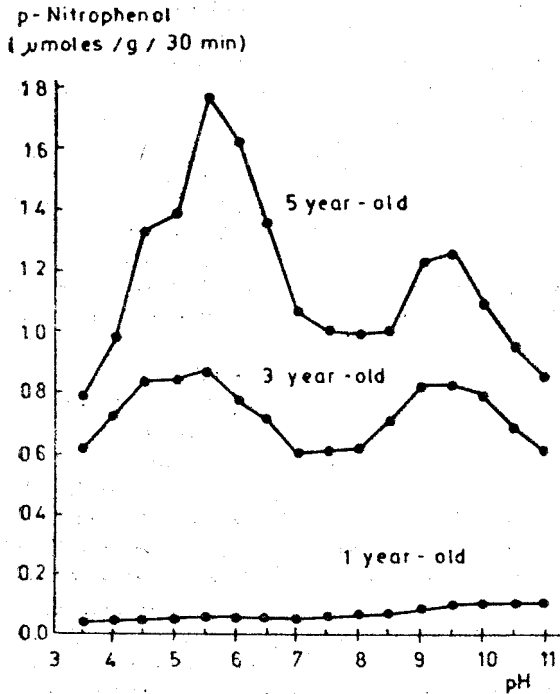


Fig. 1. pH dependence of the phosphatase activity in mine soils from Meirama [35].

much lower in the 4— than in the 7—year—old mine soil, but much higher than in the native soils. In other words, accumulation of organic P in mine soils was slow, more precisely it was much slower than accumulation of C and N. These findings clearly indicate that the P cycle has not been successfully established in the studied mine soils. This may, in the long-term, lead to serious deficiencies in plant-available P.

In a laboratory experiment for studying the possibility to replace inorganic fertilisers by cattle slurry in recultivation of lignite mine spoils, Saá *et al.* [23] have mixed samples of raw spoil from the Meirama lignite mine with cattle slurry (containing 9% dry matter; 44.20% total C, 3.04% total N, 1.14% P_2O_5 ; 3.95% K_2O) in two doses (175 ml/kg spoil — mixture P and 350 ml/kg spoil — mixture G). The mixtures were moistened to 80% of field capacity, then incubated at 28°C for 5 months. During incubation, every second day the moisture content was restored to 80% field capacity. After 0, 2 and 5 months of incubation, the mixtures were analysed to determine several enzyme activities (dehydrogenase, β -glucosidase, urease, protease on casein, protease on α -benzoyl-N-arginineamide, phosphatase), total C and N contents, amounts of monosaccharides and phenols in aqueous extract as well as amounts of humic substances and organo-mineral complexes.

Each enzyme activity was extremely low in the raw spoil and very high in the cattle slurry. This is why the mixtures at time 0 exhibited high activities; the activity increase was more pronounced in mixture G than in mixture P, excepting activities of β -glucosidase and protease on benzoyl-arginineamide, the increase of which was not dependent of the cattle slurry dose. During the first 2 months of incubation, dehydrogenase and urease activities decreased, while the other activities increased in both mixtures. During the next 3 months, the activities slightly increased or remained unchanged in mixture P and markedly decreased in mixture G. Nevertheless, at the end of the 5—month incubation period each activity in each mixture exceeded many times the activity values registered in the raw spoil before incubation. This means that the cattle slurry amendment led to the formation of an enzymatic potential in the spoil.

During the incubation of the spoil-cattle slurry mixtures, the total C contents steadily decreased indicating mineralisation processes, whereas the total N contents remained practically constant indicating that there was no N loss due to volatilisation. The monosaccharide contents increased continuously, while the phenol contents decreased. Accelerated formation of clay-bound humic substances also occurred. In conclusion, fertilisation with cattle slurry was considered as an attractive option for rapid recultivation of lignite mine spoils.

Enzymological and other biochemical properties as well as physical, chemical and pollution-neutralising properties of the Meirama lignite mine spoils and soils have recently been reviewed by Gil-Sotres *et al.* [5] and also referred to in three other review articles [6, 15, 26].

In the Czech Republic, enzymological investigations of technogenic soils were carried out in the North Bohemian Brown Coal District.

These investigations, performed in the March 1984—September 1987 period, were described by Šiša in two unpublished reports in 1985 and 1988 [29], by Šiša and Belatková in a poster communication in 1991 [31] and by Šiša in an article published in 1993 [30]. The mining sites selected for investigations are typical representatives of the entire Brown Coal District as regards both opencast mining and recultivation technologies applied.

Three enzyme activities (catalase, invertase and amylase), basal respiration (CO_2 evolution from unamended samples), potential respiration (CO_2 evolution from ammonium sulphate- and glucose-amended samples), ratio between potential respiration and basal respiration (taken as an indicator of humus stability), humus content and pH were determined in overburdens and adjacent native soils.

The investigations carried out at the selected mining sites will be summarised below.

At Vršany, before opencast mining of coal, the removed topsoil and subsoil were dumped as a mixture. Enzyme activities in the 0—20— and 20—40—cm layers of dump and native soil (chernozem on loess) presented the following order: dump 20—40 cm < dump 0—20 cm < native soil 20—40 cm < native soil 0—20 cm. In other words, dumping of overburdens led to degradation of enzyme activities. Basal respiration showed a rather reverse trend, but potential respiration and potential per basal respiration ratio as well as humus content behaved like enzyme activities. pH was about 8.5 in the dump and nearly 8 in the native soil.

At Mariánské Radčice, where the topsoil and subsoil were also dumped together, the differences between the 0—20— and 20—40—cm layers of dump and native soil (chernozem on clay) were less pronounced than at Vršany. The chernozem at Mariánské Radčice was somewhat less active biologically than the chernozem at Vršany.

At Užín, some overburden (gray clay) plots not covered with topsoil were submitted to agricultural or silvicultural recultivation. Other plots, covered with topsoil, were used only for agricultural recultivation. In the 0—40—cm layer analysed, each enzyme activity was highest in the topsoiled plots, whereas the lowest values were registered in the non-topsoiled agriculturally recultivated plots (catalase) or in the silviculturally recultivated ones (invertase and amylase). This means that topsoiling of overburdens had a beneficial effect on their enzyme activities, and agricultural recultivation was a better technology than the silvicultural one. Humus content and basal respiration were lowest in the topsoiled plots. Contrarily, potential respiration and potential per basal respiration ratio were highest in the topsoiled plots and, at the same time, they were lowest in the silviculturally recultivated plots. Mean values of pH were 6.15 (non-topsoiled agriculturally recultivated plots), 6.60 (topsoiled plots) and 6.00 (silviculturally recultivated plots).

At the Lotta Marie mine, the agricultural recultivation of the non-topsoiled overburdens (loess mixed with sand) was also more efficient

than the silvicultural recultivation. Both 0—20— and 20—40—cm layers of the agriculturally recultivated plots were more catalase-active, showed higher basal and potential respiration and potential per basal respiration ratio and contained more humus than the corresponding layers of the silviculturally recultivated plots. pH in the two layers was higher in the agriculturally than in the silviculturally recultivated plots (7.80 and 7.81, and 5.04 and 5.39, respectively).

At Strîmice, toxic sands (containing high amounts of H^+ , Al^{3+} , Fe^{3+} ; pH 4.79) were recultivated agriculturally on two areas. Previously, both areas were covered with an isolating layer of bentonite followed by overlaying of original topsoil. The recultivation began in 1973/1974 on area 1 (called Svoboda) and in 1982 on area 2 (experimental field). Thickness of bentonite layer was 20 cm on both areas, whereas that of topsoil was 50 cm on area 1 and 30 cm on area 2. An area with non-covered and non-recultivated toxic sands served as control. The 0—20— and 20—40—cm layers on areas 1 and 2 and the 0—15—cm layer of the control sands were analysed in 1986 and 1987. The results have shown that invertase and amylase activities, potential respiration, potential per basal respiration ratio as well as humus content were highest on area 1, while catalase activity and basal respiration gave the highest values on area 2. All parameters, excepting amylase activity, were lowest in the control sands. Due to recultivation, the pH increased to 7.07—7.48 on area 1 and to 8.21—8.53 on area 2.

Technogenic soils on exhausted peatlands

In continuation of the investigations summarised in [10, pp. 40—41], Shirokikh [28] found that peroxidase activity behaved like polyphenol oxidase activity.

The enzymological investigations carried out by Shirokikh and co-workers were also referred to in two brief review articles [27, 33].

Technogenic soils from retorted oil shale

The investigations of Biondini *et al.* dealing with the recultivation of retorted oil shale materials in the Piceance Basin, north-western Colorado (see [10, pp. 46—48]) were also amply referred to in Harris and Hill's [8] review article.

Technogenic soils from iron mine spoils

In Russia, some spoil heaps around the iron strip mines located in the Kursk Magnetic Anomaly region were studied enzymologically (see [10, pp.52—53]). Germanova *et al.* [4] have determined urease and catalase activities in the 0—5—cm layer of raw and 5—year—old spoil heaps at the Kostomuksha strip iron mine located in the northern subzone of the taiga zone (Northern Karelia, Russian Federation). The

adjacent, undisturbed podzolic soil under pine forest served for comparison.

Due to the unfavorable climatic conditions (number of days without frost: 80—90/year; medium monthly temperature in July: 14°C; annual amount of precipitations: 600 mm), development of natural vegetation was very poor; microbial counts and diversity were small and enzyme activities were similarly low in both raw and 5—year—old spoils as compared to values registered in the undisturbed soil. As first step in recultivation, levelling of spoils is recommended to improve their water regime.

Technogenic soils from lead and zinc mine wastes

The biological recultivation experiments started on 14 small (7—m²) spoil plots in 1987 and on two larger (50—m²) spoil plots in 1988 at the lead and zinc mine in Rodna, Bistrița-Năsăud district, Romania and the results obtained in the enzymological analyses of spoils sampled from the 0—10—cm layer in the 1987—1989 period were summarised in [10, pp. 58—59] with the conclusion that for rapid recultivation of raw and young spoils the measures to be applied should include covering with soil, NPK fertilisation and sowing of grass-legume mixture, while for the recultivation of old spoils at least NPK fertilisers should be applied. Enzymological analyses of spoils and adjacent native soil were carried out in the next years, too. Thus, in 1992 (May 25 and August 28) samples were taken from three depths: 0—10, 10—20 and 20—30 cm. The enzymatic indicator showed again the highest values in the soil-covered small and large spoil plots and in the native soil and, as expected, the lowest values were recorded in the youngest (untreated control and only NPK-fertilized) spoils [11, 12].

Evolution of the enzymatic potential in the 0—10—cm layer of spoil plots during the 1987 (1988)—1994 period was also evaluated [17]. Fig. 2 was selected to illustrate the evolution of enzymatic potential in soil-covered spoil plots (plots 1, I and II) as compared to plots 2 and 3 (not covered with soil), untreated spoils (control 1—3, control I and II) and native soil. It is evident from this figure that the favourable effect of a soil cover on the enzymatic potential of spoils is long-lasting.

The soil cover also resulted in increased nematode abundance, diversity and maturity index [19, 20].

Technogenic soils from gold mine wastes

Enzymological and other biochemical as well as chemical and physical properties of such soils were dealt with by Ross *et al.* [21]. For rehabilitation of gold mine wastes, a field experiment was carried out at the Golden Cross mine located in Waitakauri Valley, at the southern end of the Coromandel Range, North Island, New Zealand. Plots (6×6 m) were installed on a waste rock stack that had been levelled and consolidated. Weathered andesite overburden was sub-

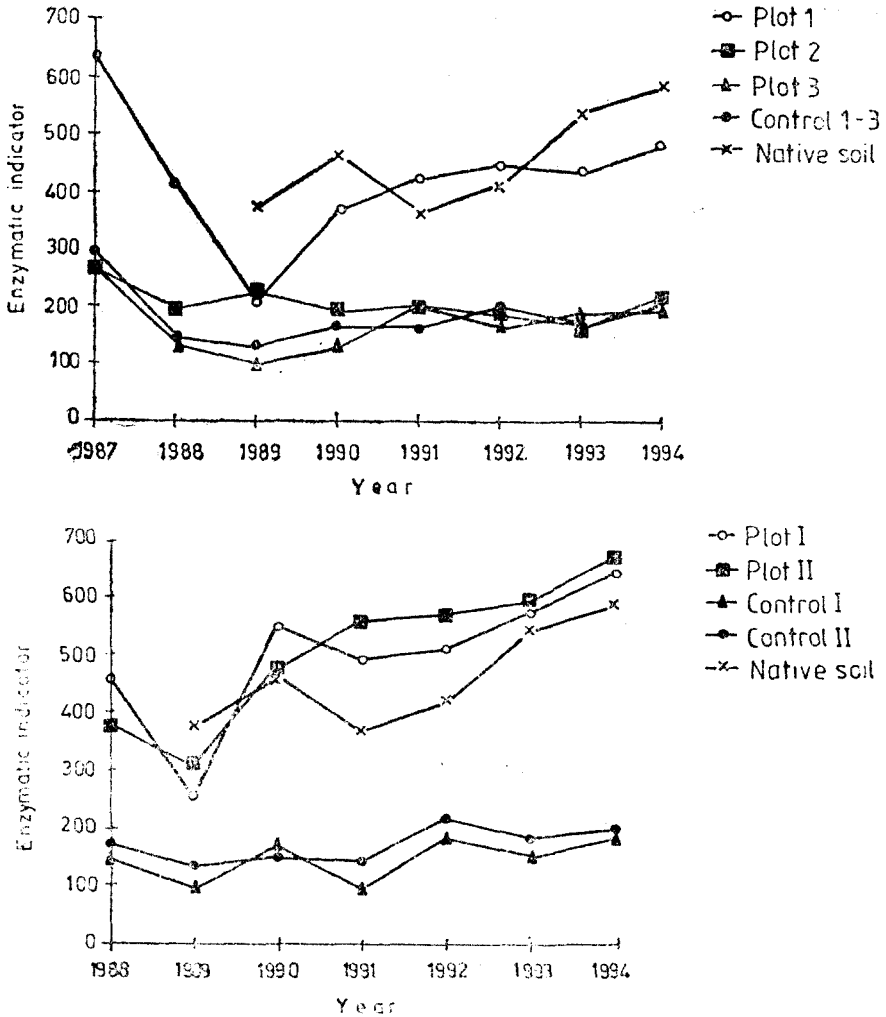


Fig. 2. Evolution of the enzymatic potential in some spoil plots installed at the lead and zinc mine in Rodna [17].

sequently spread on this rock to provide a 60—cm depth of “subsoil”, that was then covered with silt loam topsoil to 10—, 15— or 20—cm depth or left non-covered (i.e., no topsoil was added). Each of these four plots was installed in three replicates. Control plots on undisturbed silt loam were selected in a level pasture within 150 m of the experimental plots.

Before sowing of new pasture species, the existing herbage on the control plots was killed by spraying with glyphosate, and rotary-hoed 3 weeks later to a depth of 15 cm. All plots, including the control,

received limestone (6000 kg/ha) and KCl (250 kg/ha). Each of the experimental plots was divided into 3 subplots (6×2 m), to which superphosphate was added to raise available phosphate in 0—7.5 depth to Olsen P levels of 7, 13 and 20 ppm, respectively. The plots were then rotary-hoed to 7.5-cm depth and sown by hand in April 1989 with the following seed mixture (kg/ha), with the legume seeds being inoculated with appropriate rhizobia: *Lolium perenne* (20), *Lolium* × *hybridum hausslen* (8), *Dactylis glomerata* (5), *Trifolium repens* (4) and *Lotus pedunculatus* (3). Potassium (312 kg/ha, as KCl and K₂SO₄) was added periodically to all plots during the experiment; urea-N (91 kg/ha, in three split dressings) was included in the first year, to stimulate grass growth. Additional P (187 kg/ha, as superphosphate) was also added to the experimental plots only.

For enzymological and other studies, Ross *et al.* used the plots with no topsoil addition, those covered with 15-cm topsoil and the control plots. They took samples from the 0—7.5— and 7.5—15—cm depths of plots, in October 1989, March 1990, January 1991 and March 1992. Sampling was restricted to subplots with the highest phosphate level (20 ppm Olsen P in the 0—7.5-cm layer) to ensure minimal P limitation to plant growth.

The samples were analysed for determining invertase activity, a series of other biochemical properties: basal and substrate-included respiration (CO₂ evolution from unamended and glucose-amended samples), microbial C and N contents, aerobic and anaerobic N mineralisation, nitrification as well as some chemical and physical properties (total C and N contents, pH, moisture content). Dry matter yields and botanical composition of herbage were also recorded.

Invertase activity in both 0—7.5- and 7.5—15-cm layers in each year was higher in the topsoil than in the no-topsoil treatment but never reached the values registered in the control plots. The activity increased significantly during the experiment only at the 0—7.5-cm depth, the increase being higher in the topsoiled plots than in those not covered with topsoil. The other biochemical properties were also higher in the 0—7.5 than in the 7.5—15-cm layer. Herbage dry matter annual yields in the last two years presented, in the experimental and control plots, the following order: no topsoil < 15-cm topsoil < control.

The enzymological and other biochemical data were consistent with the conclusion drawn from physical, chemical and agronomic data that for rehabilitation of the studied mining site the wastes should be covered with an at least 15-cm-thick topsoil layer.

Technogenic soils from phosphorite mine wastes

Baeva *et al.* [1] have studied the spoils that resulted from the opencast phosphorite mining at the "Fosforit" Enterprise in Kingisepp, located in the western part of the Sankt-Petersburg region, Russia. For enzymological analyses, the southern, central and northern zones

around a quarry were selected. They were 2—3—, 5—6— and 10—12-year-old spoil areas, respectively.

The raw spoils consisted of loose, mostly silty and sandy materials in mixture with lime and dolomite lumps; they were rich in mobile phosphorus and their reaction was neutral or slightly alkaline. After levelling, they were covered in bands with peat and planted to forest species (spruces, larches, pines). Later, other tree species (birch, alder, aspen, willow) and a herbaceous cover (common coltsfoot, fireweed, clover, sweetclover, etc.) also developed.

On the 2—3-year-old spoil area, the vegetation was formed of the planted forest species and willows; the herbaceous cover was lacking. On the older spoil areas, more tree species developed. The herbaceous cover was 30—40% on the 5—6-year-old area and 100% on the 10—12-year-old one. On the latter area, the spruce and larch trees reached 2—3 m in height.

The enzymological analyses have shown that urease activity was lacking in the 2—3- and 5—6-year-old spoils, but traces of the activity were detectable in the 10—12-year-old ones. Invertase activity (expressed in mg of "glucose" produced by 1 g of spoil in 24 hours) increased with the age of the three spoil areas, having values of 3.14, 3.62 and 5.20, respectively. However, these values were lower than those recorded in soddy-podzolic soils not affected by phosphorite mining and processing. Dehydrogenase activity, which also increased with the age of spoils, gave higher values in spoil samples collected in summer than in the spring samples.

Cellulose decomposition, nitrate accumulation, respiration (CO_2 evolution), counts of bacteria, actinomycetes and fungi and humus accumulation also manifested an increasing trend during aging of spoils.

Technogenic soils on exhausted gravel quarries

Petrov *et al.* [18] have conducted recultivation experiments on the exhausted gravel quarry located in a large plain in the vicinity of the city of Vilnius, Lithuania and have described the results obtained in the 1986—1991 period.

The soils covering the exhausted quarry belong to 3 groups: I — 35—40-cm layer from B1 horizon; II — 20—25-cm layer from B1 horizon covered with a 15—20-cm-thick mixture of arable layer, A2B and B1 horizons; III — 20—25 cm of mixed horizons from beneath the arable layer, the mixture being covered with a 15-cm arable layer. The soils of all groups are of sandy loam texture.

In 1986, the physicochemical analyses showed that the pH was slightly alkaline (7.1—7.9) in soils of group I, nearly neutral (6.8—7.4) in soils of group II and slightly acid (5.9—6.6) in soils of group III. Humus content in soils of the three groups varied between 0.41 and 1.42%, total N content between 0.032 and 0.107%, P and K contents between 13.3 and 33.9 mg $\text{P}_2\text{O}_5/100$ g and 4.8 and 21.7 mg $\text{K}_2\text{O}/100$ g, respectively.

In the spring of 1987, a part of the experimental plots of each soil group were seeded with a perennial *legume*-grass mixture (alfalfa 50%, birdsfoot trefoil 15%, Hungarian sainfoin 15% plus grass species). The other part of plots received a perennial *grass*-legume mixture (red fescue 20%, birdsfoot trefoil 20%, Hungarian sainfoin 20% plus other species). Before sowing of the *legume*-grass mixture, the plots were fertilised with NH_4NO_3 (30 kg N/ha). Before sowing of the *grass*-legume mixture, the plots also received 30 kg N/ha, but they were fertilised again, after the first and second harvests, with NH_4NO_3 at a rate of 45 kg N/ha. Before sowing of both seed mixtures, the plots were fertilised with mineral P (90 kg/ha) and K (120 kg/ha) and some of them received organic fertilisers, too, namely farmyard manure or calcareous sapropel (120 t/ha). The control plots were not treated with fertilisers. Each fertilisation variant was carried out in 4 repetitions, on 24-m² plots.

It was found that the two seed mixtures were equally efficient, in term of herbage dry matter yields, whose mean values for the 1987—1991 period being 2.9, 4.7 and 4.1 t/ha/year on soils of groups I, II and III, respectively. In the same period, the highest dry matter yield was recorded in farmyard-manured plots on soils of group II (5.6 t/ha/year). The root biomass dry matter reached 12.9—49.6 t/ha.

Both mineral and organic fertilisation had beneficial effects on physicochemical and biological properties of soils, especially in their 0—10-cm layer. The pH in slightly alkaline and nearly neutral soils changed to a little extent, whereas in the slightly acid soils it increased up to 6.8—7.1. Humus accumulation in the farmyard-manured plots increased 2.3—3 times (in soils of group I), 1.9—2.6 times (in soils of group II) and 1.5 times (in soils of group III); the corresponding increases in the sapropel-treated soils of groups I—III were 2-, 1.7- and 1.2-fold, respectively. Total N content increased to a large extent. Increases occurred in the P and K contents, too. Invertase and protease activities and N_2 -fixation capacity measured in 1991 were nearly the same in the unfertilised control plots and in those fertilised with farmyard manure or sapropel, but in the previous 4-year period (1987—1990) biological activity showed 25—32-fold increases in the control plots and only 3.0—3.8-fold increases in the organically fertilised plots.

The investigations also showed that for agricultural recultivation covering of exhausted gravel quarries with topsoil or subsoil-topsoil mixture is obligatory.

Recultivation of soils remaining after topsoil "mining"

The enzymological researches dealing with this topic in New Zealand and summarised in [10, pp. 73—74] were also cited in details by Smith and Paul [32].

* *
*

The investigations described by Rowell and Florence [22] could not be included in any separate chapter of [10] and of our present review, due to the fact that the industrial disturbance of the investigated soils was of different nature (being caused by surface mining of coal, heavy oil extraction, pipeline construction, oil well drilling and hydrocarbon contamination), but the results were evaluated together, irrespective of the cause of disturbance.

Industrially-disturbed Canadian soils, taken as a whole, were compared with undisturbed soils from similar areas. Biological and conventional soil assay methods were used to determine their usefulness in reclamation management. Five soil groups were studied comprising the following soil types according to the Canadian and FAO systems of classification: group 1 — Black Chernozem (chernozem, rendzina); group 2 — Dark Brown Chernozem (kastanozem, typic); group 3 — Brown Chernozem (kastanozem, aridic); group 4 — Gray Brown Luvisol (albic luvisol) and Gray Luvisol (albic luvisol, podzoluvisol); group 5 — Eutric Brunisol (eutric cambisol) and Dystric Brunisol (dystric cambisol).

Disturbed and undisturbed surface soils were collected between September and November 1989 from south and central Alberta (63 in total). Description of the samples is given in Table 2.

The biological methods used served for measuring enzyme activities (dehydrogenase, invertase, protease, arginine deaminase, alkaline phosphatase and arylsulphatase), microbial biomass C and basal respiration rate, extractable organic C content and extractable colour index (an index of humification), mineralisation and nitrification potentials.

The conventional (chemical and physical) methods included measurement of pH, electrical conductivity, organic C content, cation-exchange capacity, mineral N (ammonium-N and nitrate-N), soluble sulphate-S and available phosphate-P contents, saturation percentage and particle size distribution (sand and clay contents).

The biological and conventional data sets were submitted to complex statistical analysis.

With the exception of pH ($\log H^+$ concentration), data for the 12 biological and the 11 conventional measurements were transformed to common, base 10 logarithms prior to analysis of variance and multivariate discriminant analysis.

Analysis of variance showed that means of four characteristics were statistically different between disturbed and undisturbed soils; electrical conductivity and soluble sulphate-S content were higher in disturbed soils while dehydrogenase and arylsulphatase activities were lower (Fig. 3).

Multivariate discriminant analysis, where the grouping was done between disturbed and undisturbed soils, revealed that correct classification of soil samples was higher (70% for disturbed soils and 86% for undisturbed soils) when the biological and conventional data sets

Table 2

Distribution of samples by soil groups and nature of disturbance [22]

Sample locations and nature of reclamation practices	Number of samples in each group						
	Soil groups						
	1	2	3	4	5	D*	UD*
<i>Samples from surface mining areas</i>							
Paintearth coal mine: reclamation since 1983 has involved topsoiling, fertilisation and seeding to grain, forage and pasture crops. Undisturbed soils were from areas adjacent to the mine.	--	8	--	--	--	6	2
Diplomat coal mine: reclamation since 1950s has involved a variety of methods including ridging, levelling, topsoiling, fertilisation and seeding to grain, forage or rangeland crops. Undisturbed soils were from areas adjacent to the mining area.	--	11	--	--	--	8	3
<i>Samples from heavy oil extraction areas</i>							
Disturbed samples represented operational and experimental soil mixes by Suncor Inc. since 1971 for erosion control on sand-covered tailings pond dikes. Reclamation included amendment with peat, mineral overburden, bitumen sludge and fertilisers and revegetation with trees, grasses and legumes. Undisturbed soils were taken from forested areas close to the mine.	--	--	--	--	11	9	2
<i>Samples taken following pipeline construction</i>							
Reclamation involved topsoil salvage and replacement and revegetation to the previous land use. Undisturbed samples were taken from areas adjacent to the pipeline.	2	2	2	--	--	3	3
<i>Samples from abandoned oil well drilling sites</i>							
Reclamation involved salvage of topsoil, replacement of topsoil, fertilisation and revegetation to the previous land use once the drilling operations were concluded.	2	4	4	--	--	5	5
<i>Samples involving hydrocarbon contamination</i>							
An oil spill rehabilitation experiment started in 1973 at the University of Alberta Experimental Farm. Reclamation involved tillage, fertilisation and revegetation with grain crops.	4	--	--	--	--	3	1
An experimental site set up in 1987 to study the disposal of diesel invert cuttings from oil well drilling by landfarming. Reclamation involved tillage, addition of mineral fertilisers and manure and reseeded with grasses and legumes.	--	--	--	4	--	3	1
<i>Representative soils not affected by industrial disturbance</i>							
Arable soils producing grains and forages.	3	2	2	4	--	--	11
Soils from native range and pasture.	--	--	2	--	--	--	2
Forested soils.	--	--	--	--	1	--	1

* D -- Disturbed, UD -- Undisturbed.

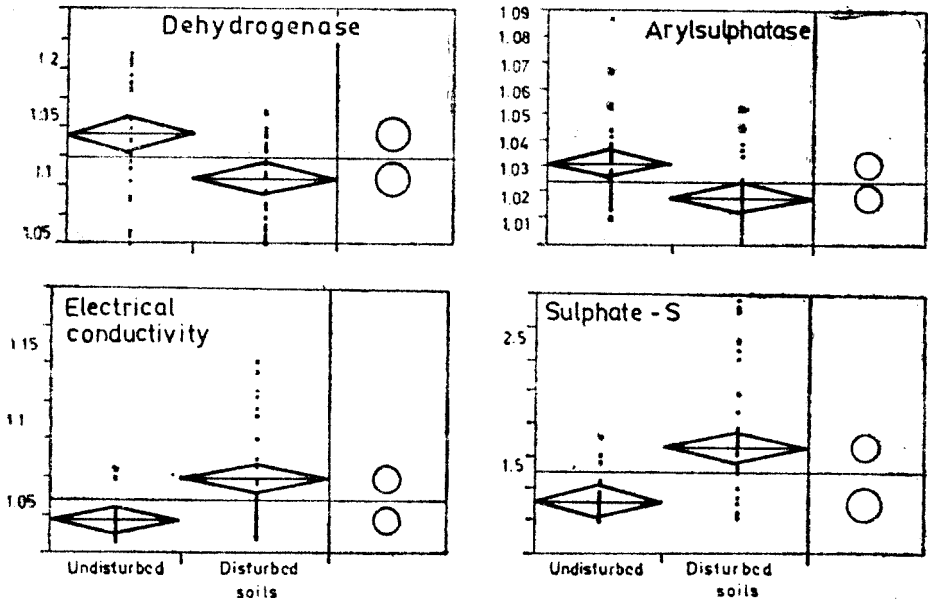


Fig. 3. Analysis of variance summaries and comparisons of means (vertical axis, \log_{10}) between disturbed and undisturbed soils [22].

The horizontal rule is the overall mean response; soil order means are the lines across and inside each diamond, height of the diamond is the 95% confidence interval of the mean and the diamond width represents the proportional difference in sample size. Circles which are non-intersecting indicate mean differences of $P < 0.05$ between disturbed and undisturbed soils.

were combined, than when the biological and conventional data sets were considered separately (68 and 76%, and 64 and 91%, respectively).

The conclusion was drawn that combination of biological and conventional measurements may provide a practical degree of assurance when determining the extent to which industrially-disturbed sites may have responded to remediation. This conclusion is acceptable by all experts in recultivation of technogenic soils. But usefulness of a combined study of soils suffering from industrial disturbances of very different nature (surface mining of coal, heavy oil extraction, pipeline construction, oil well drilling, hydrocarbon contamination) is questionable. Even Rowell and Florence mention: "More valuable information often comes from direct comparisons of disturbed and undisturbed soils at the same site".

Conclusions

The investigations reviewed in this paper confirm the conclusions drawn in [10, p. 79], according to which application of enzymological

methods makes it possible to indicate the degree of evolution of technogenic soils, the transformation of overburdens and other spoils into agricultural and forest soils, the efficiency of the recultivation measures applied.

REFERENCES

1. Baeva, R. I., Gagarina, E. I., Gorbovskaya, A. D., Dvornikova, L. L., Vinogradova, E. N., Popov, A. I., *Narushenie prirodnykh ekosistem v ruone dobychi fosforitov*, „Pochvovedenie“, No. 5, 1992, 86—102.
2. Bender, J., *Biologicheskaya rekultivatsiya v Pol'she*, in Kurachev, V. M. (Red.), *Ekologiya i Rekultivatsiya Tekhnogennykh Landshaftov*, pp. 261—283. Nauka, Sib. Otd., Novosibirsk, 1992.
3. Edgerton, D. L., Harris, J. A., Birch, P., Bullock, P., *Linear relationship between aggregate stability and microbial biomass in three restored soils*, „Soil Biol. Biochem.“, 27, 1995, 1499—1501.
4. Germanova, N. I., Antipina, G. S., Fedorets, N. G., *Mikrobiologicheskie aspekty rekultivatsii zheleznykh otvalov Kostomukshskogo mestorozhdeniya*, „Ekologiya“, 26, 1995, 103—109.
5. Gil-Sotres, F., Leirós, M. C., Trasar-Cepeda, M. C., Saá, A., González-Sangregorio, M. V., *The importance of soil biochemical properties in the reclamation of lignite mining land*, in Ceccanti, B., García, C. (Eds.), *Environmental Biochemistry in Practice, Vol. 1 — Wastes and Soil Management* (1994), pp. 131—170, Ist. Chim. Terreno, Pisa, 1995.
6. Gil-Sotres, F., Leirós de la Peña, M. C., Trasar-Cepeda, M. C., Benito-Rueda, E., *Modificación del riesgo de contaminación en los estériles recuperados*, in Guitián-Ojea, F. (Ed.), *Recuperación de las Escombreras de la Mina de Lignitos de Meirama (A Coruña)*, pp. 185—211. Univ. Santiago de Compostela, 1995.
7. Harris, J. A., *The biology of soils in urban areas*, in Bullock, P., Gregory, P. J. (Eds.), *Soils in the Urban Environment*, pp. 139—152. Blackwell, Oxford, 1991.
8. Harris, J. A., Hill, T. C. J., *Soil biotic communities and new woodland*, in Ferris-Kaan, R. (Ed.), *The Ecology of Woodland Creation*, pp. 91—112, Wiley, Chichester, 1995.
9. Kiss, S., Drăgan-Bularda, M., Pașca, D., *Enzymology of the recultivation of technogenic soils*, „Adv. Agron.“, 42, 1989, 229—278.
10. Kiss, S., Drăgan-Bularda, M., Pașca, D., *Enzymology of Technogenic Soils*, Casa Cărții de Știință, Cluj, 1993.
11. Kiss, S., Pașca, D., Drăgan-Bularda, M., Crișan, R., Muntean, V., *Enzymological evaluation of the efficiency of the measures applied for biological recultivation of lead and zinc mine spoils*, „Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Biol.“, 37 (2), 1992, 103—107.
12. Kiss, S., Pașca, D., Drăgan-Bularda, M., Crișan, R., Muntean, V., *Evaluarea enzimologică a eficienței biotehnologiei de recultivare a haldei de steril de la o mină de plumb și zinc*, „Proc. 8th Natl. Symp. Ind. Microbiol. Biotechnol. (Bucharest, 1994)“, 1994, 357—363.
13. Klevenskaya, I. L., *Mikrobo-rastitel'nye assotsiatsii tekhnogennykh ekosistem*, „Tez. Dokl. 8 Vses. S'ezda Pochvov. (Novosibirsk, 1989)“, 6, 1989, 122—128.
14. Klevenskaya, I. L., *Evolutsiya mikrobotensozov i ikh funktsii*, in Kurachev, V. M. (Red.), *Ekologiya i Rekultivatsiya Tekhnogennykh Landshaftov*, pp. 149—193, Nauka, Sib. Otd., Novosibirsk, 1992.

15. Leirós de la Peña, M. C., Varela-Martínez, G., Gil-Sotres, F., Frasar-Cepeda, M. C., Seoane-Labandeira, S., *Los suelos de la mina*, in Guitián-Ojea, F. (Ed.), *Recuperación de las Escombreras de la Mina de Lignitos de Meirama (A Coruña)*, pp. 125—157, Univ. Santiago de Compostela, 1995.
16. Naprasnikova, E. V., *Biokhimicheskie i mikrobiologicheskie pokazateli ekologicheskikh funktsii pochvy*, in *Pochvy i Povyshenie Ikh Proizvoditel'noi Sposobnosti*, pp. 57—60, Krasnoyarsk, Nauchno-Issled. Inst. Sel'sk. Khoz., Novosibirsk, 1993.
17. Pașca, D., Kiss, S., Drăgan-Bularda, M., Crișan, R., Muntean, V., *Evolution of the enzymatic potential in lead and zinc mine spoils submitted to biological recultivation*, „Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Biol.“, 39 (1), 1994, 95—101.
18. Petrov, M. Yu., Vasilyauskene, V. A., Shleinis, R. I., *Napravlenost' elementarnykh pochvoobrazovatel'nykh protsessov pri sel'skokhozyaystvennoi rekul'tivatsii graviynykh kar'erov*, „Pochvovedenie“, No. 1, 1994, 140—144.
19. Popovici, I., *The use of soil nematodes to assess the quality of technogenic soil rehabilitation*, „Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Biol.“, 38 (1—2), 1993, 43—53.
20. Popovici, I., Pașca, D., Kiss, S., Crișan, R., Muntean, V., Drăgan-Bularda, M., *Enzymatic potential and nematodes as indicators of the bioremediation efficiency of technogenic soils*, „Abstr., 7th Eur. Ecol. Congr. (Budapest, 1995)“, 1995, 104.
21. Ross, D. J., McQueen, D. J., Kettles, H. A., *Land rehabilitation under pasture on volcanic parent materials: changes in soil microbial biomass and C and N metabolism*, „Austral. J. Soil Res.“, 32, 1994, 1321—1337.
22. Howell, M. J., Florence, L. Z., *Characteristics associated with differences between undisturbed and industrially-disturbed soils*, „Soil Biol. Biochem.“, 25, 1993, 1499—1511.
23. Saá, A., García, C., Cives, J., Gil-Sotres, F., Trasar-Cepeda, C., Leirós, C., Ceccanti, B., *Biochemical properties, development and humification in minesoils amended with cattle slurry*, „Trans. 15th World Congr. Soil Sci. (Acapulco, 1994)“, 3a, 1994, 210—220.
24. Schneider, R., Schneider, H., Schröder, D., *Beziehung zwischen Bodenorganismen und Gefügeentwicklung auf Löss-Neuland unter Acker- und Waldnutzung*, „Z. Pflanzenern. Bodenkd.“, 158, 1995, 197—204.
25. Schumacher, B., Kutsch, H., Schröder, D., *Huminstoffsysteme in Rekultivierungsböden des Rheinischen Braunkohlereviere bei Erstnutzung als Acker, Grünland oder Wald*, „Mitt. Dtsch. Bodenkd. Ges.“, 71, 1993, 209—212.
26. Seoane-Labandeira, S., Benito-Rueda, E., Leirós de la Peña, M. C., Gil-Sotres, F., Guitián-Ojea, F., *Los materiales estériles de la mina*, in Guitián-Ojea, F. (Ed.), *Recuperación de la Escombreras de la Mina de Lignitos de Meirama (A Coruña)*, pp. 69—96, Univ. Santiago de Compostela, 1995.
27. Shirokikh, A. A., Shirokikh, I. G., *Pochvenno-mikrobiologicheskie issledovaniya osushennykh torfyanikov*, in Vertogradskaya, I. A. (Red.), *Na Torfyannykh Pochvakh*, Chast' 1, pp. 16—20, Lugobolotn. Opytn. Stants., Kirov, formerly Vyatka, 1993.
28. Shirokikh, I. G., *Aktinomitsety kak komponent bioty lesnoi podstliki*, in Vertogradskaya, I. A. (Red.), *Na Torfyannykh Pochvakh*, Chast' 1, pp. 79—81, Lugobolotn. Opytn. Stants., Kirov, formerly Vyatka, 1993.
29. Šiřa, R., *Výzkum změn biologické aktivity půd v procesu rekultivaci v SHR Most*, I, pp. 1—32; II, pp. 1—24, Vys. Šk. Zeměd., Praha, 1985; 1988.
30. Šiřa, R., *Enzymová aktivita půdy jako ukazatel její biologické aktivity*, „Rostl. Výroba“, 39, 1993, 817—825.
31. Šiřa, R., Belatková, P., *Effect of recultivation on enzymatic activity and respiration of soil*, Poster, 10th Int. Symp. Humus et Planta, Praha, 1991.
32. Smith, J. L., Paul, E. A., *The significance of soil microbial biomass estimations*, in Bollag, J.-M., Stotzky, G. (Eds.), *Soil Biochemistry*, Vol. 6, pp. 357—396, Dekker, New York, 1990.

33. Starodumova, E. V., Shirokikh, I. G., *Effektivnost' mineral'nykh udobrenij na mnogoletnykh zlakovykh travostoyakh vyrabotannogo nizinnogo torfyanika*, in Vertogradskaya, I. A. (Red.), *Na Torfyanykh Pochvakh*, Chast' 1, pp. 21—25, Lugobolotn. Opytn. Stants., Kirov, formerly Vyatka, 1993.
34. Sutton, P., Dick, W. A., *Reclamation of acidic mined lands in humid areas*, „Adv. Agron.“, **41**, 1987, 377—405.
35. Trasar-Cepeda, M. C., De Blas, E., Garcia-Rodeja, I., Leirós, M. C., Gil-Sotres, F., *Modifications of the phosphorus cycle with development of lignite mine soils*, „Land Degrad. Rehabil.“, **4**, 1993, 131—142.
36. Zaitsev, G. A., Motorina, L. V., Dan'ko, V. N., *Lesnaya Rekul'tivatsiya*, Len. Promyshlennost', Moskva, 1977.

COMPOZIȚIA ȘI STRUCTURA COMUNITĂȚILOR ALGALE DIN RĂUL SOMEȘUL CALD, TRANSILVANIA, ROMÂNIA

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

SUMMARY. — *Composition and Structure of Algal Communities in the Someșul Cald River, Transylvania, Romania.* Species composition and algal community organisation were studied in eight sampling sites located along the river course, from headwaters to its confluence with Someșul Rece, including the dam reservoirs. The pattern of frequency distribution has been described by employing the model of truncated normal curve. Differences at the level of algal communities have been tested by cluster analysis using the floristic similarity index of Soerensen. Species diversity and relative information were also computed according to Shannon's index. Diatoms were found to be the main algal group with regard to the number of taxa and population density as well. In the upper course of the river the algal communities are less altered, mostly consisting of rheophilous, crenophilous and crenobiotic diatoms. Downstream, the structural pattern of communities is markedly changed. They are dominated by and contain mainly large populations of eurytopic and cosmopolite algae, and exhibit a higher species diversity. The dam reservoirs are inhabited by planktonic and benthic communities, which are characteristic for lakes.

În cadrul cercetărilor inițiate în anii precedenți asupra organizării comunităților algale din apele curgătoare ale Transilvaniei, până în prezentat au fost publicate rezultatele privitoare la diatomele din Someșul Rece [7, 8]. Lucrarea de față se referă la structura calitativă și cantitativă relativă a comunităților algale din Someșul Cald.

Descrierea fizico-geografică a râului [1]. Subbazinul Someșului Cald, parte componentă a bazinului Someșului Mic, localizat în regiunile înalte, montane, ale acestuia, are o suprafață de 530 km² și o înclinație medie a pantei de 259 m/km. Izvoarele sale se află în Masivul Central al Bihorului, pe versantul estic al culmii Piatra Arsă — 1.550 m. Acest masiv al Munților Apuseni este constituit din sisturi cristaline acoperite cu sedimente paleozoice și mezozoice, cu frecvente intercalații de calcare jurasice și triasice, care au favorizat dezvoltarea a numeroase fenomene carstice (peșteri, doline, ponoare și chei—defilee), ce excelează în regiunea de izvoare a Someșului Cald. Someșul Rece, Someșul Cald și alte pârâuri ferestruiesc puternic cristalinelul cu intrusiuni granitice al Munților Gilăului, formând văi înguste și adânci, dintre care se individualizează defileul Someșului Cald, tăiat în granite pe o distanță de peste 25 km.

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

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

Astfel, subbazinul Someşului Cald aparţine, prin izvoarele sale, raionului calcarelor şi depozitelor calcaroase, cât şi celui al şisturilor cristaline prin restul cursului său, iar apele râului fac parte din clasa celor bicarbonatate din grupa calciului la izvoare, şi din grupa sodiului în rest, cu mineralizare foarte redusă (sub 100 mg/l).

Din punct de vedere climatic subbazinul Someşului Cald se încadrează în sectorul cu climă continental moderată, caracteristic regiunilor vestice şi nord-vestice ale ţării noastre. În tot cursul anului, şi mai ales în sezonul cald, umiditatea aerului este ridicată şi precipitaţiile sunt abundente (125—400 mm), astfel că alimentarea cu apă a râului este de tip pluvio-nival. Debitul mediu multianual (1940—1964) era de 7,86 m³/s, la Beliş.

Material şi metode. Probele algologice, reprezentând comunităţi bentonice, au fost colectate în luna mai 1994, din cinci staţiuni de pe Someşul Cald (vezi Tabelul 1). Din lacurile de acumulare de pe cursul râului s-au prelevat probe de plancton, respectiv plancton, bentos şi epifiton din Lacul Gilău. Ele au fost conservate în formol 4%, iar în laborator, pentru efectuarea preparatelor diatologice, eşantioane ale probelor au fost tratate la rece cu HNO₃ conc., apoi spălate şi montate în colofoniu.

În vederea identificării speciilor componente, preparatele au fost examinate microscopic, pentru diatomee folosindu-se obiectivul de imersie (Planchromat HI 100x/1,3) şi stabilindu-se astfel compoziţia comunităţilor algale.

Evaluarea cantitativă relativă la nivel de specie s-a realizat fie prin calcularea probabilităţii de apariţie, cu ajutorul formulei $P=n:N$, în care n =număr de indivizi identificabili ai unei specii, iar N =număr total de indivizi număraţi per preparat, fie prin exprimarea procentuală a abundenţei. În acest caz s-au efectuat numărători de celule în câte 20 de câmpuri microscopice (ob. 100x)/preparat.

Pentru descrierea structurii comunităţilor s-a folosit modelul curbei normale trunchiate, elaborat de către Patrick şi colab. [5] pentru diatomeele de apă curgătoare. Datele brute necesare calculării şi trasării acesteia (realizate cu ajutorul unui program PC) s-au obţinut prin numărarea a 8.000—10.000 frustule/probă.

Afinitatea floristică a comunităţilor din staţiunile cercetate s-a testat cu ajutorul indicelui de similaritate Soerensen, obţinându-se cladograma de grupare a speciilor, după modelul lui Mountford [4].

Stabilitatea cenotică a comunităţilor s-a apreciat conform funcţiei Shannon [6] în care informaţia relativă (*sensu* Căncelă da Fonseca [2, 3]), ca măsură a stabilităţii cenotice, este raportul dintre diversitatea specifică (reală) şi cea maximă (entropie).

Rezultate şi discuţii. În total au fost identificate 186 specii de alge, aparţinând la următoarele grupe sistematice: *Cyanophyta* (9 specii), *Chrysophyta* (6 specii), *Bacillariophyta* (162 specii), *Chlorophyta* (7 specii), *Dinophyta* (2 specii). În comunităţile de râu au fost identificate 122 specii algale (115 de diatomee), iar în cele lacustre s-au găsit 143 specii (125 de diatomee). Speciile algale identificate în aceste tipuri de comunităţi de pe Someşul Cald sunt redată în Tabelele 1 şi 2, cifrele reprezentând probabilitatea de apariţie, dacă a fost posibilă calcularea, iar semnul „plus“ indică simpla prezenţă. Speciile dominante (D) şi codominante (CD) din comunităţile lacurilor de acumulare sunt, de asemenea, figurate în Tabelul 2.

Tabel 1

Compoziția și probabilitatea de apariție a speciilor în cadrul comunităților algale de pe Someșul Cald

Nr. crt.	Taxoni	Puncte de colectare				
		Pârâul Roșu	Valea Izbucului	Valea Ponorului	Valea Călinesei	La uzina electrică
0	1	2	3	4	5	6
CYANOPHYTA						
1.	<i>Oscillatoria boryana</i>	--	--	+	--	--
2.	<i>O. deflexoides</i>	--	+	--	+	--
3.	<i>O. simplicissima</i>	--	--	--	--	+
4.	<i>Phormidium uncinatum</i>	--	--	--	+	--
CHRYSOPHYTA						
1.	<i>Hydrurus phoetidis</i>	--	--	+	--	--
BACILLARIOPHYTA						
1.	<i>Melosira cf. distans</i>	--	--	--	--	0,0002
2.	<i>M. cf. italica</i>	--	--	--	--	0,0030
3.	<i>M. cf. varians</i>	--	--	--	--	0,0076
4.	<i>Cyclotella meneghiniana</i>	--	--	--	--	+
5.	<i>Tabellaria floeculosa</i>	--	0,0128	+	--	0,0003
6.	<i>Meridion circulare</i>	0,0189	0,0385	--	0,0927	0,0048
7.	<i>Diatoma hiemale</i>	0,7325	0,0128	0,0663	0,1197	0,0065
8.	<i>D. mesodon</i>	0,1046	0,0705	0,2265	--	0,0055
9.	<i>D. vulgare</i>	0,0435	+	--	0,0077	0,0024
10.	<i>Fragilaria capucina</i>	--	--	--	--	0,0113
11.	<i>F. constricta</i>	--	--	--	--	--
12.	<i>F. construens</i>	--	--	--	+	0,0118
13.	<i>F. cf. inflata</i>	--	--	--	--	+
14.	<i>F. pinnata</i>	0,0013	+	+	0,0636	0,0044
15.	<i>F. virescens</i>	--	--	--	--	+
16.	<i>Hannaea arcus</i>	0,0001	--	0,2421	--	0,0115
17.	<i>Synedra parasitica</i> var. <i>subconstricta</i>	--	--	--	--	+
18.	<i>S. rumpens</i>	--	--	--	+	0,0090
19.	<i>S. ulna</i>	--	--	--	0,0039	0,0046
20.	<i>S. vaucheriae</i>	--	+	+	0,0232	0,0197
21.	<i>Asterionella formosa</i>	--	--	--	--	+
22.	<i>Eunotia exigua</i>	0,0007	+	--	--	--
23.	<i>E. pectinalis</i> var. <i>minor</i>	--	+	+	--	--
24.	<i>E. praerupta</i>	--	--	--	--	0,0001
25.	<i>E. sudetica</i>	--	--	+	--	--
	<i>E. sudetica</i> var. <i>bidens</i>	+	--	--	--	--
26.	<i>Cocconeis diminuta</i>	--	0,0256	--	+	0,0079
27.	<i>C. pediculus</i>	--	0,0128	--	+	0,0002
28.	<i>C. placentula</i> var. <i>lineata</i> et var. <i>euglypta</i>	0,0037	0,0705	0,0166	0,0039	0,0339
29.	<i>Achnanthes biasoletiana</i>	0,0185	0,0705	0,1160	0,0540	0,0328
30.	<i>A. conspicua</i>	--	--	--	+	0,0002
31.	<i>A. lanceolata</i>	0,0026	0,0449	0,0055	0,0347	0,0243
32.	<i>A. laterostrata</i>	--	--	--	--	0,0005
33.	<i>A. minutissima</i>	0,0153	0,1410	0,0166	0,1042	0,1079
34.	<i>A. peragalli</i>	--	--	--	--	+

Tabel 1 (continuare)

0	1	2	3	4	5	6
35. Rhoicosphaenia abbreviata	--	--	--	--	+	0,0860
36. Diploneis elliptica	--	--	--	--	--	0,0002
37. D. ovalis	--	--	+	--	+	0,0007
38. Frustulia vulgaris	--	--	--	--	--	0,0006
39. Stauroneis anceps	--	--	+	--	0,0039	0,0001
40. S. smithii	--	--	--	--	0,0039	--
41. Navicula accomoda	--	--	--	--	--	0,0001
42. N. angusta	--	--	--	--	+	--
43. N. capitata	--	--	--	--	--	0,0008
44. N. capitatoradiata	--	--	--	--	--	0,0172
45. N. cryptocephala	--	--	+	--	+	0,0091
46. N. cryptotenella	0,0131	0,2628	--	--	0,0116	0,0051
47. N. decussis	--	--	--	--	--	0,0007
48. N. elginensis	--	--	--	--	--	0,0004
49. N. gallica var. perpusilla	--	--	--	--	--	0,0007
50. N. gregaria	--	--	--	--	--	0,0511
51. N. lanceolata	0,0002	+	+	--	--	0,0126
52. N. lapidosa	--	0,0449	0,0055	+	+	0,0110
53. N. menisculus	--	0,0128	--	+	+	--
54. N. minima	--	+	--	--	+	0,0009
55. N. minuscula	--	+	--	--	--	--
56. N. cf. nivalis	--	--	--	--	+	--
57. N. pelliculosa	--	--	--	--	+	0,0079
58. N. pupula	--	--	+	+	0,0039	0,0005
59. N. radiosa	0,0003	+	+	--	--	0,0014
60. N. recens	--	--	--	--	--	0,0017
61. N. reinhardtii	--	0,0128	--	--	--	--
62. N. rhychocephala	--	--	--	--	--	0,0064
63. N. cf. striolata	--	+	--	--	--	--
64. N. subatomoides	0,0004	0,0064	--	--	+	0,0017
65. N. tripunctata	--	+	--	--	--	0,0005
66. N. trivialis	--	--	--	--	--	0,0004
67. N. viridula	--	--	--	--	--	0,0002
68. Pinnularia borealis	--	--	--	--	+	0,0001
69. P. interrupta	--	--	--	--	--	+
70. P. microstauron	0,0001	--	--	--	--	--
71. P. subcapitata	--	+	+	--	--	0,0004
72. P. viridis	0,0002	--	--	--	--	0,0003
73. Caloneis bacillum	0,0002	+	--	--	--	0,0004
74. C. branderjii	--	--	--	--	--	0,0001
75. C. silicula	--	+	--	--	--	0,0004
76. Gyrosigma spencerii	--	--	--	--	--	0,0002
77. Amphora lybica	--	+	--	--	--	--
78. A. ovalis	--	--	--	--	--	0,0001
79. A. pediculus	0,0003	0,0128	+	--	0,0154	0,0015
80. Cymbella affinis	0,0034	--	--	--	0,0193	--
81. C. amphicephala	--	+	--	--	--	--
82. C. aspera	--	+	--	--	--	--
83. C. cistula	--	--	--	--	--	0,0012
84. C. gracilis	--	+	--	--	--	0,0004
85. C. helvetica	--	--	--	--	--	0,0002
86. C. microcephala	--	--	--	--	+	--
87. C. minuta	0,0018	+	0,0663	0,3706	0,0826	--

Tabel 1 (continuare)

0	1	2	3	4	5	6
88. <i>C. naviculiformis</i>		--	+	--	--	0,0003
89. <i>C. silesiaca</i>		0,0238	0,0128	0,0166	0,0193	0,0254
90. <i>C. sinuata</i>		0,0006	0,0256	0,0110	+	0,0149
91. <i>Gomphonema angustatum</i>		0,0009	+	--	0,0039	0,0008
92. <i>G. clavatum</i>		--	+	--	0,0039	0,0001
93. <i>G. cf. clevei</i>		0,0101	0,0833	0,1934	0,0154	0,0079
94. <i>G. olivaceum</i>		--	--	0,0110	--	+
95. <i>G. parvulum</i>		0,0002	0,0128	--	+	0,0026
96. <i>G. tergestinum</i>		0,0003	+	--	--	0,0010
97. <i>G. truncatum</i>		--	--	--	+	0,0005
98. <i>Denticula tenius</i>		0,0007	0,0128	--	0,0077	--
99. <i>Hantzschia amphioxys</i>		--	+	--	--	--
100. <i>Nitzschia acicularis</i>		--	--	--	--	0,0027
101. <i>N. amphibia</i>		--	--	--	--	0,0002
102. <i>N. dissipata</i>		0,0008	+	--	+	0,0259
103. <i>N. fonticola</i>		--	--	--	--	0,0005
104. <i>N. frustulum</i>		--	+	+	0,0039	0,0225
105. <i>N. hantzschiaua</i>		--	--	--	--	0,0052
106. <i>N. homburgiensis</i>		--	--	--	--	0,0001
107. <i>N. inconspicua</i>		--	--	--	--	+
108. <i>N. linearis</i>		--	+	--	--	0,2528
109. <i>N. palea</i>		0,0002	+	--	+	0,0082
110. <i>N. pura</i>		--	--	0,0055	--	--
111. <i>N. pusilla</i>		--	--	--	0,0039	0,0017
112. <i>Surirella angusta</i>		--	--	--	0,0039	0,0015
113. <i>S. brebissonii</i>		--	--	--	--	0,0005
114. <i>S. ovalis</i>		--	--	--	+	0,0002
115. <i>S. splendida</i>		--	--	--	--	0,0004
CHLOROPHYTA						
1. <i>Closterium moniliferum</i>		+	--	--	--	--
2. <i>Netrium digitus</i>		--	+	--	--	--

Tabel 2

Compoziția diferitelor tipuri de comunități algale din lacurile de acumulare de pe Someșul Cald

Nr. crt.	Taxoni	Puncte de colectare				
		Lacul Fântănele plancton	Lacul Târnița plancton	Lacul Gilău		
				plancton	bentos	epifiton
0	1	2	3	4	5	6
CYANOPHYTA						
1.	<i>Chroococcus turgidus</i>	+	--	--	--	--
2.	<i>Merismopedia glauca</i>	+	--	--	--	--
3.	<i>Oscillatoria boryana</i>	--	--	+	--	--
4.	<i>O. lacustris</i>	--	--	+	--	--
5.	<i>O. limosa</i>	--	--	+	--	--
6.	<i>O. planctonica</i>	--	--	+	--	--

Tabel 2 (continuare)

0	1	2	3	4	5	6
CHRYSOPHYTA						
1. Uroglena volvox		+	+	+	-	-
2. Dinobryon divergens		+	+	+	-	-
3. Mallomonas acaroides		+	+	+	-	-
4. Synura spinosa		-	-	+	-	-
5. Chrysosphaerella brevispinosa		+	+	+	-	-
BACILLARIOPHYTA						
1. Melosira cf. varians		-	-	+	-	+
2. Cyclotella meneghiniana		-	-	+	-	+
3. Tabellaria fenestrata		-	-	-	-	+
4. T. flocculosa		-	+	+	+	+
5. Meridion circulare		-	-	-	+	+
6. Diatoma hiemale		-	+	-	+	+
7. D. vulgare		-	+	+	+	+
8. Fragilaria capucina		-	-	-	-	+
9. F. construens		-	-	+	+	+
10. F. crotonensis		-	+CD	+D	-	+CD
11. F. intermedia		-	-	-	+	+
12. F. leptostauron		-	-	-	-	+
13. F. pinnata		-	+	+	+	+
14. F. virescens		-	-	-	-	+
15. Hannaea arcus		-	+	+	+	+
16. Synedra capitata		-	-	+	+	+
17. S. delicatissima		-	-	+	+	+
18. S. rumpens		-	-	+	+	+
19. S. ulna		-	+	+	+	+
20. S. vaucheriae		-	+	+	+	+
21. Asterionella formosa		+D	+D	+CD	+	+
22. Eunotia curvata		-	-	+	-	-
23. Coccoeis placentula var. lineata		-	-	+	+	+
C. placentula var. euglypta		-	-	-	+	+
24. Achnanthes biasoletiana		-	-	+	+	+
25. A. clevei var. rostrata		-	-	-	-	+
26. A. lanceolata		-	+	+	+	+
27. A. laterostrata		-	-	-	-	+
28. A. minutissima		-	+	+	+	+D
29. Rhoicosphaenia abbreviata		-	-	-	+	+
30. Diploneis cf. parva		-	+	-	-	-
31. D. cf. puella		-	+	+	-	+
32. Frustulia vulgaris		-	-	+	+	-
33. Anomoeoneis vitrea		-	-	+	-	+
34. Stauroneis anceps		-	-	-	+	-
35. S. smithii		-	+	-	-	-
36. Navicula bacillum		-	-	+	-	-
37. N. capitata		-	+	+	+	+
38. N. capitatoradiata		-	-	+	+	-
39. N. cryptocephala		-	+	+	+	+
40. N. cryptotenella		-	-	-	+	+
41. N. decussis		-	-	-	+	+
42. N. elginensis		-	-	-	-	+
43. N. gregaria		-	-	-	+	+
44. N. hambergii		-	-	-	+	+
45. N. kraskei		-	-	-	+	-

Tabel 2 (continuare)

0	1	2	3	4	5	6
46. <i>N. lanceolata</i>	---	+	+	+	+	+
47. <i>N. lapidosa</i>	---	+	+	+	+	+
48. <i>N. menisculus</i>	---	---	---	+	+	+
49. <i>N. minima</i>	---	---	---	+	+	+
50. <i>N. minuscula</i>	---	---	---	---	+	+
51. <i>N. pelliculosa</i>	---	---	---	---	+	+
52. <i>N. pupula</i>	---	---	---	---	+	+
53. <i>N. pygmaea</i>	---	---	---	---	+CD	---
54. <i>N. radiosa</i>	---	+	+	+	+	---
55. <i>N. recens</i>	---	---	---	+	---	---
56. <i>N. rhyngocephala</i>	---	---	+	+	+	+
57. <i>N. subminuscula</i>	---	---	---	---	+	---
58. <i>N. cf. submolesta</i>	---	---	---	---	+	+
59. <i>N. subtilissima</i>	---	---	---	---	---	---
60. <i>N. tripunctata</i>	---	---	---	---	+	+
61. <i>N. trivialis</i>	---	---	---	+	---	---
62. <i>N. utermochlii</i>	---	---	---	---	---	+
63. <i>N. viridula</i> et var. <i>rostellata</i>	---	+	+	+	+	---
64. <i>N. vitabunda</i>	---	+	---	---	---	---
65. <i>Pinnularia borealis</i>	---	---	---	---	+	---
66. <i>P. cf. divergens</i>	---	---	+	---	---	---
67. <i>P. mesolepta</i>	---	---	---	---	---	---
68. <i>P. microstauron</i>	---	---	---	---	+	+
69. <i>P. subcapitata</i>	---	---	---	---	+	+
70. <i>P. viridis</i>	---	---	---	---	+	+
71. <i>Caloncis amphibaena</i>	---	---	---	---	+	---
72. <i>C. silicula</i>	---	---	---	---	+	---
73. <i>Gyrosigma nodiferum</i>	---	---	---	---	+	---
74. <i>G. scalpoides</i>	---	---	---	---	+	---
75. <i>G. spencerii</i>	---	---	+	+	+	+
76. <i>Amphora cf. inariensis</i>	---	---	---	+	---	+
77. <i>A. libyca</i>	---	---	+	+	+	+
78. <i>A. pediculus</i>	---	---	---	+	+	+
79. <i>Cymbella caespitosa</i>	---	---	---	+	---	+
80. <i>C. cistula</i>	---	---	---	+	+	+
81. <i>C. cuspidata</i>	---	---	+	---	+	---
82. <i>C. helvetica</i>	---	---	---	+	+	---
83. <i>C. lanceolata</i>	---	---	---	+	+	+
84. <i>C. microcephala</i>	---	---	---	---	+	+
85. <i>C. miuuta</i>	---	---	---	+	+	+
86. <i>C. prostrata</i>	---	---	+	---	---	---
87. <i>C. proxima</i>	---	---	---	---	---	+
88. <i>C. silesiaca</i>	---	---	+	+	+	+
89. <i>C. sinuata</i>	---	---	---	+	+	+
90. <i>C. cf. schimanskii</i>	---	---	---	+	+	---
91. <i>C. subaequalis</i>	---	---	+	---	---	---
92. <i>C. tumida</i>	---	---	---	---	+	---
93. <i>C. turgida</i>	---	---	---	---	+	---
94. <i>C. turgidula</i>	---	---	+	---	+	+
95. <i>Gomphonema acuminatum</i>	---	---	---	+	+	+
96. <i>G. angustatum</i>	---	---	---	+	---	---
97. <i>G. gracile</i>	---	---	---	---	---	+
98. <i>G. olivaceum</i> et var. <i>calcareum</i>	---	---	---	---	+	---

Tabel 2 (continuare)

0	1	2	3	4	5	6
99. <i>G. parvulum</i>	—	—	—	—	+	+
100. <i>G. tergestinum</i>	—	—	+	—	—	—
101. <i>G. truncatum</i>	—	—	—	+	+	+
102. <i>Denticula kuetzingii</i>	—	—	—	+	—	+
103. <i>D. tennis</i>	—	—	—	+	+	+
104. <i>Hantzschia amphioxys</i>	—	—	—	—	+	—
105. <i>Nitzschia amphibia</i>	—	—	—	—	+	—
106. <i>N. angustata</i>	—	—	—	—	—	+
107. <i>N. brevissima</i>	—	—	—	—	+	—
108. <i>N. dissipata</i>	—	—	—	+	+	+
109. <i>N. fonticola</i>	—	—	—	+	+	+
110. <i>N. frustulum</i>	—	—	—	—	+	+
111. <i>N. gracilis</i>	—	—	+	+	+	+
112. <i>N. hamburgiensis</i>	—	—	—	—	+	—
113. <i>N. linearis</i>	—	—	+	+	+	+
114. <i>N. palea</i>	—	—	—	—	+	+
115. <i>N. pusilla</i>	—	—	—	+	+CD	—
116. <i>N. pura</i>	—	—	—	—	+	—
117. <i>N. recta</i>	—	—	—	—	+	—
118. <i>N. sigmoidea</i> var. <i>minusecula</i>	—	—	—	—	+	—
119. <i>N. sublinearis</i>	—	—	—	—	+	—
120. <i>Cymatopleura solea</i>	—	—	—	—	+	—
121. <i>Surirella angusta</i>	—	—	—	—	+	+
122. <i>S. linearis</i>	—	—	—	—	—	+
123. <i>S. minuta</i>	—	—	—	—	+	—
124. <i>S. ovalis</i>	—	—	—	—	+	—
125. <i>S. splendida</i>	—	—	+	—	—	—
CHLOROPHYTA						
1. <i>Oocystis lacustris</i>	—	—	+	—	—	—
2. <i>O. planetonica</i>	—	—	+	—	—	—
3. <i>Pseudosphaerocystis lacustris</i>	+	—	+	+	—	—
4. <i>Eudorina elegans</i>	+	—	+	+	—	—
5. <i>Microspora willana</i>	—	—	—	+	—	—
DINOPHYTA						
1. <i>Peridinium willci</i>	—	+	+	—	—	—
2. <i>Ceratium hirundinella</i>	—	—	+	—	—	—

Din examinarea celor două tabele reiese, ca o primă constatare, dominarea netă a comunităților algale de către diatomee (*Bacillariophyta*), acestea constituind principala componentă (și cea mai statornică) a comunităților algale bentonice de apă curgătoare.

Comunitățile din zonele de izvoare ale Someșului Cald apar mai puține uniforme în ceea ce privește speciile dominante (Fig. 1 și 2), comparativ cu cele din Someșul Rece [7]. *Diatoma hiemale* și *D. mesodon* (*Bacillariophyta*), specii caracteristice pentru condițiile extreme ale apelor de munte, sunt dominante doar în comunitățile din Pârâul Roșu și Valea Ponorului (aici *D. mesodon* este codominantă față de *Hantzschia arcus*), deși ele apar, dar cu număr mai redus de indivizi, în toate punctele de colectare. *Navicula cryptotenella*, diatomee cu răs-

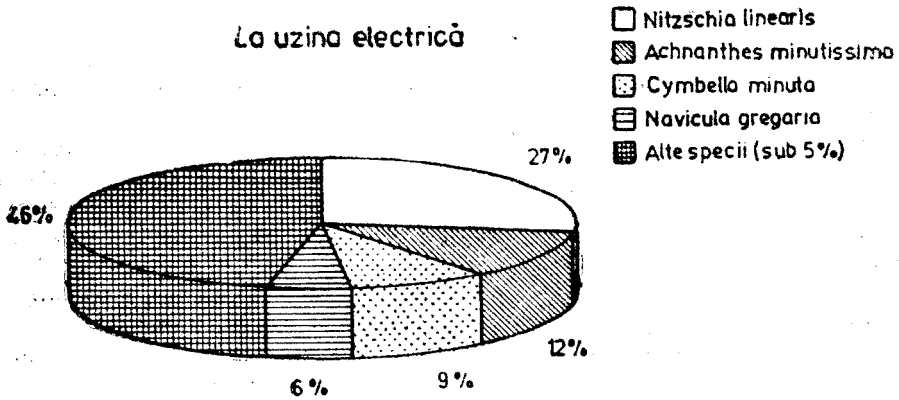
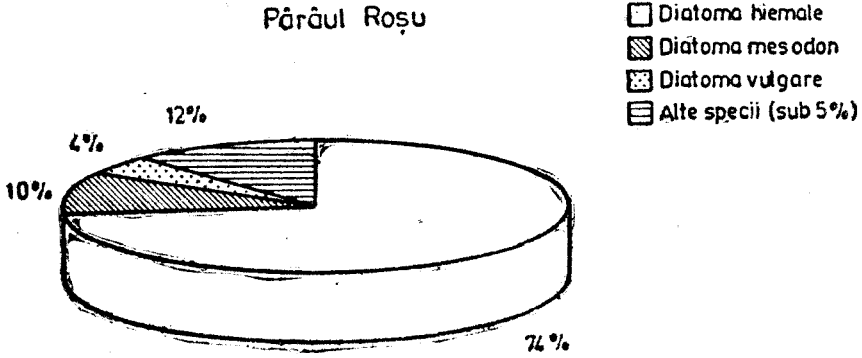
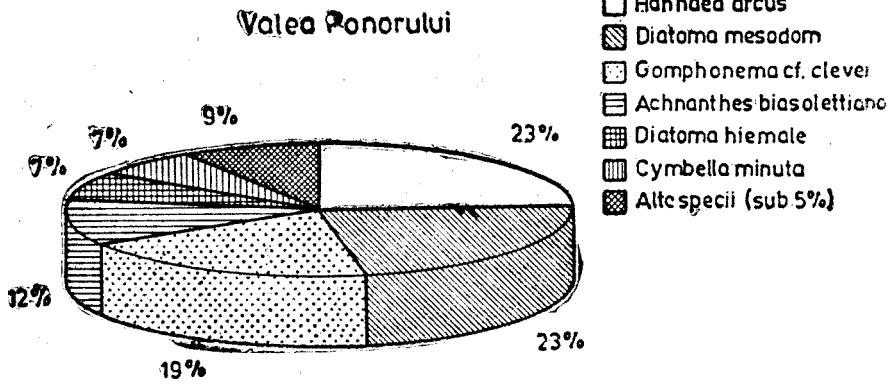


Fig. 1. Explicarea procentuală a dominanței/abundenței speciilor de diatomee din Valea Ponorului, Pârâul Roșu și de la uzina electrică.

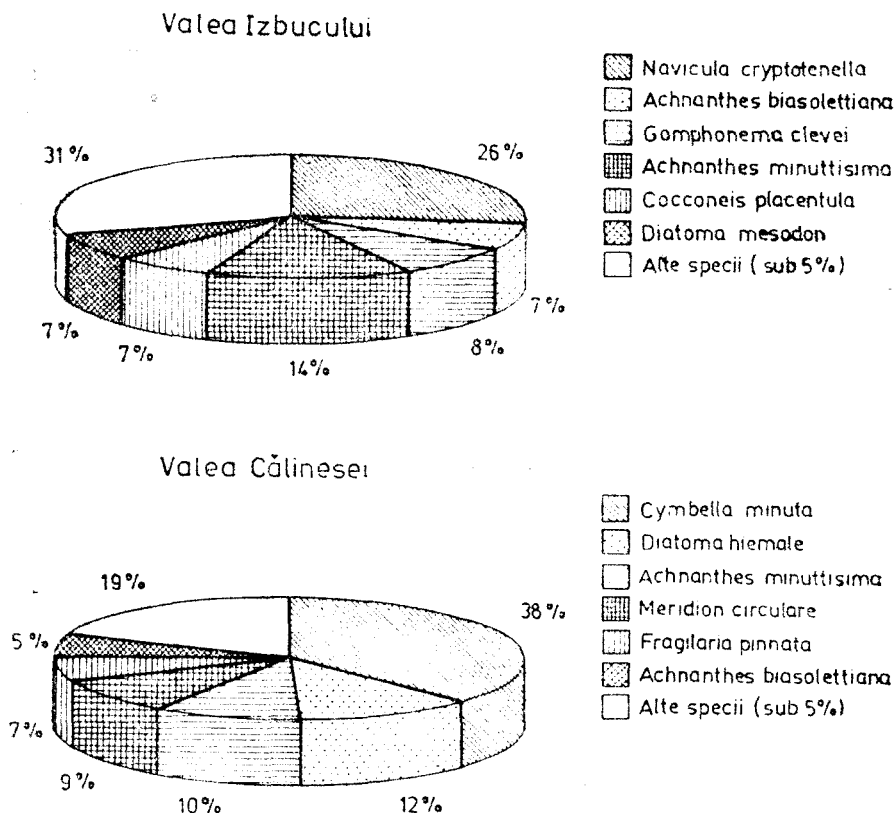


Fig. 2. Exprimarea procentuală a dominanței/abundenței speciilor de diatomee din Valea Izbucului și Valea Călinesei.

pândire largă în apele dulci, domină în comunitățile din Valea Izbucului; în Valea Călinesei cea mai abundentă specie este *Cymbella minuta* (*Bacillariophyta*), de asemenea cosmopolită și ubicvistă.

Existența calcarelor în regiunea de izvoare a Someșului Cald este semnalată la nivelul compoziției comunităților algale, prin prezența peste tot, cu abundență medie sau mare, a unor diatomee cu preferințe cunoscute pentru ape mai mult sau mai puțin calcaroase (*Achnanthes minutissima*, *Meridion circulare*, *Gomphonema clevei*).

Pe lângă speciile dominante comunitățile conțin și alte elemente cu răspândire largă în biotopurile dulcicole: *Oscillatoria boryana*, *O. deflexoides*, *Phormidium uncinatum* (*Cyanophyta*); *Achnanthes biasolettiana*, *Cymbella silesiaca*, *C. minuta*, *Diatoma vulgare*, *Cocconeis placentula* (*Bacillariophyta*). Dintre crizofite, *Hydrurus vaucherii*, specie microtermă (preferând apele curate și reci) apare, uneori în masă, sub formă de „smocuri“ fixate pe pietrele de pe fundul albiei.

În sfârșit, comunitățile microfitebentonice ale acestor zone adăpostesc un număr variabil de specii întâmplătoare, cenoxene, totdeauna cu prezență sporadică: specii caracteristice sau comune și pentru mediile aeriene mai mult sau mai puțin umezite din imediata apropiere a aibiei (*Navicula lapidosa*, *N. gallica* v. *perpusilla*, *N. nivalis*, *Cymbella sinuata*, *Pinnularia borealis*, *Hantzschia amphioxys-Bacillariophyta*), precum și unele alge care, în mod obișnuit, habitează diferitele tipuri de înmlăștiniri și mlaștini de turbă, inclusiv sfagnete, din vecinătate, de unde au fost spălate în albia râului (*Tabellaria flocculosa*, *Fragilaria pinnata*, *Stauroneis smithii*, *Navicula angusta*, *Eunotia praerupta*, *E. exigua* — *Bacillariophyta*; *Netrium digitus* — *Chlorophyta*).

În punctul la uzina electrică (Fig. 1), situat pe raza comunei Mărișel, compoziția comunităților se modifică atât calitativ cât și cantitativ relativ. Numărul total de genuri și specii prezente este mult mai mare (90 de specii, față de 25—60 în punctele precedente); de asemenea, numărul speciilor reprezentate prin numeroși indivizi este mai mare. Această diversificare a comunităților, cât și dezvoltarea abundentă a populațiilor componente o punem pe seama existenței aici a unor condiții ale mediului mai moderate, favorabile unui număr mai mare de specii. Specia net dominantă este *Nitzschia linearis*, diatomee cosmopolită și ubicvistă, cu spectru ecologic foarte larg. Cu populații abundente apar, în continuare, *Achnanthes minutissima*, *A. biasolettiana*, *Cymbella minuta*, *C. silesiaca*, *Cocconeis placentula*. Diversificarea menționată a comunităților se datorează apariției unor elemente noi, în general alge cu răspândire geografică și ecologică largi: *Oscillatoria simplicissima* — *Cyanophyta*; *Navicula gregaria*, *N. lanceolata*, *N. cryptocephala*, *Achnanthes lanceolata*, *Rhoicosphaenia abbreviata*, *Synedra raucheriae*, *Fragilaria capucina*, *F. construens*, *Nitzschia frustulum*, *N. dissipata* — B.

Lacurile de acumulare (Tabelul 2, Fig. 3) sunt dominate clar la nivelul planctonului de *Asterionella formosa* (diatomee exclusivă în Lacul Fântânele) și *Fragilaria crotonensis*, amândouă specii planctonice tipice de apă dulce. Pe lângă acestea apar, cu frecvență mai redusă, și multe alte alge planctonice: *Oscillatoria lacustris*, *O. limosa*, *O. planctonica* (*Cyanophyta*); *Uroglena volvox*, *Dinobryon divergens*, *Mallomonas acaroides*, *Synura spinosa*, *Chrysosphaerella brevispinosa* (*Chrysophyta*); *Fragilaria construens* et var. *binodis*, *Synedra delicatissima* (*Bacillariophyta*); *Oocystis lacustris*, *O. planctonica*, *Pseudosphaerocystis lacustris* (*Chlorophyta*); *Peridinium willei*, *Ceratium hirundinella* (*Dinophyta*). De asemenea, cu prezență întâmplătoare în plancton, apar și numeroase specii de diatomee bentonice de râu sau genuri și specii litorale epipelice și epifitice dulcicole (tichoplanctonul): *Cocconeis*, *Amphora*, unele specii de *Cymbella* și *Gomphonema*, *Frustulia*, *Surirella*, *Caloneis*, *Navicula pygmaea*, *Cymatopleura solea*.

Componentele bentică și epifitică ale comunităților Lacului Gilău (singurul cercetat sub acest aspect) înfățișează același amestec caracteristic de elemente tipice pe de o parte, la care se adaugă o serie de

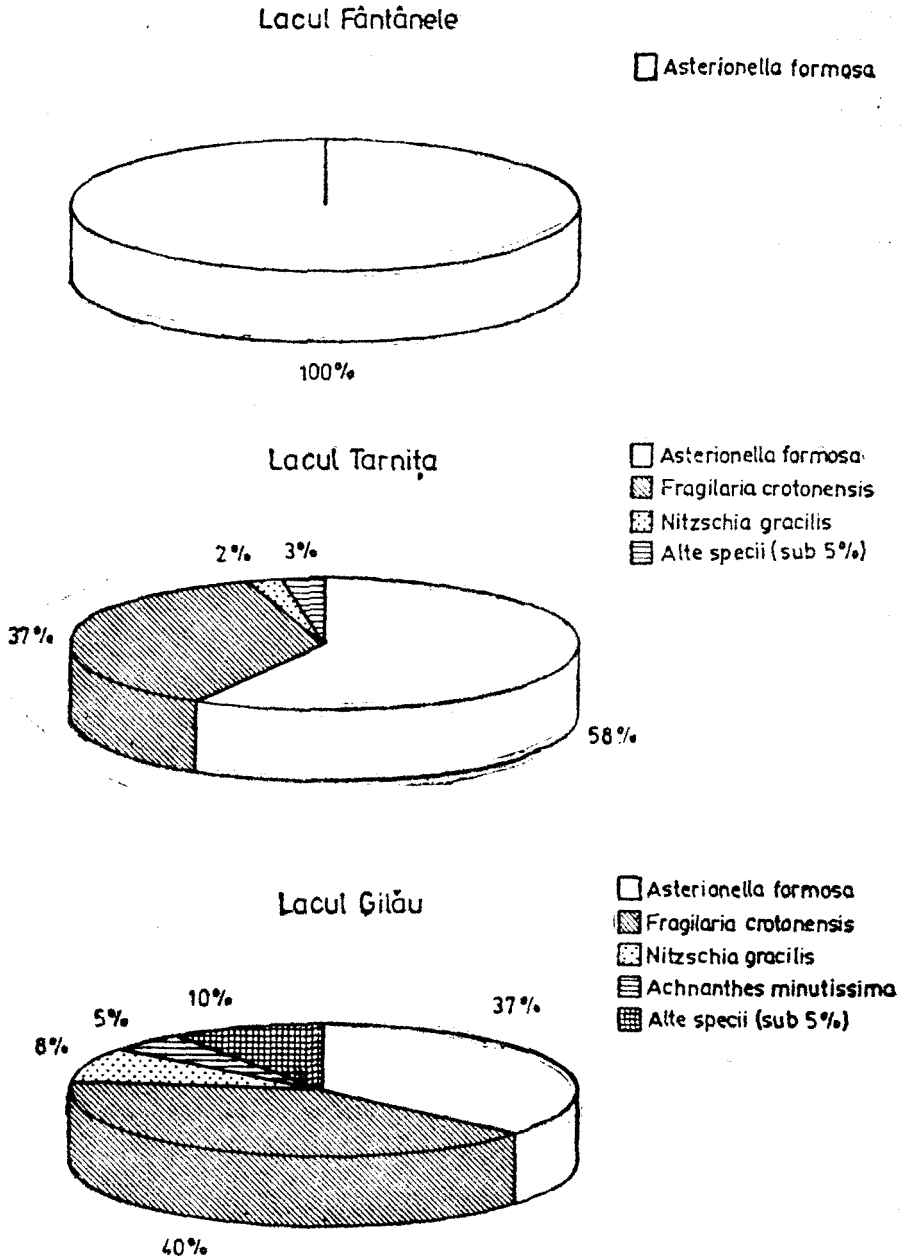


Fig. 3. Exprimarea procentuală a dominanței speciilor din planctonul lacurilor de acumulare de pe Someșul Cald.

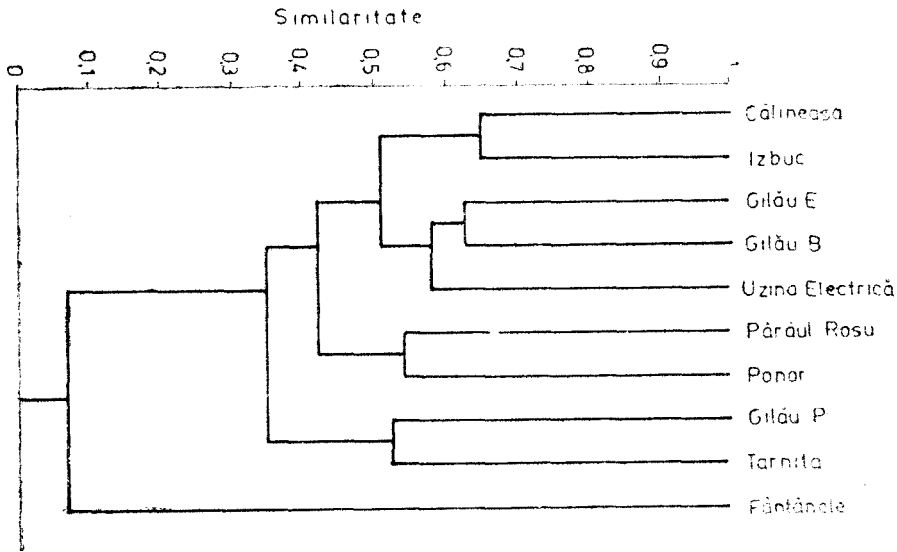


Fig. 4. Cladogramă ilustrând gruparea speciilor în comunitățile de diatomee din Someșul Cald, pe bază de afinitate floristică.

elemente tichocenotice provenite din plancton și de asemenea, izolat apar specii cenoxene, antrenate odată cu apele râului din biotopuri învecinate și sedimentate pe fundul lacului ori fixate pe diferite substraturi solide.

Cladograma de afinitate floristică (Fig. 4) indică diferențierea netă a planctonului Lacului Fântânele (practic monospecific) pe de o parte, și a celor ale Lacurilor Târnița și Gilău pe de altă parte, grupate la un nivel de similaritate de 50%; bentosul și epifitonul Lacului Gilău se asociază la un nivel de similaritate de 60%. Pârâul Roșu și Ponorul, respectiv Călineasa și Izbucul prezintă similarități floristice între 50 și 70%, iar comunitatea de la uzina electrică ocupă o poziție intermediară și formează o grupare cu bentosul și epifitonul Lacului Gilău la aprox. 50% similaritate, indicând faptul că, din punctul de vedere al compoziției algale, aceste două tipuri de comunități lacustre sunt tributare, într-un grad destul de ridicat, față de comunitățile bentonice aflate în sectorul din amonte al râului.

Comunitățile algale din regiunile superioare ale Someșului Cald își păstrează caracterul natural, nealterat semnificativ de factori alohtoni, așa cum o indică aspectul trunchiat, caracteristic al curbei normale, trasată pentru comunitățile din Pârâul Roșu (Fig. 5). O astfel de curbă evidențiază faptul că aceste comunități sunt compuse din 1—2 specii dominante, diferențiate net ca abundență față de celelalte specii ale comunității, care sunt reprezentate, în majoritate, printr-un număr foarte mic de indivizi, la nivelul primelor trei intervale de distribuție.

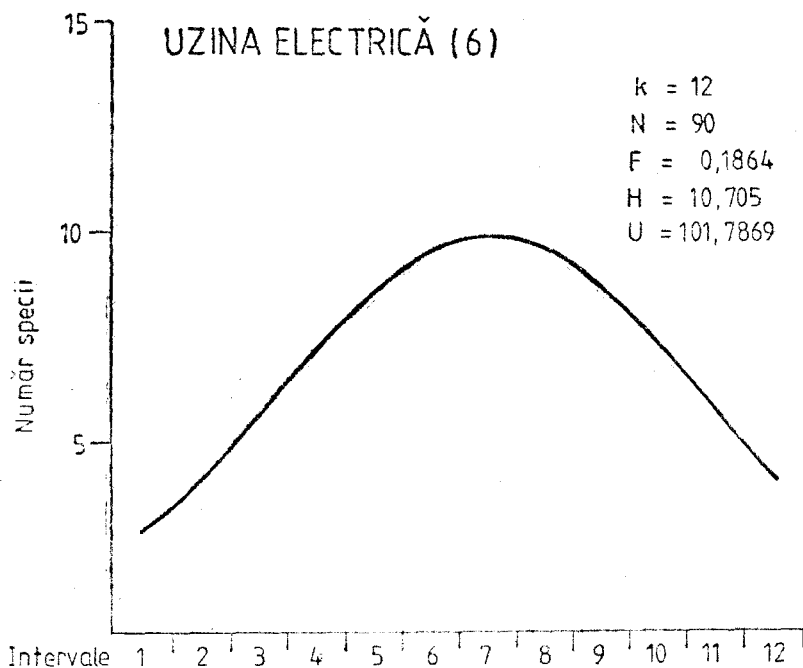
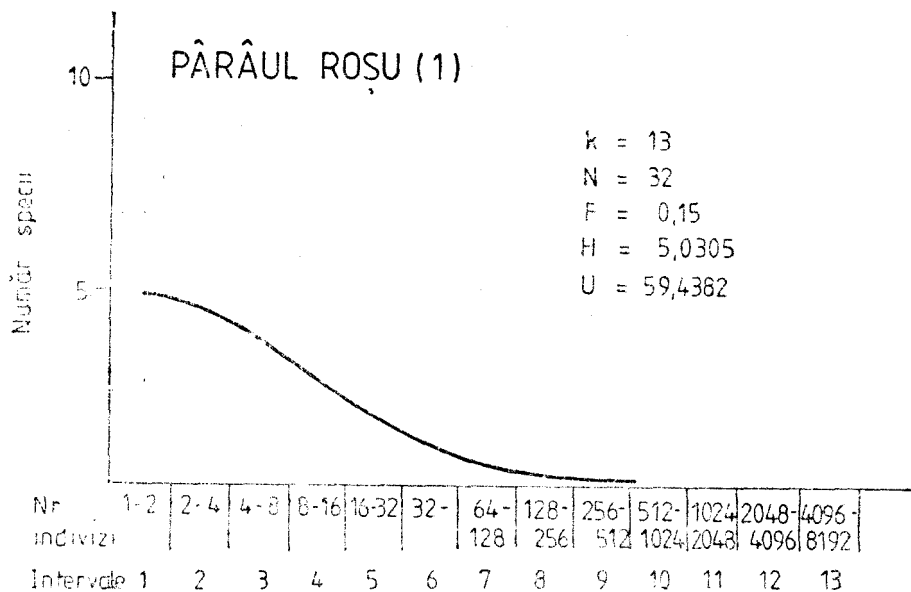


Fig. 5 și 6. Curbele de distribuție a populațiilor în cadrul comunităților de diatomee caracteristice regiunilor superioare (1), respectiv celor inferioare (6), de pe cursul Someșului Cald. k — Nr. de intervale. N — Nr. de specii identificate. F — Factor de dispersie. H — Înălțimea maximă teoretică a intervalului modal. U — „Univers teoretic” sau nr. teoretic de specii.

Curba, descriind structura comunităților de pe cursul inferior al râului (la uzina electrică) (Fig. 6), are un aspect cu totul diferit, de clopot, semnalând alterarea mai mult sau mai puțin pronunțată a acestora. Acest aspect al curbei indică faptul că majoritatea speciilor componente sunt reprezentate printr-un număr mediu de indivizi (la nivelul intervalelor 5—9) și, pe lângă specia dominantă, există un număr de specii care dezvoltă populații abundente (la nivelul intervalelor 9—11).

Diversificarea specifică a comunităților dinspre regiunea izvoarelor către confluență (Fig. 7) rezultă într-o creștere a stabilității cenotice a acestora.

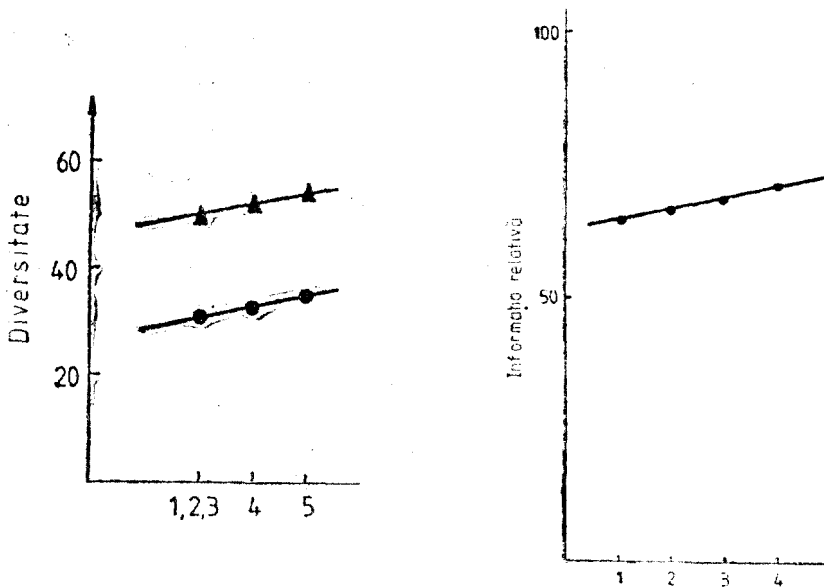


Fig. 7. Evoluția valorilor diversității specifice (cerc), maxime (triunghi) și a informației relative la nivelul comunităților algaie de pe Someșul Cald.

Concluzii. 1. Din punctul de vedere al compoziției floristice, comunitățile algaie din diferitele porțiuni ale Someșului Cald se individualizează în funcție de condițiile de mediu locale: comunități dominate de specii *reofile*, *crenofile* sau *crenobionte*, preferând condițiile extreme ale apelor de munte, în regiunile superioare ale râului; comunități dominate și compuse în cea mai mare parte din specii *ubicviste* și *euri-tope*, larg răspândite, fără preferințe evidente pentru un anumit gen de biotop, în regiunile mai joase ale cursului; comunități *planctonice*, *bentonice* și *epifitice* specifice, în lacurile de acumulare.

2. În regiunile montane, apropiate de izvoare ale râului, comunitățile algale nu par afectate de influențe externe, păstrându-și caracterul natural. Mai jos pe firul apei se constată o modificare a organizării comunităților față de modelul celor naturale, ceea ce, probabil, se datorează într-o măsură oarecare și diferitelor influențe antropice din aceste regiuni, mai intens populate.

3. Această alterare structurală se realizează în direcția creșterii gradului de diversitate pozițională și a numărului de specii cu populații abundente, ceea ce rezultă într-o creștere a stabilității cenotice a comunităților.

BIBLIOGRAFIE

1. Buta, I., *Bazinul Someșului — studiu hidrologic*, Teză Dr., Univ. Babeș-Bolyai, Fac. Biol.-Geogr., Cluj, 1967.
2. Cancela da Fonseca, J.-P., *L'outil statistique en biologie du sol. V. Indices de diversité spécifique*, „Rev. Écol. Biol. Sol”, 6, 1969, 1—30.
3. Cancela da Fonseca, J.-P., *L'outil statistique en biologie du sol. VI. Théorie de l'information et diversité spécifique*, „Rev. Écol. Biol. Sol”, 6, 1969, 533—555.
4. Mountford, M. D., *An index of similarity and its application to classificatory problems*, in Murphy, P. W. (Ed.), *Progress in Soil Zoology*, p. 43—59, Butterworths, London, 1962.
5. 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.
6. Patrick, R., Reimer, C. W., *The Diatoms of the United States, Exclusive of Alaska and Hawaii*, Acad. Nat. Sci., Philadelphia, 1966.
7. Rășiga, A., Péterfi, L. S., Momeu, I., *Structura comunităților de diatomee din Someșul Rece, Transilvania, România*, „Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Biol.”, 37 (2), 1992, 3—13.
8. Rășiga, A., Péterfi, L. S., Momeu, I., *Aprecierea gradului de saprobi-tate a apei în Someșul Rece, Transilvania, pe bază structurii comunităților de diatomee*, „Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Biol.”, 39 (2), 1994, 3—6.

ANALIZA PALINOLOGICĂ A MLAȘTINII PĂRĂUL CALD, CORUND — JUDEȚUL HARGHITA

ZOE BUZ*

SUMMARY. — **Palynological Analysis of the Pârăul Cald Bog, Corund — Harghita County.** The phytohistorical interpretation of the spore and pollen spectra of the profile collected from this bog permitted decyphering of some moments from the forest phases: *Quercetum mixtum*-*Picea-Corylus*, *Picea-Carpinus* and *Fagus-Picea-Abies*.

Mlaștina Pârăul Cald (Meleg patak) este una dintre mlaștinile mezotrofe situate pe platoul vulcanic Sovata—Praid—Dealul, în vecinătatea satului Fântâna Brazilor, comuna Corund, județul Harghita.

Se află la 970 m altitudine, la nord-vest de mlaștina Podul de Hârtie, fiind situată peste cumpăna apelor, la izvorul Văii Calde care nu îngheață niciodată, având o suprafață relativ mică de 0.3 ha. Un studiu mai amănunțit al acestui izvor ar putea să-l facă benefic pentru localnici.

A fost semnalată pentru prima dată de Emil Pop în 1954 în studiile sale botanice, apoi în monografia privind mlaștinile de turbă din țara noastră [9, 10].

Sfagnetul foarte umed, cu *Calla palustris*, *Drosera rotundifolia* și exemplare rare de *Alnus glutinosa*, are un strat negliabil de turbă, ce nu depășește 1 m grosime (aproximativ 2000 m³), depozitată începând cu episodul de tei (*Tilia*) din Atlantic, specific acestui platou.

Sucesiunea vegetației din împrejurimi a fost stabilită pe baza analizării sporo-polenice a celor 28 de probe luate pe verticală din acest sediment turbos. Întrucât în sedimentele profunde (95—100 cm) polenul este slab conservat și în cantități mici, nu s-au putut întocmi spectre polenice pentru aceste orizonturi și ea atare lipsesc din tabel și diagramă (Tabel 1, Fig. 1).

Interpretarea fitoistorică a celor 19 spectre polenice, începând de la bază spre suprafață, a permis să descifrăm momente din trei faze silvestre.

— *Faza stejărișului amestecat cu molid și alun* este reflectată numai în spectrul polenic al orizontului 90 cm, bogat în polenul teiului (40%) și molidului (40%), în timp ce ceilalți arbori (carpenul, stejarul, ulmul, arțarul, mesteacănul, pinul și chiar fagul) abia totalizează 20%.

În acest sediment turbos, polenul alunului se menține la valori destul de ridicate (41%), așa cum apar aceste valori în a doua parte a climatului cald și umed, caracteristic Atlanticului postglaciar.

* Biblioteca Centrală Universitară „Lucian Blaga”, 3400 Cluj-Napoca, România

Tabel 1

Spectrul polenit obținut din sedimentele organo-minerale ale mlaștinii Pârâul Cald

cm	Fitotaxoni	Alnus	Betula	Salix	Pinus	Picea	Acer	Ulmus	Tilia	Juglans	Quercus	Quercetum mixtum	Corylus	Carpinus	Abies	Fagus	Asteraceae	Poaceae	Cyperaceae	Div. NAP	Lycopodiales	Filicales	Bryales
0	2,6	—	—	21,3	43,3	1,3	0,6	—	—	—	21,3	22,0	1,3	4,0	0,6	6,0	1,0	4,6	6,6	7,0	—	186,3	0,6
5	5,3	7,3	—	18,0	42,6	—	0,6	0,6	—	—	3,3	4,6	5,3	5,3	2,0	14,6	6,0	4,6	2,6	4,0	1,3	17,3	—
10	9,6	1,3	—	17,3	30,0	0,6	0,6	0,6	1,3	—	4,6	6,0	4,6	6,0	2,0	26,6	10,6	8,0	6,0	13,0	4,6	58,8	—
15	7,3	2,6	0,6	10,0	48,0	2,0	—	—	—	—	4,0	4,0	10,0	4,0	3,3	18,0	8,6	4,0	2,0	7,3	3,3	62,0	0,6
20	6,6	4,0	—	8,0	36,0	0,6	—	0,6	—	—	2,0	2,6	6,0	6,6	1,3	33,3	8,0	5,3	3,3	2,6	2,0	26,6	—
25	5,3	4,6	0,6	8,6	26,6	1,3	—	—	—	—	2,0	2,0	4,6	4,0	2,0	45,3	4,0	6,0	0,6	5,3	2,6	24,6	—
30	18,6	3,3	—	4,0	18,6	0,6	—	0,6	0,6	4,0	4,6	6,6	6,6	2,0	2,0	45,3	12,6	4,6	—	5,3	4,0	86,6	1,3
35	8,0	1,3	—	4,0	31,3	—	—	2,0	—	—	0,6	2,6	5,3	6,0	2,6	43,3	4,0	3,0	1,0	3,0	18,0	30,0	—
40	20,0	5,0	—	8,0	26,0	—	—	2,0	—	—	2,0	4,0	5,0	4,0	3,0	30,0	3,0	3,0	5,0	5,0	8,0	30,0	—
45	4,6	2,6	0,6	2,0	41,3	1,3	—	2,6	—	—	4,0	6,6	3,3	9,3	—	31,3	0,6	3,3	2,0	1,3	4,0	10,6	22,6
50	12,0	7,3	—	2,0	43,3	—	0,6	2,0	—	—	2,6	5,3	5,3	16,6	—	13,3	2,0	2,0	—	1,3	30,0	6,0	34,0
55	10,0	2,6	—	4,0	53,3	0,6	—	2,0	—	—	5,3	7,3	4,6	6,0	0,6	14,6	2,0	2,0	2,0	3,0	4,6	2,0	24,6
60	3,3	2,0	—	1,3	56,6	0,6	2,6	2,6	—	—	3,3	8,6	3,3	17,3	—	10,0	1,3	2,6	—	2,0	5,3	7,3	33,3
65	4,0	2,0	—	2,0	51,3	—	2,6	2,0	—	—	7,3	12,0	7,3	21,3	—	7,3	0,6	3,3	0,6	2,3	14,0	36,6	19,3
70	6,0	4,0	—	2,6	42,6	1,3	2,0	8,0	—	—	3,3	13,3	20,0	26,0	—	4,0	7,3	6,6	1,3	1,3	37,3	36,6	26,6
75	5,3	2,0	0,6	2,0	45,3	0,6	3,3	8,0	—	—	6,6	18,0	16,0	17,3	—	8,6	4,0	5,3	2,0	0,6	16,0	23,3	18,6
80	6,6	2,6	—	0,6	49,3	0,6	3,3	10,0	—	—	2,6	16,0	28,0	23,3	—	0,6	2,0	5,3	2,0	—	20,0	70,0	12,0
85	12,6	3,3	—	2,0	16,6	—	2,6	24,6	—	—	2,6	29,6	36,0	33,3	—	2,0	4,0	2,0	—	3,3	38,0	63,3	36,6
90	5,0	4,0	1,0	2,0	40,0	1,0	1,0	40,0	—	—	1,0	42,0	41,0	6,0	—	0,6	2,0	7,0	3,0	4,0	15,0	530,0	16,0

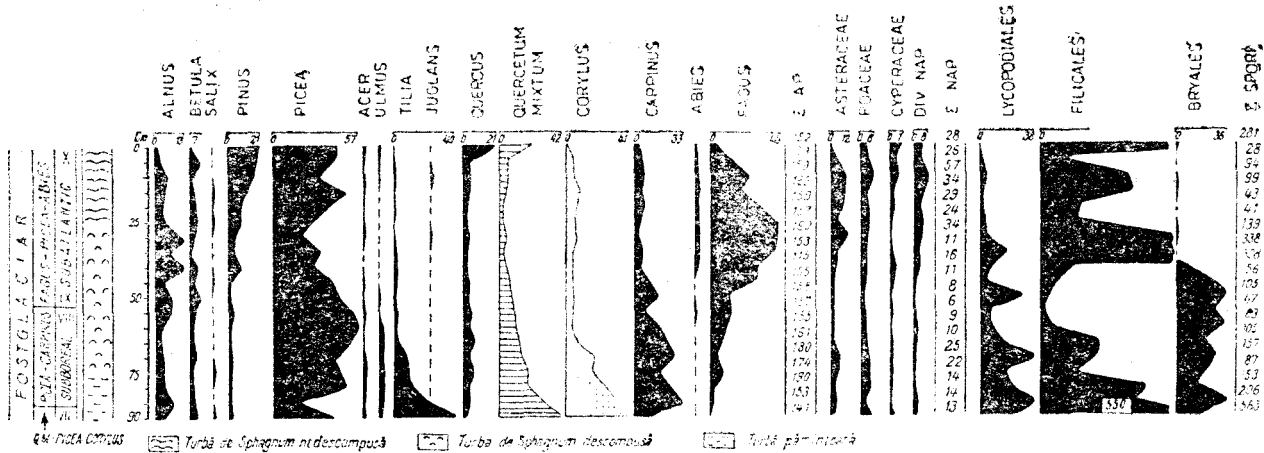


Fig. 1. Diagrama sporo-polenică a mlaștinii Pârăul Cald.

Lipsește polenul bradului. Valorile procentuale extrem de scăzute ale polenului de stejar ($\pm 1\%$), ulm ($\pm 1\%$) și arțar ($\pm 1\%$) și foarte ridicate ale teiului (40%) ne determină să presupunem că stejărișurile amestecate, cândva în Atlantic, erau alcătuite de teișe compacte, ecosisteme silvestre atestate sporo-polenic și în mlaștinile Podul de Hârtie și Sâncel [2, 5].

— *Faza molidului cu carpen.* Pădurile, care au vegetat în timpul acestei faze, au polenul conservat în sedimentul turbos între adâncimile 60—85 cm. Spectrul polenic al orizontului 85 cm este mult deosebit comparativ cu al orizontului 90 cm, mai ales în ceea ce privește participarea polenului de carpen, molid și tei. Dacă spectrul polenic al orizontului 90 cm conține 6% polen de carpen, 40% polen de molid și 40% polen de tei, spectrul polenic al orizontului 85 cm este alcătuit din 33,3% polen de carpen, cărora li se adaugă și 12,6% polen de arin. Competiția procentuală dintre polenul molidului și al carpenului, mai ales, pe o grosime doar de 5 cm, trădează sincoparea acestei faze, în special în perioada de afirmare a carpenului, deci la începutul Subborealului. Și în cazul acestei mlaștini, putem admite că între nivelurile 90 și 85 cm apare o lacună de sedimentare sau o stratificare extrem de lentă a sedimentului organo-mineral, fenomen surprins și în alte mlaștini de pe platou.

Spectrele polenice ale orizonturilor turboase mai de suprafață (80—60 cm) încep să fie dominate de polenul molidișelor, care se afirmă valoric atingând maxima absolută (56,6%) din întregul profil analizat palinologic, în timp ce polenul cărpinișelor și stejărișelor participă cu valori procentuale mai mici și oscilante (23,3—17,3% carpen, 16—8% *Quercetum mixtum*).

Luând în considerare procentajul ridicat al polenului de tei ($\pm 10\%$) comparativ cu cel înscris de polenul stejarului ($\pm 5\%$) și ulmului ($\pm 2\%$), putem admite că teiul era dominant în sânul stejărișelor amestecate care, în cazul de față, la această altitudine, au fost de durată.

Procentajele polenice ridicate ale alunului (26—7%) pledează, de asemenea, pentru o vegetație prelungită în zonă a elementelor termofile în Subboreal. Acest moment fitoistoric poate fi asemănător cu cel surprins palinologic în turba de la Pădureni-Țop, jud. Cluj, la altitudine mult mai joasă, precum și în alte localități [4—8].

Această competiție sporo-polenică reflectă mai degrabă declinul fazei carpenului cu molid, pentru că apare constant și cu valori tot mai mari (0,6—14%) polenul fagului, în timp ce polenul teiului, dintre coabitantii stejărișelor mixte, scade de la 10 la 2,6%. În acest caz, cu suficientă certitudine, putem admite că fagul a început să vegeteze, mai abundent, în sânul stejărișelor amestecate, preluând treptat dominanța teiului. Lipsește polenul bradului, dar este prezent cel de arin ($\pm 5\%$), mesteacăn ($\pm 2\%$) etc.

Polenul plantelor ierboase are procentaje scăzute, comparativ cu cel produs de arbori, dovadă că zona era împădurită, pajiștile fiind reduse ca suprafață. Polenul asteraceelor, poaceelor, ciperaceelor etc.,

inventariat în aceste spectre polenice depuse în Subboreal, reflectă prezența lor pe mlaștină. Același caracter mlaștinos îl indică și frecvența foarte ridicată (550%) a sporilor de *Filicales*. S-a surprins, în aceste orizonturi, cel mai ridicat procentaj aparținând sporilor de *Lycopodium* (38%) de pe întregul profil.

— *Faza fagului-molidului-bradului* este surprinsă bine în orizonturile de suprafață (50—0 cm). Valorile aproape egale ale polenului de molid (18,6—48%) și de fag (13,3—45,3%), precum și intersecțiile curbilor polenice, indică o concurență strânsă, pentru un areal mai extins în zonă, între molidișe și făgete. În toate spectrele polenice, sedimentate de-a lungul acestei faze, apare polenul bradului, cu frecvențe reduse (0,6—3,3%). Prezența, precum și valorile reduse ale polenului de brad oglindesc atât existența speciei în pășunile din jur, precum și caracterul subordonat în sânul acestor ecosisteme silvestre.

Se remarcă calitativ în spectre polenul arinului și mesteacănului (4—20% și, respectiv, 2—7,3%), care reflectă prezența în zonă a arinișelor și mestecănișelor cantonate de-a lungul văilor sau chiar în mlaștini.

Prezența, fără întrerupere, a polenului de pin pe cuprinsul întregului profil, precum și afirmarea sa valorică spre suprafață (21,3%) reflectă caracterul relictar al pinetului (*Pinus silvestris*) din tinovul Ruț din apropiere [1, 3].

Procentajele polenice ale carpenului (2—9%) și stejărișului amestecat ($\pm 4\%$) sunt o dovadă că cverceto-cărpinetele de la Ocna de Jos și Sovata sunt reminiscențe ale fostelor ecosisteme silvestre de vârstă atlantică și subboreală.

Frecvența polenului NAP este mai ridicată în această fază silvestră, însă scad procentual spori de *Lycopodium* și briofite, în schimb se mențin cu valori ridicate spori de *Filicales* (6—185,3%), atestând abundența pteridofitelor în locuri mai umede.

BIBLIOGRAFIE

1. Buz, Z., *Semnificația fitogeografică și fitoistorică a complexului mlaștinos de la Fântâna Brazilor (jud. Harghita)*, „Ocrot. Nat. și a Med. Inconjurător” (București), 1986, 30 (1), 42—47.
2. Buz, Z., *Analyse pollinique des sediments tourbeaux de Sâncel (Dept. Harghita)*, „Contrib. Bot.” (Cluj-Napoca), 1986, 89—94.
3. Ciobanu, I., *Analiza polinică a turbei mlaștinii Ruț din Munții Harghita*, „Contrib. Bot.” (Cluj), 1960, 231—238.
4. Diaconeasa, B., *Analiza palinologică a profilului turbos de la Pădureni-Top, județul Cluj*, „Contrib. Bot.” (Cluj-Napoca), 1985, 71—76.
5. Diaconeasa, B., Buz, Z., *Analiza palinologică a mlaștinii Podul de Hartie Corund — județul Harghita*, „Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Biol.”, 1993, 38 (1—2), 29—35.
6. Diaconeasa, B., Buz, Z., *Contribuția teiului la structurile silvestre caternare din România*, „Contrib. Bot.” (Cluj-Napoca), 1993—1994, 107—121.

7. Diaconeasa, B., Buz, Z., Crişan-Mitroescu, S., *Contribuţii la cunoaşterea istoriei pădurilor din Depresiunea Trascăului, jud. Alba*, „Contrib. Bot.” (Cluj-Napoca), 1985, 77—83.
8. Diaconeasa, B., Guist-Homm, E., *Cercetări palinologice privind pădurile postglaciare de pe Valea Morii — Cluj-Napoca*, „Contrib. Bot.” (Cluj), 1981, 17—25.
9. Pop, E., *Studii botanice în mlaştinile de turbă*, „Bul. Ştiinţ. Sect. Ştiinţ. Agric., Biol., Geol. Geogr.” (Bucureşti), 1954, 6 (1), 347—406.
10. Pop, E., *Mlaştinile de turbă din R.P.R.*, Ed. Acad. RPR, Bucureşti, 1960.

ANALIZA PALINOLOGICĂ A MLAȘTINII FĂNTĂNA BRAZILOR,
CORUND — JUDEȚUL HARGHITA

ZOE BUZ*

SUMMARY. — **Palynological Analysis of the Fântâna Brazilor Bog, Corund — Harghita County.** This paper presents the results of the palynological analysis of the organo-mineral sediments from the Fântâna Brazilor bog which indicated the *Fagus-Picea-Abies* phase from the Subatlantic period, the final of the Postglacial.

Mlaștina Fântâna Brazilor (Fenyökút) este tripartită, situată la nord de satul cu același nume aparținând comunei Corund, județul Harghita. Însotind pâraiele abundente, mlaștina are o suprafață de cca 5 ha, turbă groasă de 1,2 m în centru, însumând aproximativ un stoc de 30.000 m³ care ar putea fi utilizat ca îngrășământ agricol.

Două din ramurile sale au rămas doar în amintire, astăzi fiind transformate în islazuri, iar a treia parte fiind în parte cultivată, în parte pajiște îngrădită, mlaștina propriu-zisă păstrându-se doar ca o fâșie îngustă de-a lungul pârâului pe care este formată.

Mlaștina are un caracter ombrogen, ca majoritatea mlaștinilor de pe platoul Sovata—Praid—Dealul, afirmându-se prin turba relativ subțire și discontinuă ce separă vegetația de substratul mineral eutrof și apa de infiltrație, prin aspectul submers, ecologia și vegetația, sa. Este acoperită de magnocaricete risipite în perini mari și rigide, despărțite de bălțile și șanțuri pline cu *Sphagnum* și *Calla* [3, 9].

Zăcămintul turbos al acestei mlaștini mezotrofe, deși se află în vecinătatea tinovului Ruț și mai ales a mlaștinii Ramura Corundului, este relativ recent, format cândva în perioada Subatlantică, rece și umedă, din timpul permanentei afirmării a fagului sub dominarea molidului [3, 4].

Din profilul turbos ridicat, în grosime de 100 cm, numai primii 50 cm au conservat suficient polen pentru stabilirea aspectelor polenice. Probele au fost colectate la intervale echidistante de 5 cm (Tabel 1, Fig. 1).

— *Faza fagului, molidului și bradului (Fagus-Picea-Abies).* Întreg profilul reconstituit din această mlaștină semnalează spectre polenice dominate de polenul molidișelor și al făgetelor. Polenul făgetelor atinge valoarea maximă de 63,3% în cadrul orizontului 20 cm, fiind urmat de o valoare modestă de 6% a polenului de brad, iar la orizontul 5 cm polenul molidișelor atinge 63,3%, constituind cea mai ridicată valoare a lor.

* Biblioteca Centrală Universitară „Lucian Blaga”, 3400 Cluj-Napoca, România

Spectrul polenic obținut din sedimentele organo-minerale ale mlaștinii Fundana Brazilor

0	1,3	0,6	2,0	17,3	54,6	—	—	1,3	4,6	6,0	0,6	2,6	2,6	1,3	14,0	2,0	27,3	7,3	4,6	2,0	6,6	4,6	2,0	6,6	4,6	
5	3,3	0,6	1,3	18,0	60,6	0,6	—	1,3	2,6	4,0	2,6	2,0	2,0	3,3	6,0	2,6	6,6	2,0	1,3	0,6	10,0	4,6	0,6	10,0	4,6	
10	8,0	2,0	2,6	4,0	45,3	1,3	0,6	3,3	4,0	8,0	5,3	4,0	4,0	6,0	18,6	3,3	13,3	2,6	0,6	—	24,0	1,3	—	24,0	1,3	
15	2,0	0,6	4,0	0,6	17,3	0,6	2,0	2,0	2,6	6,6	4,6	4,0	4,0	0,6	63,3	1,3	6,0	2,0	—	2,6	62,0	14,6	2,6	62,0	14,6	
20	2,6	0,6	2,0	3,3	43,3	2,0	2,0	2,6	3,3	8,0	2,6	4,6	4,6	—	32,0	—	4,6	1,3	—	—	11,3	14,6	—	—	14,6	
25	2,6	0,6	2,6	—	40,0	3,3	2,0	3,3	6,0	11,3	6,0	2,0	2,0	—	37,3	1,3	3,3	1,3	3,3	3,0	0,6	13,0	8,6	3,0	13,0	8,6
30	3,0	1,0	2,0	1,0	35,0	1,0	1,0	3,0	3,0	7,0	3,0	5,0	5,0	—	45,0	0,6	2,6	1,6	—	—	30,0	15,0	—	—	30,0	15,0
35	2,0	0,6	4,0	1,3	46,0	0,6	0,6	4,6	3,3	8,0	4,6	3,3	3,3	—	33,3	4,0	6,0	4,0	1,3	4,0	34,0	15,0	—	—	34,0	15,0
40	4,0	2,0	3,0	3,0	35,0	2,0	2,0	3,0	3,0	8,0	3,0	5,0	5,0	—	38,0	—	5,0	4,0	—	—	4,0	15,0	—	—	4,0	15,0
45	8,6	2,6	11,3	1,3	16,0	2,0	2,6	6,0	4,0	12,6	16,6	5,3	5,3	—	40,0	0,6	5,3	—	—	—	24,6	8,6	—	—	24,6	8,6
50	6,6	1,0	3,6	1,0	28,6	1,6	1,6	5,6	2,6	9,3	6,0	3,6	3,6	—	39,6	—	5,6	1,0	—	—	16,6	4,0	—	—	16,6	4,0

Tabel 1

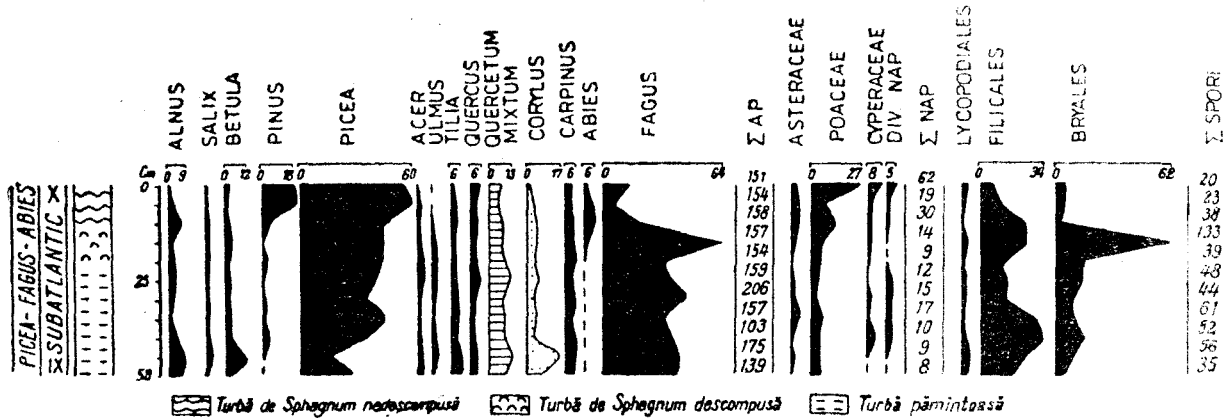


Fig. 1. Diagrama sporo-polenică a mlaştinii Fântâna Brazilor.

În timpul acestei faze este prezent și polenul cvercetelor mixte, dintre care teiul este mai bine reprezentat sporo-polenic ($\pm 5\%$) în orizonturile bazale decât stejarul ($\pm 3\%$), iar spre suprafață fenomenul apare inversat. Este prezent în toate spectrele și polenul alunului, dar valorile scad, de la bază (16% în orizontul 45 cm) spre suprafață.

De asemenea, este prezent în toate spectrele polenul carpenului (5,3—2%), arinului (8—2%), mesteacănului (11—1,3%) și al pinului, care în orizonturile superficiale participă cu $\pm 18\%$. Prezentele informații sporo-polenice confirmă existența acestor esențe în zonă, mai ales sub formă de cverce/cărpinete.

Spre suprafață, curba polenului de fag, în descreștere rapidă, se încrucișează cu cele ascendente ale polenului de molid și pin, ca urmare a revertenței în zonă a celor din urmă. Afirmarea făgetelor a determinat dezagregarea cărpinetelor la altitudinea de ± 1000 m și „împingerea” molidișelor în etajul montan superior și subalpin, definindu-se astfel etajarea silvestră actuală, confirmată sporo-polenic și de captările aeroplanctonice de la Praid [3].

Participarea bradului este destul de redusă (maximum 12—14%) în făgetele subatlantice dominante pe platou acum 3000 de ani, fapt ce dovedește contribuția sa minoră în compoziția silvestră a platoului, ca de altfel și în alte regiuni din Carpații Nord-Estici [1].

Deoarece polenul bradului în această mlaștină nu a depășit 6% în nici un spectru polenic, nu s-au putut delimita, de-a lungul acestei faze, cele trei episoade expresiv ilustrate în mlaștinile de la Dealu: fag, fag-molid-brad, fag. S-a observat că în toate cazurile polenul fagului, molidului și bradului este însoțit permanent în spectre de polenul carpenului, stejărișului mixt, dar aproape lipsește din spectre polenul ulmului și teiului [2].

De asemenea, în această fază este prezent polenul de salcie și mesteacăn cu valori modeste: 2% și, respectiv, 11,3%. Participarea slabă în spectrele polenice analizate a polenului de arin indică lipsa sa de pe mlaștină, spre deosebire de celelalte mlaștini de pe platou, unde prezența polenului de *Alnus* creează supraprezentări în spectrele de la Sâncel, Ramura Corundului etc.

Valorile mai ridicate ale polenului molidișelor învecinate de la Ruț și Ramura Corundului sunt determinate probabil de lipsa concurenței făgetelor din Atlantic și până în Actual, în zonă. În toate spectrele polenice ale orizonturilor superioare, polenul fagului înregistrează valori mai scăzute, în timp ce al pinului și în special al molidului înregistrează valori mai ridicate. Probabil că aceasta reflectă caracterul antropic care, alături de factorul climatic, a condus la fenomenul de revertență amintit. Asemănătoare acestor făgete ne apar cele din Nordul Transilvaniei care ating 94% în mlaștina „Pe Obcină”, cele de la Moșoș 78%, de la Sălicea 72%, de la Dorna Lucina ca și cele de la Avrig 40% [5—7, 10].

Din grupul NAP se remarcă curba ascendentă a polenului poaceelor care ating 27,3% la suprafață, ca urmare a introducerii recente a culturilor de secară și porumb pe platou.

Dintre plantele ierboase cu spori, briofitele ating un maxim de 62% concomitent cu maximumul fagului. Filicalele sunt bine reprezentate și ele (maximum 34%), cu excepția orizonturilor superioare care indică o scădere a frecvenței lor în timpurile recente, corespunzătoare realității. Alături de acestea, lycopodiialele sunt aproape permanent prezente, dar cu valori procentuale mici.

BIBLIOGRAFIE

1. Boșcaiu, N., Lupșa, V., Seghedin, T. G., *Evoluția fâgetelor la răsărit de Carpați*, în *Fâgetele carpatine, semnificația lor istorică și ecoprotectivă*, p. 31—89, Acad. RSR, Cluj-Napoca, 1982.
2. Buz, Z., *Analize de polen în turba de la Dealu (jud. Harghita)*, „Contrib. Bot.” (Cluj-Napoca), 1988, 95—99.
3. Buz, Z., *Cercetări palinologice în depozite precuaternare și cuaternare în regiunea Sovata—Praid—Dealul*, Teză Dr., Univ. Babeș-Bolyai, Fac. Biol., Geogr. Geol., Cluj-Napoca, 1987.
4. Ciobanu, I., *Analiza polinică a turbei mlaștinii Ruț din Munții Harghita*, „Contrib. Bot.” (Cluj), 1960, 231—238.
5. Pop, E., *Analize de polen în turba Carpaților Orientali (Dorna—Lucina)*, „Bul. Grăd. Bot. Cluj” (Cluj), 1929, 9 (3—4), 81—210.
6. Pop, E., *Contribuții la istoria vegetației cuaternare din Transilvania*, „Bul. Grăd. Bot. Cluj” (Cluj), 1932, 12 (1—2), 29—102.
7. Pop, E., *Contribuții la istoria pădurilor din Nordul Transilvaniei*, „Bul. Grăd. Bot. Cluj” (Cluj), 1942, 22 (1—4), 101—177.
8. Pop, E., *Studii botanice în mlaștinile de turbă*, „Bul. Științ. Secț. Științ. Agric., Biol., Geol. Geogr.” (București), 1954, 6 (1), 347—406.
9. Pop, E., *Mlaștinile de turbă din R.P.R.*, Ed. Acad. RPR, București, 1960.
10. Pop, E., Diaconeasa, B., *Analiza palinologică a turbei din tinovul Mohoș*, „Contrib. Bot.” (Cluj), 1967, 297—303.



CERCETĂRI ECOLOGICE PRIVIND POPULAȚIILE DE CHILOPODE
ÎN UNELE TIPURI DE PĂDURI DIN JUDEȚUL
BISTRIȚA-NĂSAUD

ZACHIU MATIĆ, LIVIU A. FLOCA*,
ALEXANDRU A. HODOROGA ** și ARIADNA HUREZEANU***

SUMMARY. — Ecological Researches Concerning the Chilopod Populations from Some Forest Types in the Bistrița-Năsăud County. Ten-year studies (1981—1990) of populations of Chilopods from three forest types in the vicinity of the city of Bistrița, completed with zoogeographical data and a systematic list of the myriapods specific for the north-western zone of Romania, are described.

Cercetările noastre se referă în special la unele date sinecologice asupra Chilopodelor din litiera a trei păduri din apropierea municipiului Bistrița, precum și la prezentarea speciilor acestui grup din județul Bistrița-Năsăud. S-au ales pentru studiu trei biotopuri forestiere, diferite ca așezare, dar asemănătoare din punct de vedere al condițiilor de mediu, concretizate în faciesul fitocenozelor, fiind vorba, de fapt, de variante ale unei păduri de gorun.

Pădurea Codrișor este situată în sud-estul municipiului Bistrița, la o altitudine de 360—500 m; zona cercetată are expoziție nord-vestică, cu aspect de pădure degradată. Vegetația este reprezentată de un gorunet cu floră de mull, litiera având grosimea de 0,5—3 cm și o acoperire de 100%.

Pădurea Dealul Târgului este situată în nordul municipiului, la o altitudine de 510—610 m, cu expoziție estică, iar vegetația este reprezentată de un gorunet de coastă cu graminee. Litiera are o grosime de 0,5—1 cm și o acoperire de cca. 75%.

Pădurea Schullerwald este situată în vestul municipiului, în apropierea platformei industriale, cu expoziție estică. Vegetația este un gorunet cu floră de mull, litiera având grosimea de 1—2 cm, cu acoperire de 100%.

Cele trei biotopuri prezintă un microclimat continental moderat, în contextul unui climat de dealuri. Temperatura prezintă diferențieri condiționate mai ales de fragmentarea și orientarea reliefului, la care se adaugă și alți factori locali. Temperatura medie anuală este de 10°C în Pădurea Codrișor și 8,6°C în celelalte două biotopuri, iar media anuală a precipitațiilor oscilează între 485—718 mm.

Solul în Pădurea Codrișor este brun-gălbui, slab podzolit, cu textură nisipo-lutoasă, pH = 5; în Pădurea Dealul Târgului solul este

* Universitatea Babeș-Bolyai, Stațiunea de Cercetări Arctalia, 3400 Cluj-Napoca, România

** Palatul Copiilor, 4400 Bistrița, România

*** Liceul Agricol, 2400 Sibiu, România

eumezobazic, pH = 6,5, iar în Schullerwald este brun, argilo-aluvionar pseudogleizat, pH = 5,5.

Material și metodă. S-au folosit capcane Barber, câte 8 în fiecare biotop, amplasate perpendicular pe liziera pădurii, la o distanță de 10 m una de cealaltă, lichidul conservant fiind formol 4%. Colectarea s-a făcut lunar. În stațiunile din județ s-a folosit metoda pătratelor și frecvent colectarea clasică.

Rezultate și discuții. Rezultatele obținute privind numărul de exemplare colectate pe parcursul observațiilor sunt prezentate în Tabelul 1.

Se constată deosebiri atât în ce privește abundența indivizilor, cât și dinamica foarte variată de la un biotop la altul. Abundența maximă o prezintă populațiile din Pădurea Schullerwald cu 394 indivizi, urmați de Pădurea Codrișor cu 204 indivizi și Dealul Târgului cu numai 154 indivizi.

Dinamica populației variază astfel: în Pădurea Codrișor se înregistrează trei maxime în lunile iunie, octombrie și decembrie, în Pădurea Dealul Târgului un maxim în luna august, iar în Schullerwald trei maxime în lunile iunie, iulie și august. Dinamica populațiilor este corelată atât cu particularitățile structurale și de microclimat ale biotopurilor luate în studiu cât și cu biologia speciilor de Chilopode caracteristice zonei [1].

Din materialul colectat au fost determinați 700 indivizi, care aparțin la 4 familii, 7 genuri și 11 specii. Nu au putut fi determinați 52 de indivizi juvenili.

Din cele 11 specii determinate, 7 sunt comune în cele trei biotopuri, una o întâlnim doar în Dealul Târgului (*Lithobius tenebrosus*), o specie în Pădurea Codrișor (*Clinopodes flavidus*) și două specii sunt comune în Dealul Târgului și Pădurea Codrișor (*Strigamia acuminata* și *Strigamia crassipes*).

Biotopurile cercetate prezintă diversitate ecologică mică, însă oferă condiții favorabile unui număr mare de indivizi [4, 5].

În ce privește dominanța speciilor se constată că în Pădurea Codrișor specia *Lithobius forficatus* (88 indivizi) este eudominantă, două specii sunt dominante (*Strigamia crassipes* cu 28 indivizi și *Lithobius mutabilis* cu 36 indivizi), două specii sunt subdominante (*Strigamia*

Tabel 1

Variația numărului de Chilopode colectate pe parcursul anului

Biotopul	Lunile anului												
	I.	P.	M.	A.	M.	I.	I.	A.	S.	O.	N.	D.	Total
Pădurea Codrișor	6	4	5	7	10	32	12	26	20	30	21	31	204
Dealul Târgului	5	2	—	7	19	10	19	38	16	9	21	8	154
Pădurea Schullerwald	10	4	15	14	4	62	74	112	45	21	29	4	394
Total	21	10	20	28	33	104	105	176	81	60	71	43	752

Tabel 2

Lista speciilor de Chilopode identificate

Nr. crt.	Specia	Biotopul					
		Pădurea Codrișor		Dealul Târgului		Pădurea Schullerwald	
		Adulți	%	Adulți	%	Adulți	%
I. LITHOBIIDAE							
1.	<i>Lithobius muticus</i>	19	9,31	8	5,56	3	0,85
2.	<i>Lithobius mutabilis</i>	36	17,65	44	30,56	124	35,23
3.	<i>Lithobius forficatus</i>	88	43,14	65	45,14	193	56,25
4.	<i>Lithobius tenebrosus</i>	—	—	4	2,77	—	—
5.	<i>Lithobius maticii maticii</i>	1	0,49	14	9,72	12	3,42
6.	<i>Monotarsobius b. burzenlandicus</i>	9	4,41	8	5,56	10	2,84
II. GEOPHILIDAE							
7.	<i>Clinopodes flavidus</i>	2	0,98	—	—	—	—
8.	<i>Strigamia acuminata</i>	20	9,80	—	—	1	0,28
9.	<i>Strigamia crassipes</i>	28	13,73	—	—	1	0,28
III. MECISTOCEPHALIDAE							
10.	<i>Dicelophillus carniolensis</i>	1	0,49	1	0,69	1	0,28
IV. CRYPTOPIIDAE							
11.	<i>Cryptops hortensis</i>	—	—	—	—	2	0,57

acuminata cu 20 indivizi și *Lithobius muticus* cu 19 indivizi), o specie este sporadică și trei subsporadice. În Pădurea Dealul Târgului, două specii sunt eudominante (*Lithobius forficatus* cu 65 indivizi și *Lithobius mutabilis* cu 44 indivizi), trei specii sunt subdominante (*Lithobius m. maticii* cu 14 indivizi, *Lithobius muticus* cu 8 indivizi și *Monotarsobius b. burzenlandicus* cu 8 indivizi), o specie sporadică și una subsporadică. În Pădurea Schullerwald, din cele nouă specii determinate, două sunt eudominante (*Lithobius forficatus* cu 193 indivizi și *Lithobius mutabilis* cu 124 indivizi), două sunt sporadice și 5 subsporadice (Tabel 2).

Din analiza spectrului faunistic, pe familii, se constată diferențe de la un biotop la altul, cu atât mai mult cu cât în Pădurea Dealul Târgului nu a fost colectat nici un geofilid.

Din analiza raportului dintre sexe, la speciile abundente, se constată că în toate biotopurile predomină femelele, cu excepția speciei *Lithobius mutabilis* colectată din Pădurea Dealul Târgului, la care predomină masculii.

Pentru a cunoaște întregul fond de Chilopode din județ, cercetările noastre, efectuate în perioada 1981—1990, au dus la identificarea a 33 specii, număr ce reprezintă 53% din totalul speciilor din fauna țării (Tabel 3). În această listă sistematică sunt citate și 9 specii co-

Tabel 3

Lista sistematică a Chilopodelor colectate în județul Bistrița-Năsăud, în perioada 1981—1990

Nr. crt.	Familia — specia	Localitatea — stațiunea de colectare (nr. indivizi Masculi, Femele)
0	1	2
I. LITHOBIOMORPHIA 657 M. 687 F.		
1.	Harpolithobius a. anodus (Latz)	Pădurea Codrișor (1 M. și 2 F.), Cormaia (1 M. și 1 F.)
2.*	Harpolithobius radui Matic	Valea Vinului (—)
3.	Lithobius matici matici Prunescu	Pădurea Codrișor (2 M. și 1 F.), Pădurea Dealul Târgului (3 M. și 14 F.), Pădurea Schullerwald (3 M. și 9 F.)
4.	Lithobius forficatus L.	Pădurea Codrișor (93 M. și 124 F.), Pădurea Dealul Târgului (24 M. și 41 F.), Pădurea Schullerwald (95 M. și 103 F.), Valea Budacului (1 M. și 1 F.), Parva—Valea Bârlei (1 M. —), Pârâul Ranței (1 M. și 1 F.), Valea Gușetului (1 M. —), Vârful Derdelen (— 1 F.), Vârful Cișa (2 M. și 4 F.), Valea Vinului—Dealul Popii (15 M. și 7 F.), Sângeorz-Băi—Dealul Șapte Frați (1 M. și 1 F.), Cormaia (1 M. —), Parcul Dendrologic Arcalia (10 M. și 15 F.), Vârful Heniu Mare (— 1 F.), Vârful Muncelu—Bărgău (— 2 F.), Valea Blaznei (2 M. —), Pârâul Secii — Munții Bărgău (— 1 F.), Valea Strâjii (1 M. —)
5.	Lithobius silvivagus (Verh.)	Valea Gușetului (1 M. —), Pârâul Secii (— 2 F.)
6.	Lithobius melanops (Newp.)	Pădurea Codrișor (2 M. și 4 F.)
7.	Lithobius tenebrosum C. Koch	Valea Gușetului (3 M. —), Pârâul Zânei (1 M. —), Pârâul Mărului (2 M. și 1 F.), Pădurea Codrișor (— 1 F.), Beclean (— 1 F.), Pădurea Dealul Târgului (2 M. și 2 F.)
8.*	Lithobius luteus Løksa	Valea Vinului (—)
9.	Lithobius dentatus C. Koch	Pădurea Codrișor (2 M. și 2 F.)
10.	Lithobius erythrocephalus C. Koch	Pârâul Zânei (— 1 F.)
11.	Lithobius mutabilis C. Koch	Pădurea Schullerwald (53 M. și 71 F.), Sângeorz-Băi (1 M. și 2 F.), Valea Budacului (13 M. și 7 F.), Pădurea Codrișor (27 M. și 62 F.), Pădurea Dealul Târgului (27 M. și 17 F.), Parcul Dendrologic Arcalia (5 M. și 9 F.)
12.	Lithobius cryptopus Latzel	Pădurea Codrișor (— 2 F.), Vârful Cișa (1 M. —)
13.*	Lithobius latro Meinert	Valea Vinului (—), Colibița (—)
14.	Lithobius agilis C. Koch	Pădurea Codrișor (1 M. —)
15.	Lithobius pelidnus Haase	Valea Budacului (1 M. —)
16.	Lithobius muticus C. Koch	Pădurea Codrișor (21 M. și 49 F.), Valea Budacului (1 M. —), Pădurea Schullerwald (2 M. și 3 F.)
17.	Lithobius lucifagus C. Koch	Pădurea Codrișor (1 M. —)
18.	Lithobius lapidicola Meinert	Râpa Mare (Budacul de Sus) (1 M. și 2 F.)
19.*	Lithobius inexpectatus Matic	Valea Caselor—Năsăud (—)

* Specii citate în literatura de specialitate, dar necolectate în această perioadă.

Tabel 3 (continuare)

0	1	2
20.	<i>Monotarsobius aeruginosus</i> C. Koch	Pădurea Codrișor (8 M. și 4 F.)
21.	<i>Monotarsobius crassipes</i> C. Koch	Valea Strâjii (2 M. --)
22.	<i>Monotarsobius dudichi</i> Loksa	Valea Budacului (24 M. și 4 F.)
23.*	<i>Monotarsobius baloghi</i> Loksa	Sângeorz-Băi (—)
24.	<i>Monotarsobius duboscqui</i> Brolemann	Pârâul Zănei (1 M. --), Pârâul Mărului (1 M. --),
25.	<i>Monotarsobius burzenlandicus</i> Verh.	Pădurea Codrișor (140 M. și 89 F.), Pădurea Dealul Târgului (5 M. și 3 F.), Pădurea Schullerwald (8 M. și 2 F.), Parcul Dendrologic Arcalia (6 M. și 8 F.), Parva — Valea Bârlei (3 M. --), Pârâul Rânței (— 1 F.), Poiana Mărului (28 M. și 5 F.), Valea Vinului (3 M. și 2 F.), Vârful Heniu Mare (1 M. și 1 F.), Vârful Muncelu (1 M. --) II. GEOPHILOMORPHA 77 M. 144 F.
26.	<i>Schendyla nemorensis</i> C. Koch	Pădurea Codrișor (4 M. și 1 F.)
27.	<i>Dicelophylus carniolensis</i> C. Koch	Pădurea Codrișor (— 1 F.), Pădurea Schullerwald (— 1 F.), Pădurea Dealul Târgului (1 M. și 1 F.), Sângeorz-Băi (1 M. și 1 F.), Valea Vinului (1 M. și 1 F.)
28.	<i>Clinopodes flavidus</i> C. Koch	Pădurea Codrișor (3 M. și 1 F.)
29.*	<i>Clinopodes escherichi</i> Verh.	Sângeorz-Băi (—)
30.*	<i>Clinopodes rodnaensis</i> Verh.	Munții Rodnei—Valea Sacă—Valea Vinului (—)
31.	<i>Necrophloephus longicornis</i> Leach	Sărățel (— 1 F.)
32.	<i>Strigamia crassipes</i> C. Koch	Pădurea Codrișor (34 M. și 46 F.), Pădurea Schullerwald (1 M. --), Cormaia (1 M. --), Parcul Dendrologic Arcalia (3 M. și 6 F.), Valea Strâjii (2 M. --), Vârful Heniu Mic (— 1 F.)
33.	<i>Strigamia acuminata</i> Leach	Pădurea Codrișor (21 M. și 78 F.), Pădurea Schullerwald (— 1 F.), Pârâul Rânței (4 M. și 1 F.), Pârâul Zănei (— 1 F.), Vârful Derdeleu (1 M. --), Vârful Heniu Mare (— 2 F.)
34.*	<i>Pachymerium ferrugineum</i> C. Koch	Sângeorz-Băi (—)
35.*	<i>Pachymerium tristanicum</i> Attems	Sângeorz-Băi (—) III. SCOLOPENDROMORPHA 51 M. 0 F.
36.	<i>Cryptops parisi</i> Brolemann	Valea Bârlei (2 M. --), Pârâul Rânței (6 M. --), Pârâul Mărului (12 M. --), Valea Gușetului (1 M. --), Pârâul Zănei (16 M. --), Vârful Heniu Mare (1 M. --), Sângeorz-Băi (1 M. --)
37.	<i>Cryptops hortensis</i> Leach	Pădurea Codrișor (1 M. --), Valea Vinului (4 M. --), Cormaia (2 M. --), Sângeorz-Băi (1 M. --), Pădurea Schullerwald (2 M. --)
38.	<i>Cryptops rucneri</i> Matic	Râpa Mare—Budacul de Sus (2 M. --)

lectate de noi în anii anteriori [2, 3, 6], dar necapturate în această perioadă.

Astfel, au fost colectați 1616 indivizi, reprezentând 10 genuri și 38 de specii. Din totalul speciilor la 22 semnalăm noi stațiuni, iar 4 specii sunt citate pentru prima dată în fauna zonei cercetate: *Lithobius dentatus* C. Koch, *Lithobius lapidicola* Meinert, *Monotarsobius aeruginosus* C. Koch și *Cryptops rucneri* Matic.

Menționăm că specia *Cryptops rucneri* Matic, colectată din rezervația paleontologică Râpa Mare (Budacul de Sus), cunoscută numai din sera Grădinii Botanice din Cluj-Napoca, pare a fi o specie foarte rară, de un interes faunistic deosebit.

Concluzii. Au fost identificate în total 38 specii din care 25 aparțin familiei *Lithobiidae*, 10 familiei *Geophilidae* și 3 familiei *Cryptopidae*, dintre care, din punct de vedere zoogeografic, 13 specii sunt europene, 8 central-europene, 6 endemice, 4 paleartice, 3 holoartice, 3 carpatice și una vest-europeană.

Considerăm necesară continuarea acestor cercetări în cât mai multe stațiuni din județ, pentru o cunoaștere mai completă a spectrelor ecologice sistematice, cu atât mai mult cu cât grupul Chilopodelor prin modul de hrănire contribuie la combaterea și distrugerea omizilor defoliatoare, deci la menținerea echilibrului ecologic forestier.

BIBLIOGRAFIE

1. Geoffroy, I., Christophe, P., Garay, T., Geoffroy, J.-J., *Les Arachnides et Myriapodes prédateurs en forêt tempérée*, în *Actualités d'Ecologie forestière*, p. 477—506, Gauthier—Villars, Paris, 1980.
2. Matic, Z., *Fauna R.S.R., Clasă Chilopoda*, Vol. VI, Fasc. 1, p. 1—272, Ed. Acad. R.S.R., București, 1966.
3. Matic, Z., *Fauna R.S.R., Clasă Chilopoda*, Vol. VI, Fasc. 2, p. 1—220, Ed. Acad. R.S.R., București, 1972.
4. Matic, Z., *Cryptops rucneri* Matic (Chilopoda—Scolopendromorpha) — *une nouvelle espèce dans la faune de la Roumanie*, „Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Biol.”, 36 (1), 1991, 9—14.
5. Matic, Z., Floca, L. A., Hurezeanu, A., *Deux espèces nouvelles pour la science du genre Eupolybothrus Verhoeff (Lithobiomorpha: Ethopolinae)*, „Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Biol.”, 37 (1), 1992, 19—24.
6. Matic, Z., Hodoroga, A., *Studiul ecologic al populației de Chilopode (Chilopoda) din Pădurea Codrișor—Bistrița, jud. Bistrița-Năsăud*, „Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Biol.”, 30, 1985, 47—50.

DIPLOPODE DIN NORDUL MOLDOVEI (ZONA DORNELOR),
ROMÂNIA

(CHORDEUMATIDA — MASTIGOPHOROPHYLLIDAE).

Nota a II-a

TRAIAN CEUCA*, DELIA CRIȘAN* și LIUBOMIRA OLARU**

SUMMARY. — Diplopods from the North of Moldavia (Dorna Area), Romania (Chordeumatida — Mastigophorophyllidae), Note II, In this paper the authors describe a new species — *Mastigophorophyllon moldavicum*, a new subspecies — *Mastigophorophyllon serrulatum suhardense* and mention a summer species — *Mastigophorophyllon saronicum*, in the fauna of Romania. All these materials were collected in 1994.

Așa cum am arătat în prima notă (în care am menționat și stațiunile), o dată cu cercetările faunistice și ecologice efectuate în vara anului 1994 [4] asupra unor biocenoze din această zonă, au fost colectate, pe lângă alte artropode, și câteva diplopede, din care mai menționăm următoarele, încadrate în:

Ord. CHORDEUMATIDA

Fam. Mastigophorophyllidae

Mastigophorophyllon moldavicum n. sp.

Lungimea = 12.5 mm, iar lățimea = 1.5 mm. Culoarea corpului este cenușie-brună-gălbuie, marmorată. Corpul cu cele 30 de segmente are la cap oceli în număr de 18—20, ocupând câte un câmp triunghiular situat de fiecare parte a lui. Cele trei perechi de macrochete, de dimensiuni mijlocii, sunt situate, ca de regulă, pe expansiunile laterale ale metazonitelor relativ slab dezvoltate. La masculi, perechile a treia și până la a 7-a de picioare sunt, ca de obicei, evident mai îngroșate decât restul picioarelor ambulatorie. Perechile a 8-a și a 9-a sunt prevăzute cu câte o prelungire coxală.

Gonopodele anterioare (Fig. 1) au aspectul obișnuit de frunze late, fiind în treimea lor distală, oblic tăiate, cu vârfurile curbate posterior; acestea, de obicei, sunt lățite și fin striate. Supraterminal au câte un pinten mic, ascuțit, evident, iar subterminal un alt pinten rotunjit. Ca de regulă, pseudoflagelii ascunși străbat întregile telopodite gonopodiale, până în vârfurile lor. Lobulii mediali sunt foarte ascuțiți. Ramurile plumiforme, de pe fețele posterioare ale telopoditelor, au, de obicei, un aspect lamelar cu foarte fine ramificații dispuse în același plan; uneori aceste ramificații sunt mai libere. Ca de regulă, pseudofla-

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

** Muzeul Științelor Naturii, 3975 Vatra Dornei, jud. Suceava, România

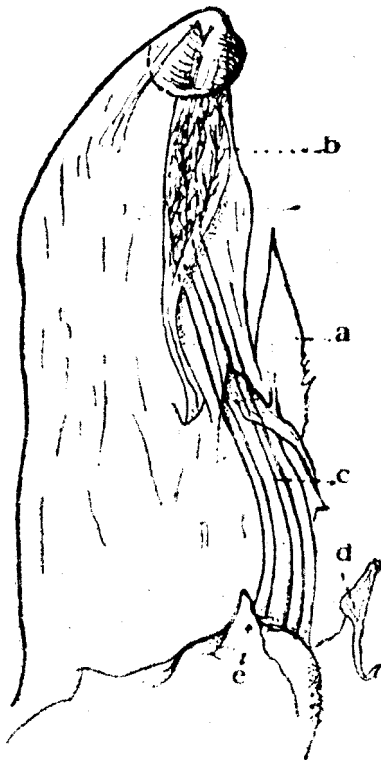


Fig. 1. *Mastigophorophyllon moldavicum* n. sp. Gonopodul anterior, drept, văzut posterior. a — Lobul medial. b — Ramura plumiformă. c — Pseudoflagelul ascuns. d — Pseudoflagelul liber. e — Pinteul coxal.

geli liberi sunt scurți, iar pinteii coxali, de pe fețele posterioare, bazale ale acestor gonopode, sunt evident ascuțiți. Și aici, ca la toate speciile subgenului *Paramastigophorophyllon* [2], pe părțile posterioare, în jumătatea lor bazală, a acestor telopodite există câte o zonă fin „păroasă“.

Gonopodele posterioare (Fig. 2) sunt, ca de obicei, mai scurte, având telopoditele (ramurile externe) curbate brusc medial, peste ramurile interne. Pe vârfurile lor se găsesc grupuri de bastonașe (țepi) doar spre capătul distal, fiind orientate bazal. Ramurile interne ale acestor gonopode sunt scurte și lățite, având câte o prelungire hialină cu foarte mici ramificații, orientate, de regulă, medial, sau mai mult sau mai puțin oblic, cu o morfologie ușor diferită. Pe părțile posterioare ale ramurilor interne există câteva bastonașe (care pot varia ca număr și dispoziție) și câteva sete lungi în apropierea originii ramurilor externe. Cei doi pseudoflageli liberi ai sincoxitului gonopodial sunt normal dezvoltati, dar la care se poate menționa prezența unor țepi mici, situați la începutul curburii lor (aspect destul de rar, întâlnit doar la unele specii). Ca de regulă, ♀ este cu puțin mai mare decât ♂ și cu perechea a 2-a pe picioare redusă la numai două articole.

Proveniență: au fost colectați 16 ♂♂ + 8 ♀♀ din stațiunile Zugreni, Crucea și de pe Muntele Suhard (leg. L. Olaru. VIII—IX.1994).

Dintre cele 9 specii ale genului *Mastigiphorophyllon* din țara noastră, *M. moldavicum* n. sp. se pare că ar avea oarecari asemănări cu *M. saxonicum* Verh. 1910, de care se deosebește totuși clar, prin vârfurile telopoditelor gonopodelor anterioare, precum și prin aspec-

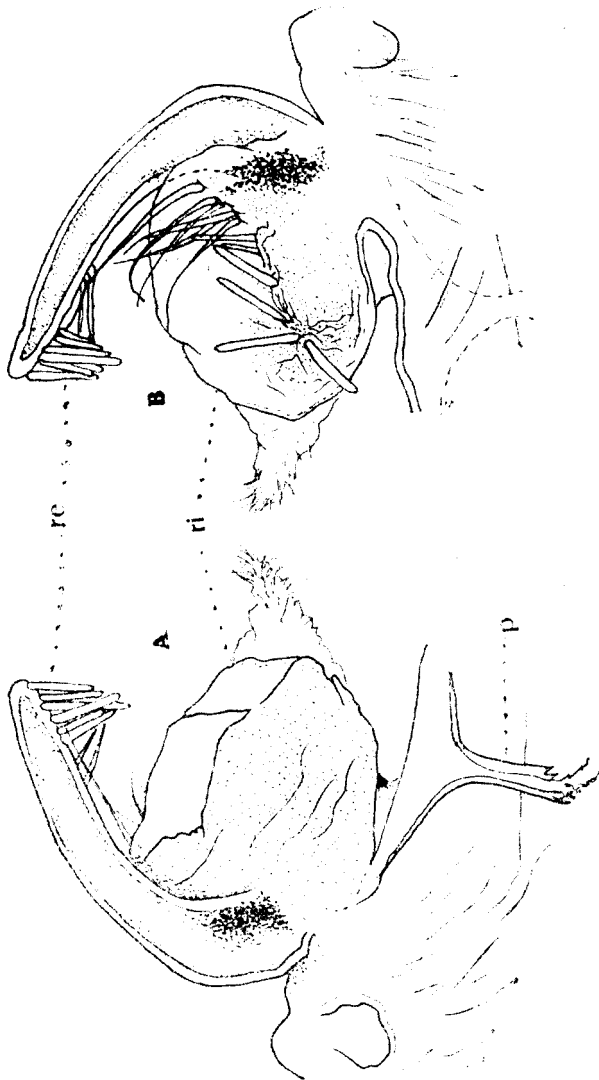


Fig. 2. *Mastigiphorophyllon moldavicum* n. sp. Gonopodul posterior drept, văzut anterior (A) și văzut posterior (B).
re — Ramura externă, ri — Ramura internă, p — Flagelul liber.

tul ramurilor plumiforme; în aceeași măsură se deosebesc și aspectele gonopodelor posterioare, în ceea ce privește lungimea ramurilor externe, precum și forma ramurilor interne și a prelungirilor hialine ale acestora.

Mastigophorophyllon serrulatum suhardense n. ssp.

Lungimea = 15 mm, iar lățimea = 1,5 mm. Cele 30 de segmente ale corpului, ca de obicei, sunt de culoare brună, mai mult sau mai puțin intensă, cu două benzi laterale, mai deschise și cu una mediană mai îngustă. Expansiunile laterale de pe metazonite, slab dezvoltate, ca niște mici umflături, pe care sunt situate cele trei perechi de macrochete evidente. Capul are ebrajii proeminenți lateral, încât se văd bine priviți de pe partea dorsală. Ocelii în număr de 18—21, situați în câte un câmp triunghiular, de fiecare latură a capului.

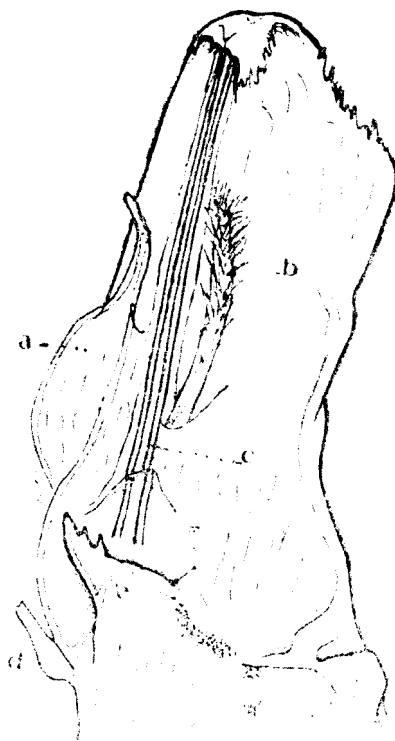
La masculi, perechea a treia și până la a 7-a de picioare au, ca de obicei, articolele evident mai groase decât următoarele perechi. Perechea a 8-a este prevăzută, pe coxe, cu mici proeminențe, iar perechea a 9-a este și ea prevăzută cu câte un mic cornuleț coxal, îndreptat fiecare, medial.

Gonopodele anterioare (Fig. 3) au aproape aceeași lățime pe tot parcursul lor. Pseudoflagelii ascunși, ca la toate speciile genului, străbat telopoditele gonopodiale până în zona apicală a acestora. Lobulii mediali sunt, în jumătatea lor distală, cilindrici cu vârful ușor curbat medial, iar în partea bazală sunt lipsiți de perișori. Ramurile plumiforme, de pe fețele posterioare, sunt mai bogat ramificate doar în jumătatea lor distală, având un aspect mai mult de pensulă decât de „pană”, ajungând doar până la nivelul lobulilor mediali. Pseudoflagelii liberi, ca de regulă, sunt scurți și tubulari, iar pintenii coxali, de pe aceeași parte sunt deosebit de dezvoltați, fiind prevăzuți cu mici creste, aspect puțin obișnuit. Pe fețele anterioare ale telopoditelor gonopodiale, în regiunile lor bazale, sunt prevăzute cu zone fin „păroase”, ca la toate speciile subgenului *Paramastigophorophyllon* [2] și care se întind până în zonele lobulilor mediali.

Gonopodele posterioare (Fig. 4) se caracterizează prin telopoditele (ramurile externe) lungi, foarte curbate, în sens postero-medial, fiind acoperite pe cca 2/3 din lungimile lor, cu bastonașe (țepi) dese, mai cu seamă pe laturile concave ale lor. Ramurile interne ale acestor gonopode au forme ovale, de pe care se desprinde oblic-medial câte o formațiune hialină, scurtă, cu mici ramificații terminale, de sub care proeminează marginile mediale ale acestor ramuri. De pe părțile posterioare ale acestora se desprinde câte un grup, puțin numeros, de bastonașe, dintre care unele, din apropierea ramurilor externe, au aspect de sete (Fig. 4, B). Cei doi pseudoflageli ai sincoxitului gonopodial sunt bine dezvoltați.

Femela, ca de regulă, este ușor mai mare decât masculul, având perechea a doua de picioare formată doar din două articole reduse.

Fig. 3. *Mastigophorophyllon serrulatum suhardense* n. ssp. Gonopodul anterior stâng, văzut posterior.
 a — Lobul medial, b — Ramura plumiformă.
 c — Pseudoflagelul ascuns, d — Pseudoflagelul liber, e — Pinterul coxal.



Atât prin aspectul gonopodelor anterioare, cât și prin cel al celor posterioare, noua subspecie se încadrează bine în specia *Mastigophorophyllon serrulatum* Attems, 1926, respectiv subspeciea nominată (*M.s. serrulatum*), endemică la noi, semnalată de pe Rarău și Călimani, având în același timp afinități și cu *M.s. apiculatum* Jawlowski, 1935, menționată din Ucraina Carpatică (Czarnohory). În ansamblu, gonopodele anterioare ale celor trei subspecii au un aspect relativ asemănător (excepție făcând prezența unor „perișori“ fini de la baza lobulilor mediali numai la subspeciea nominată) și lungimea neobișnuită! a ramurei plumiforme numai la subspeciea *M.s. apiculatum* [5]*.

Referitor la gonopodele posterioare, aici se poate observa că ramurile externe, evident cele mai lungi și curbate posterior, depășind ramurile late interne, le are noua subspecie *M.s. suhardense*; la subspeciea nominată *M.s. serrulatum*, ramurile externe sunt lungi, tot curbate (dar medial) și nu depășesc ramurile interne, care aici au aspect conic; în schimb, ramurile externe la subspeciea *M.s. apiculatum* sunt, evident, mult mai scurte, depășind cu foarte puțin ramurile interne, care au o formă aproape patrată.

* Caracteristicile ssp. *M.s. apiculatum* au fost luate din figurile date de Stojanowska [5], după Jawlowski.

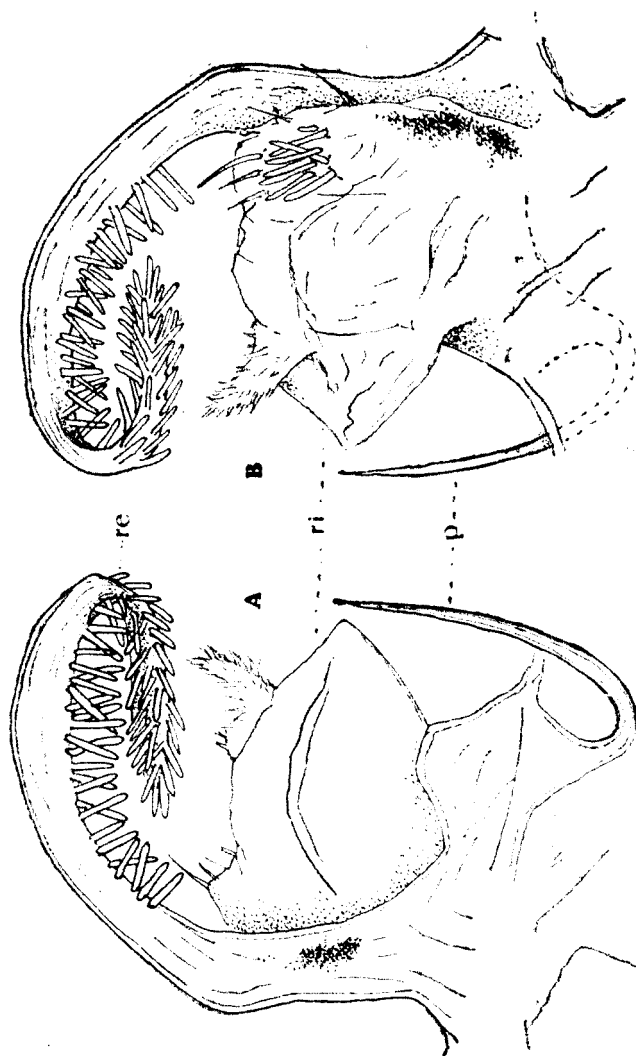


Fig. 4. *Mastigophorophyllon serrulatum suhardense* n. ssp. Gonopodul posterior stâng, văzut anterior (A) și văzut posterior (B).

ri — Ramura internă.
re — Ramura externă.
p — Flagelul liber.

Proveniența: au fost colectați 2 ♂♂ + 1 ♀ de pe Muntele Suhard (leg. L. Olaru, 25.VIII.1994).

Mastigophorophyllon saxonicum Verhoeff, 1910

Este cea mai răspândită specie din întreg genul [1] și ocupă un areal ce se întinde din Germania, până în Ucraina, inclusiv la noi: Munții Rarău, Pădurea Slătioara, stațiunile Băișoara și Belis din Munții Apuseni [3].

Proveniența: a fost colectat 1 ♂ de la Vatra Dornei (leg. L. Olaru, VIII.1994).

BIBLIOGRAFIE

1. Ceuca, T., *Cîteva Diplopoide noi in fauna R.P.R.*, „Stud. Univ. Babeş-Bolyai, Biol.”, 9 (2), 1964, 89—92.
2. Ceuca, T., *Genul Mastigophorophyllon Verh. 1897* (Diplopoda—AscospERMOPHORA). „Stud. Univ. Babeş-Bolyai, Biol.”, 21 (2), 1976, 37—43.
3. Ceuca, T., *Mastigophorophyllon saxonicum Verh. 1910 in Munţii Apuseni*, „Stud. Univ. Babeş-Bolyai, Biol.”, 37 (2), 1992, 29—32.
4. Ceuca, T., Olaru, I., Crişan, D., *Diplopoide din zona Dornelor. Nota I*, „Anuar. Muz. Naţl. Bucovinei”, 14 (Ştiinţe Nat.) (sub tipar).
5. Sţojalowska, W., *Kracjonogí* (Diplopoda) *Polski*, p. 84—99, Pol. Akad., Warszawa, 1961.

The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions. It emphasizes that every entry should be supported by a valid receipt or invoice. This ensures transparency and allows for easy verification of the data.

In the second section, the author outlines the various methods used to collect and analyze the data. This includes both primary and secondary data collection techniques. The analysis focuses on identifying trends and patterns over time, which is crucial for making informed decisions.

The third part of the document provides a detailed breakdown of the results. It shows that there has been a significant increase in sales volume, particularly in the online channel. This is attributed to the implementation of the new marketing strategy and the improved user experience on the website.

Finally, the document concludes with a set of recommendations for future actions. It suggests continuing to invest in digital marketing and exploring new product lines to further drive growth. Regular monitoring and reporting will be essential to track the success of these initiatives.

RESEARCHES ON CHRYSOMELIDAE (COLEOPTERA) FAUNA IN „CHEILE TURULUI“ IN 1995

ALEXANDRU CRIȘAN* and LUCIAN TEODOR*

SUMMARY. — Researches performed in „Cheile Turului“ in 1995 provided evidence of 89 species of *Chrysomelidae* living in this area. A taxonomical list is presented and some ecological aspects on this group are discussed.

Previous data on *Chrysomelidae* (Coleoptera) fauna in Romania are few, the majority from the first half of our century, in papers concerning mostly a large number of *Coleoptera* families or more orders of Insects [2, 9—12, 15, 17—21, 23—25, 27, 29, 30, 32]. In the last years we undertook a series of investigations on *Chrysomelidae* family in the „Danube Delta Biosphere Reserve“ area and also in some areas of Transylvania [3—7]. The present paper is dedicated to these studies.

Materials and methods. Catches of leaf beetles (*Chrysomelidae*) were made during the summer of 1995 in the „Cheile Turului“ (the Tur gorge, about 20 km south of Cluj-Napoca, Romania) area, using an insect net. The insects killed in 75% alcohol were kept dry. Samples were taken separately in three biotopes: the valley, the right side and the left side of the gorge. The identification of the insects was made in the laboratory using various reference sources [1, 8, 13, 14, 16, 22, 26, 28, 31, 33].

Results and discussion. The leaf beetles (*Chrysomelidae*) caught and identified are listed in Table 1, in which some ecological data are also presented. We identified in all 89 species of *Chrysomelidae* in the „Cheile Turului“ area, belonging to 10 subfamilies.

The best represented subfamily was *Halticinae*, both in the number of species (24) and individuals (197) caught and identified. The subfamilies *Cryptocephalinae* and *Chrysomelinae* as well as *Cassidinae* and *Clytrinae* were also well represented, while *Donaciinae*, *Criocerinae*, *Lamprosominae*, *Eumolpinae* and *Galerucinae* had a scarce representation.

The data about the caught period show that some species had a long fly period and some others a short one. The abundance was variable, depending on species, subfamily and date of capture. The biotope conditions in which every species was captured correspond generally to the known demanded conditions of each subfamily, as we characterized these conditions for each of the 10 subfamilies investigated.

* Babes-Bolyai University, Department of Zoology, 3409 Cluj-Napoca, Romania

Table 1

Taxonomical list of leaf beetles (*Coleoptera: Chrysomelidae*) caught in the „Cheile Turului” area in 1995

Crt. no.	Subfamily Species	Date of capture	No. ind.	Abundance		Biotope in the gorge
				%	r.	
0	1	2	3	4	5	6
I. <i>DONACIINAE</i> : Includes species with biology relied on aquatic environment						
1.	<i>Donacia biocolor</i> Zschach.	6 VI	1	0.11	R	v., h.
2.	<i>Plateumaris (Iuliusiana) braccata</i> (Scop.)	6 VI	6	0.70	r.C	v., h.
II. <i>CRIOCERINAE</i> : Includes species preferring mesophilous herbs or crops						
3.	<i>Lema lichenis</i> Voet.	6 VI	1	0.11	R	v., h.
		1 V	1	0.11		v., h.
4.	<i>Lema tristis</i> Hbst.	1 V	1	0.11	R	v., h.
5.	<i>Lema melanopus</i> (L.)	1 V	18	2.10	C	v., h.
		17 VI	1	0.11		rt.s., h.
		17 VI	43	5.00		v., h.
		17 VI	7	0.81		lt.s., h.
		6 VI	1	0.11		lt.s., h.
		6 VI	24	2.80		v., h.
		25 VII	35	4.06		v., h.
III. <i>CLYTRINAE</i> : Most species live on mesophilous and meso-xerophilous shrubs or on herbs in the same ecological areas						
6.	<i>Labidostomis longimana</i> (L.)	17 VI	1	0.11	R	lt.s., h.
7.	<i>Labidostomis humeralis</i> Schneid.	6 VI	1	0.11	R	v., h.
8.	<i>Labidostomis pallidipennis</i> (Gebler)	17 VI	1	0.11	R	lt.s., t.
		17 VI	3	0.35		v., t.
9.	<i>Clytra quadripunctata</i> (L.)	6 VI	4	0.46	r.C	v., t.
		17 VI	2	0.23		v., t.
10.	<i>Clytra appendicina</i> Lac.	6 VI	3	0.35	R	v., h.
		6 VI	1	0.11		lt.s., t.
11.	<i>Clytra laeviscula</i> Ratz	17 VI	1	0.11	r.C	lt.s., t.
		17 VI	6	0.70		v., h.
		25 VII	1	0.11		v., t.
12.	<i>Gynandrophthalma cyanea</i> (F.)	17 VI	1	0.11	R	v., t.
13.	<i>Gynandrophthalma aurita</i> (L.)	6 VI	1	0.11	r.C	v., t.
		17 VI	1	0.11		v., t.
		17 VI	7	0.80		lt.s., t.
14.	<i>Coptocephala unifasciata</i> (Scop.)	25 VII	1	0.11	R	lt.s., h.
IV. <i>CRYPTOCEPHALINAE</i> : Species preferring meso-xerophilous or xerophilous areas, living on shrubs or herbs						
15.	<i>Pachybrachys sinuatus</i> Muls. et Rey	6 VI	1	0.11	R	v., t.
		17 VI	4	0.46		v., t.
16.	<i>Pachybrachys hippophaëus</i> Suff.	6 VI	1	0.11	R	v., t.
		17 VI	2	0.23		v., t.
		25 VII	1	0.11		v., t.
17.	<i>Pachybrachys tessellatus</i> (Oliv.)	6 VI	1	0.11	R	lt.s., t.
18.	<i>Cryptocephalus quereeti</i> Suff.	17 VI	1	0.11	R	v., t.

Table 1 (continued)

0	1	2	3	4	5	6
19.	<i>Cryptocephalus sericeus</i> L.	6 VI 17 VI 25 VII	11 8 7	1.27 0.94 0.80	C	lt.s., h. lt.s., h. lt.s., h.
20.	<i>Cryptocephalus bipunctatus</i> (L.)	6 VI 17 VI 17 VI	5 4 1	0.58 0.46 0.11	r.C	lt.s., h. lt.s., h. v., h.
21.	<i>Cryptocephalus violaceus</i> Laich.	6 VI	1	0.11	R	v., h.
22.	<i>Cryptocephalus distinguendus</i> Schneid.	6 VI 17 VI	1 1	0.11 0.11	R	lt.s., h. lt.s., h.
23.	<i>Cryptocephalus moraei</i> (L.)	6 VI 17 VI 17 VI 25 VII	2 2 1 3	0.23 0.23 0.11 0.35	r.C	lt.s., h. lt.s., h. v., h. lt.s., h.
24.	<i>Cryptocephalus carpathicus</i> Priv.	6 VI	1	0.11	R	lt.s., h.
25.	<i>Cryptocephalus vittatus</i> F.	6 VI	1	0.11	R	lt.s., h.
26.	<i>Cryptocephalus ocellatus</i> Drap.	25 VII	1	0.11	R	v., h.
27.	<i>Cryptocephalus connexus</i> Ol.	25 VII	1	0.11	R	lt.s., h.
V. <i>LAMPROSOMINAE</i> : A single species in Europe; it lives on mesophilous herbs						
28.	<i>Lamprosoma concolor</i> Sturm.	25 VII	1	0.11	R	v., h.
VI. <i>EUMOLPINAE</i> : Species living on mesophilous herbs						
29.	<i>Chrysochus asclepiadeus</i> (Pall.)	25 VII	1	0.11	R	v., h.
30.	<i>Paenephorus villosus</i> Duft.	6 VI	1	0.11	R	v., h.
VII. <i>CHRYSOMELINAE</i> : Species living on meso-hygrophilous and hygrophilous herbs, trees or shrubs						
31.	<i>Timarcha rugulosa</i> H. Schaeff.	17 VI	1	0.11	R	v., h.
32.	<i>Timarcha pratensis</i> (Duft.)	1 V	1	0.11	R	v., h.
33.	<i>Timarcha goettingensis</i> L.	31 VIII	1	0.11	R	v., h.
34.	<i>Leptinotarsa decemlineata</i> Say	6 VI 17 VI	1 1	0.11 0.11	R	v., h. v., h.
35.	<i>Diochrysa fastuosa</i> (Scop.)	1 V 6 VI 17 VI 25 VII	15 24 24 3	1.63 2.90 2.90 0.35	C	v., h. v., h. v., h. v., h.
37.	<i>Chrysemela carnifex</i> F.	6 VI	1	0.11	R	rt.s., h.
36.	<i>Chrysemela diversipes</i> Bed.	1 V	1	0.11	R	v., h.
38.	<i>Chrysemela herbacea</i> v. <i>methastri</i> Suff.	1 V 6 VI 17 VI 25 VII	1 46 46 6	0.11 5.35 5.35 0.75	C	v., h. v., h. v., h. v., h.
39.	<i>Chrysemela herbacea</i> f. <i>typica</i> Duft.	6 VI 17 VI 25 VII	50 15 6	5.81 1.70 0.70		v., h. v., h. v., h.
40.	<i>Chrysemela cerealis</i> L.	1 V	3	0.35	R	v., h.
41.	<i>Chrysemela marginata</i> L.	1 V	1	0.11	R	v., h.
42.	<i>Chrysemela polita</i> L.	6 VI 17 VI 25 VI	3 2 1	0.35 0.23 0.11	r.C	v., h. v., h. v., h.
43.	<i>Chrysemela graminis</i> L.	1 V 6 VI 25 VII	4 3 5	0.47 0.35 0.58	r.C	v., h. v., h. v., h.

Table 1 (continued)

0	1	2	3	4	5	6
44.	<i>Chrysomela coeruleans</i> Scriba	6 VI 17 VI	1 1	0.11 0.11	R	v., h. v., h.
45.	<i>Chrysomela staphylea</i> L.	6 VI 17 VI	1 1	0.11 0.11	R	v., h. v., h.
46.	<i>Chrysomela coerulea</i> Ol.	6 VI 25 VII	1 2	0.11 0.23	R	v., h. v., h.
47.	<i>Melasoma (Macrolina) vigintipunctata</i> (Scop.)	1 V 6 VI 17 VI	1 3 2	0.11 0.35 0.23	r.C	v., t. v., t. v., t.
48.	<i>Gastroidea viridula</i> (Deg.)	17 VI 25 VII	3 1	0.35 0.11	R	v., h. v., h.
49.	<i>Gastroidea polygoni</i> (L.)	1 V	4	0.46	R	v., h.
50.	<i>Plagiodera versicolora</i> (Laich.)	17 VI	2	0.23	R	v., t.
51.	<i>Colaphellus sophiae</i> (Schall.)	1 V 6 VI 17 VI	9 3 14	1.05 0.35 1.63	C	v., h. v., h. v., h.
52.	<i>Phyllodecta vitellinae</i> (L.)	6 VI	1	0.11	R	v., t.
VIII. GALERUCINAE: Species living on mesophilous shrubs, trees or herbs						
53.	<i>Galeruca interrupta</i> Oliv., ssp. <i>circumdata</i> Duft.	6 VI 17 VI	2 1	0.23 0.11	R	v., h. lt.s., h.
54.	<i>Galeruca tauaceti</i> (L.)	17 VI	2	0.23	R	v., h.
IX. HALTICINAE: Species living mostly on mesophilous to xerophilous herbs and grasses						
55.	<i>Phylloreta nemorum</i> L.	1 V	1	0.11	R	v., h.
56.	<i>Aphthona venustula</i> Kutsch.	1 V 6 VI	4 5	0.46 0.58	r.C	v., h. rt.s., h.
57.	<i>Aphthona nigrescutis</i> Foud.	6 VI 17 VI 25 VII	5 7 2	0.70 0.80 0.23	r.C	lt.s., h. lt.s., h. lt.s., h.
58.	<i>Aphthona lacertosa</i> (Rosh.)	6 VI 17 VI 17 VI 25 VII	11 1 2 2	1.25 0.11 0.23 0.23	r.C	lt.s., h. lt.s., h. v., h. lt.s., h.
59.	<i>Aphthona herbigrada</i> (Curtis)	25 VII	58	6.74	C	lt.s., h.
60.	<i>Longitarsus lateripunctatus</i> (Rosh.)	6 VI	1	0.11	R	rt.s., h.
61.	<i>Longitarsus ballotae</i> Muell.	1 V	2	0.23	R	v., h.
62.	<i>Longitarsus tabidus</i> (F.)	17 VI 25 VII	1 35	0.11 4.06	C	lt.s., h. lt.s., h.
63.	<i>Longitarsus foudraei</i> Ws.	17 VI 25 VII	1 1	0.11 0.11	R	lt.s., h. v., h.
64.	<i>Longitarsus lycopi</i> (Foud.)	17 VI	2	0.23	R	lt.s., h.
65.	<i>Longitarsus rubiginosus</i> (Foud.)	17 VI	1	0.11	R	v., h.
66.	<i>Longitarsus succineus</i> (Foud.)	17 VI	1	0.11	R	v., h.
67.	<i>Haltica oleracea</i> (L.)	1 V 17 VI	1 1	0.11 0.11	R	v., h. v., h.
68.	<i>Crepidodera ferruginea</i> (Scop.)	17 VI 6 VI	5 6	0.58 0.70	r.C	v., h. v., h.
69.	<i>Crepidodera transversa</i> (Marsh.)	6 VI	4	0.46	R	v., h.

Table 1 (continued)

0	1	2	3	4	5	6
70.	<i>Crepidodera transsylvanica</i> Fuss	6 VI	1	0.11	R	v., h.
71.	<i>Chalcoides plutus</i> (Latr.)	17 VI	1	0.11	R	v., t.
72.	<i>Chalcoides aurata</i> (Marsh.)	1 V	7	0.80	r.C	v., t.
		6 VI	3	0.35		v., t.
		17 VI	1	0.11		v., t.
73.	<i>Podagrica fuscicornis</i> L.	6 VI	1	0.11	R	v., h.
74.	<i>Chaetocnema (Tlanoma) concinna</i> (Marsh.)	1 V	9	1.05	r.C	v., h.
75.	<i>Chaetocnema (Tlanoma) tibialis</i> Ill.	1 V	1	0.11	R	v., h.
76.	<i>Psylliodes attenuata</i> (Koch)	1 V	1	0.11	R	v., h.
		6 VI	1	0.11		v., h.
77.	<i>Psylliodes dulcamarae</i> (Koch)	17 VI	1	0.11	R	v., h.
78.	<i>Psylliodes calcomera</i> Ill.	1 V	1	0.11	R	v., h.
		6 VI	4	0.46		v., h.
79.	<i>Psylliodes chrysocephala</i> (L.)	6 VI	4	0.46	R	lt.s., h.
X. CASSIDINAE: Species of mesophilous areas, living on herbs, weeds or crops						
80.	<i>Hypocassida subferruginea</i> Schr.	6 VI	1	0.11	R	v., h.
		6 VI	1	0.11		lt.s., h.
81.	<i>Cassida (Odontonychia) viridis</i> L.	6 VI	21	2.44	C	v., h.
		1 V	2	0.23		v., h.
		17 VI	14	1.63		v., h.
		17 VII	1	0.11		rt.s., h.
		25 VII	27	3.14		v., h.
82.	<i>Cassida rubiginosa</i> Muell	1 V	4	0.46	r.C	v., h.
		6 VI	8	0.93		v., h.
		17 VI	3	0.35		v., h.
		25 VII	4	0.46		v., h.
83.	<i>Cassida betulinensis</i> Suff.	17 VI	4	0.46	R	v., h.
84.	<i>Cassida denticolis</i> Suff.	17 VI	2	0.23	R	lt.s., h.
85.	<i>Cassida nebulosa</i> L.	6 VI	1	0.11	R	v., h.
86.	<i>Cassida (Cassidulla) nobilis</i> L.	1 V	1	0.11	R	v., h.
		6 VI	4	0.46		v., h.
87.	<i>Cassida vibex</i> L.	1 V	1	0.11	R	v., h.
		6 VI	1	0.11		v., h.
88.	<i>Cassida flaveola</i> Thunb.	6 VI	4	0.46	R	v., h.
89.	<i>Cassida prasina</i> Ill.	6 VI	1	0.11	R	lt.s., h.
		17 VI	1	0.11		v., h.
		25 VII	1	0.11		lt.s., h.

Notes: Crt. no. — Current number. No. ind. — Number of individuals. r. — Relative. v. — Valley. h. — Herbs. t. — Trees and shrubs. rt. s. — The right side of the gorge. lt. s. — The left side of the gorge. C — Common. R — Rare.

Conclusions. *Chrysomelidae* fauna in „Cheile Turului“ is rich and variable, corresponding to the high variety of the conditions of microhabitats of this area. The degree of representation of each subfamily both in number of species and individuals was influenced by the ecological valencies of each species and by the presence and degree of representation of the plant species constituting their food. The high variety of *Chrysomelidae* in „Cheile Turului“ as well as of other groups of animals and plants justifies us to propose this area for ecological protection.

REFERENCES

1. Calwer, C. G., Käferbuch, Naturgeschichte der Käfer Europas, pp. 632—678, Kraus und Hoffman, Stuttgart, 1858.
2. Cosmovici, C. L., Contributions à l'étude de la faune entomologique de la Roumanie, „Ann. Sci. Univ. Jassy”, 1, 1901, 239—255.
3. Crișan, A., Date asupra familiei Chrysomelidae (Coleoptera), in partea sudică a Deltei Dunării, „An. Științ. Inst. „Delta Dunării”, Tulcea”, 1993, 67—74.
4. Crișan, A., Cercetări faunistice și ecologice asupra familiei Chrysomelidae (Coleoptera) in Cheile Turzii, in 1992, „Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Biol.”, 38 (1—2), 1993, 59—67.
5. Crișan, A., Noi date asupra familiei Chrysomelidae (Coleoptera) in Rezervația Biosferei „Delta Dunării”, „An. Științ. Inst. „Delta Dunării”, Tulcea”, 1994, 159—166.
6. Crișan, A., Cercetări asupra familiei Chrysomelidae (Coleoptera) in zona Rezervației Biosferei „Delta Dunării”, cu referire specială la *Stylosomus tamaricis* H. Schaeff. și *Cryptocephalus gamma* H. Schaeff., „Bul. Inf. Soc. Lepidopterol. Rom.”, 6 (1—2), 1995, 145—149.
7. Crișan, A., Cercetări faunistice asupra familiei Chrysomelidae (Coleoptera) in zona maritimă a Rezervației Biosferei „Delta Dunării”, „An. Științ. Inst. „Delta Dunării”, Tulcea”, 1995 (in press).
8. Freude, H., Harde, K. W., Lohse, C. A., Die Käfer Mitteleuropas, B. 9, Cerambycidae, Chrysomelidae, pp. 95—299, Goecke und Evers—Krefeld, Zürich, 1966.
9. Hurmuzachi, C., Troisième catalogue des coléoptères recoltés par les membres de la société des naturalistes de Roumanie, „Bull. Soc. Sci. Roum.”, 13 (1—2), 1904, 51—65.
10. Ieniștea, M. A., L'entomofaune de Pile Letea (Delta du Danube), ord. Coleoptera (pars), „Trav. Mus. Hist. Nat. „Gr. Antipa””, 9, 1968, 81—93.
11. Ieniștea, M. A., Contributions à la connaissance des coléoptères du Delta du Danube (Le „grind” Caraorman), „Trav. Mus. Hist. Nat. „Gr. Antipa””, 14, 1974, 239—249.
12. Ieniștea, M. A., Negru, Ș., Seria monografică „Porțile de Fier”, Coleoptera, pp. 193—214, Ed. Acad. Rom., București, 1975.
13. Kaszab, Z., Beiträge zur Kenntnis der Chrysomeliden-Fauna des Karpatenbeckens nebst Beschreibung neuer Formen (Coleoptera), „Folia Entomol. Hung.”, 15, (3), 1962, 25—93.
14. Kaszab, Z., Magyarország állatvilága, Bogarak, IV/B (Fauna Hungarica, Coleoptera IV/B), Akad. Kiadó, Budapest, 1962—1971.
15. Konnerth-Ionescu, A., Halticinae recorded from Romania till 1961, „Trav. Mus. Hist. Nat. „Gr. Antipa””, 4, 1963, 251—267.
16. Kunt, P., Illustrierte Bestimmungs-Tabellen der Käfer Deutschlands, pp. 800—894, Schweizerbart, Stuttgart, 1912.
17. Marcu, O., Neue Coleopteren aus der Bucovina, „Bul. Fac. Științe, Cernăuți”, 1 (2), 1927, 413—423.
18. Marcu, O., Beiträge zur Coleopterenfauna der Bucovina, „Bull. Sci. Șc. Polytech., Timișoara”, 1928, 4—11.
19. Marcu, O., Neue Coleopterenfunde aus der Bucovina, „Bull. Sect. Sci. Acad. Roum.”, 1928, 1—12.
20. Marcu, O., Coleopterenfunde aus der Bucovina, „Bull. Sect. Sci. Acad. Roum.”, 16, 1936, 4—6.
21. Marcu, O., Contribuții la cunoașterea faunei coleopterelor Transilvaniei, „Bul. Univ. „N. Babeș” și „J. Bolyai”, Ser. Științe Nat.”, 1 (1—2), 1957, 527—544.
22. Mohr, K. H., Beiträge zur Insektenfauna der DDR: Coleoptera—Chrysomelidae, „Beitr. Entomol.” (Berlin), 27 (2), 1977, 197—231.
23. Montandon, A., Excursions en Doubroudja, „Bull. Soc. Étud. Sci., Angers”, 16, 1887, 31—64.

24. Negru, Ș., *L'entomofaune de l'île de Letea (Delta du Danube)*, ord. Coleoptera (pars), „Trav. Mus. Hist. Nat. „Gr. Antipa““, 9, 1968, 81—93.
25. Negru, Ș., Roșca, A., *L'entomofaune des forêts du Sud de la Doubroudja*, ord. Coleoptera (pars), „Trav. Mus. Hist. Nat. „Gr. Antipa““, 7, 1967, 119—145.
26. Panin, S., *Determinatorul coleoptelor dăunătoare și folositoare din R. P. Română*, pp. 126—150, Ed. Lit. Științ. Did., București, 1951.
27. Petri, K., *Siebenbürgens Käferfauna auf Grund ihrer Erforschung bis zum Jahre 1911*, pp. 253—286, Buchdruckerei Jus. Drotleff, Hermannstadt, 1912.
28. Reitter, E., *Fauna Germanica, die Käfer des Deutschen Reiches*, Lutz, Stuttgart, 1914.
29. Roșca, A., *Contributions a la connaissance du genre Chrysomela L. (Coleoptera—Chrysomelidae) en Roumanie*, „Trav. Mus. Hist. Nat. „Gr. Antipa““, 14, 1974, 250—259.
30. Roșca, A., *L'entomofaune du Nord de la Dobrogea, la zone Măcin—Tulcea—Niculitel*, ord. Coleoptera (pars), „Trav. Mus. Hist. Nat. „Gr. Antipa““, 17, 1976, 145—152.
31. Schaufuss, C., *Cdäwer's Käferbuch, Einführung in die Kenntnis der Käfer Europas*, pp. 885—1018, Schweizerbart, Stuttgart, 1915.
32. Seidlitz, G., *Fauna Transylvanica, die Käfer (Coleoptera) Siebenbürgens*, pp. 753—823, Hartungsche Verlagsdruckerei, Königsberg, 1891.
33. Warchalowski, A., *Fauna Polski—Fauna Poloniae*, Tom 15, Chrysomelidae (Insecta: Coleoptera), Pol. Akad. Nauk, Warszawa, 1993.

NEW TAXA IN THE NEOGENE BIRD FAUNA FROM EASTERN PARATETHYS

EUGEN KESSLER* and ERIKA GAL*

SUMMARY. — The Upper Miocene bird fauna of Paratethys has been treated in several papers in the last decades. This made it possible to describe a bird fauna with new species. At the reexaminations of the remains from Kishinev (Republic of Moldova) and Ciobănița (South Dobrogea, Romania), the authors identified three new taxa: *Branta minor* n.sp. and *Otis bessarabicus* n.sp. from Kishinev and *Tringa grigorescui* n.sp. from Ciobănița. With the three new taxa the fossil bird fauna of Eastern Paratethys has increased to 30 species.

From the Upper Miocene (Middle Sarmatian, Lower Bessarabian) and the Lower Pliocene age sediments on the eastern coastal region of Paratethys the remains of a rich bird fauna came to light. The lists from the sites Bujoru, Kalfa and Kishinev (Republic of Moldova), Ciobănița and Credința (South Dobrogea, Romania) and Mălușteni—Berești (Moldova, Romania) include 27 species [4—9].

During the revision of the material from Kishinev (Collection of Macarovici-Oescu, Faculty of Geology, Alexandru Ion Cuza University, Iași) and Ciobănița (Collection of the Laboratory of Paleontology, University of Bucharest), three new species could be determined which are also new taxa. Altogether with these, the bird fauna of Neogene from Eastern Paratethys contains 30 species (Table 1).

Results and discussion.

Order *Anseriformes*

Family *Anatidae*

Genus *Branta*

Branta minor new species.

Holotype: proximal fragment of right carpometacarpus (LPUI 65 MS) (Fig. 1).

Locality: Kishinev (Republic of Moldova).

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

Etymology: minor — after its small size.

Species diagnosis: the proximal epiphysis of carpometacarpus is typical *Anserid* (on the basis of processus extensorius and trochela carpalis). Its sizes are on the lower verge of the measurement of *Branta* genus, hereby the name of the new taxon.

Measurements: approximative length is 55—60 mm; breadth of proximal epiphysis is 12.98 mm; thickness of proximal epiphysis is 5.79 mm; the

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

Table 1

The list of the bird species from Eastern Paratethys

No.	Species	Locality and publication year of fauna list					
		Bujo- ru 1972	Kalfa 1972	Kishi- nev 1972, 1984, 1992, 1995	Ciobă- nița 1988, 1992, 1995	Cre- dința 1977, 1988, 1992	Mă- lușteni 1984, 1992
1.	<i>Gavia moldavica</i>			+			
2.	<i>Podiceps miocenicus</i>			+			
3.	<i>Diomedea rimana</i>					+	
4.	<i>Sarmatosula debrogensis</i>					+	
5.	<i>Morus olsoni</i>				+	+	
6.	<i>Phalacrocorax lautus</i>			+			
7.	<i>Ardeograndis arborea</i>			+			
8.	<i>Ardea</i> sp.		+				
9.	<i>Ciconia sarmatica</i>					+	
10.	<i>Plegadis</i> sp.		+				
11.	<i>Anserobranta tarabukinii</i>			+		+	
12.	<i>Branta minor</i>			+			
13.	<i>Anser</i> sp.			+			
14.	<i>Anas</i> sp.			+			
15.	<i>Anas</i> cf. <i>velox</i>					+	
16.	<i>Aythya chauvirae</i>					+	
17.	<i>Dendrochen blanchardi</i>					+	+
18.	<i>Dendrochen rotator</i>			+			
19.	Anatinae sp. indet.	+					
20.	Merginae sp. indet.	+					
21.	<i>Promilio incertus</i>	+					
22.	<i>Palaeortyx grivensis</i>						+
23.	<i>Palaeortyx intermedia</i>						+
24.	<i>Probalearica moldavica</i>			+			
25.	<i>Crus miocenicus</i>					+	
26.	<i>Otis bessarabicus</i>			+			
27.	<i>Otis</i> sp.						+
28.	<i>Tertiarleporphyryula lurgi</i>	+					
29.	<i>Tringa grigorescui</i>				+		
30.	<i>Corvus simionescui</i>						+

height of processus extensorius is 7.65 mm; the breadth of metacarpus II is 4.65 mm.

Discussion: During the revision of the remains from Kishinev the carpo-metacarpus fragment was identified as *Anserinae* (in 1984, it was described as cf. *Phalacrocorax lautus* as no comparative materials were available). Its sizes and anatomical characters make possible to classify it in *Branta* genus which is known only from Pliocene (*Branta esmeralda* and *Branta howardi*), but the difference in measurements refers to a new taxon. The fossil genus from Kishinev *Anserobranta*

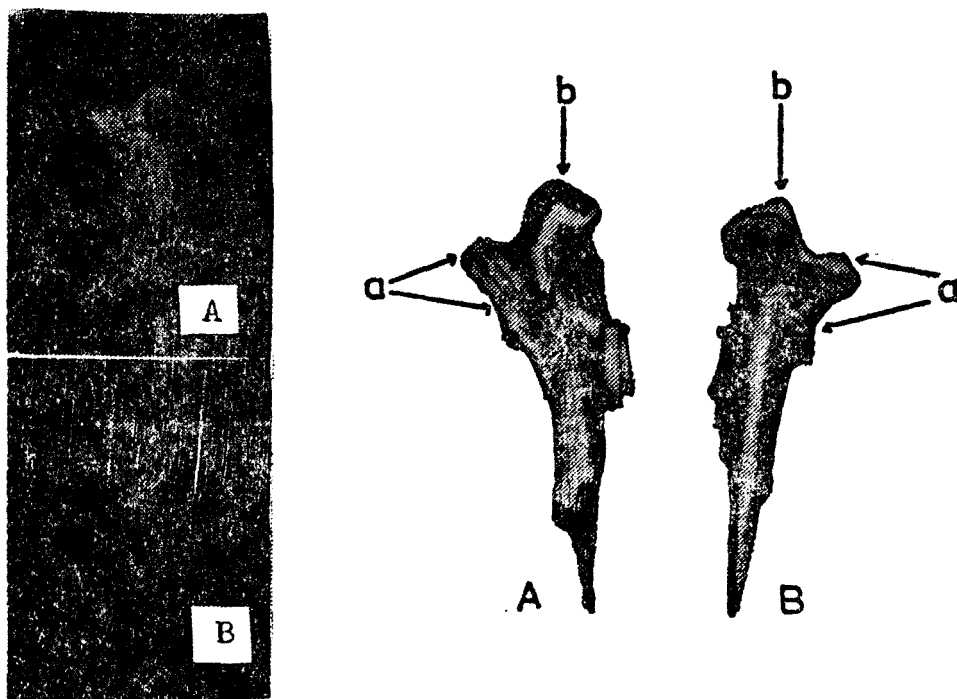


Fig. 1. *Branta minor* n.sp. -- right carpometacarpus (LPUI 65 MS).

A -- Dorsal aspect. B -- Ventral aspect. a -- Processus extensorius. b -- Fovea carpalis.

(*tarabukinii*) is much larger and its transition characters are formed between *Anser* and *Branta* species [2, 3, 9, 10].

Order *Charadriiformes*

Family *Scolopacidae*

Genus *Tringa*

Tringa grigorescui new species.

Holotype: left carpometacarpus, proximal epiphysis (LPUB 283) (Fig. 2).

Locality: Ciobănița (South Dobrogea, Constanța county, Romania).

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

Etymology: The species is named after Dr. Dan Grigorescu, his merits in discovery of site and the remains being recognized.

Species diagnosis: A typical *Charadriiform* carpometacarpus with the characteristic features of the *Scolopacidae*. The proximal epiphysis shows transitional characters between *Tringa* and *Phylomachus* genera with short sizes between the fossil species *Tringa gracilis* and *Tringa larteanus*, close to the recent species *Tringa totanus*.

The proximal edge of trochlea carpalis is rounded off, and in the recent species it is sharpened. From dorsal view the fovea carpalis is similar to

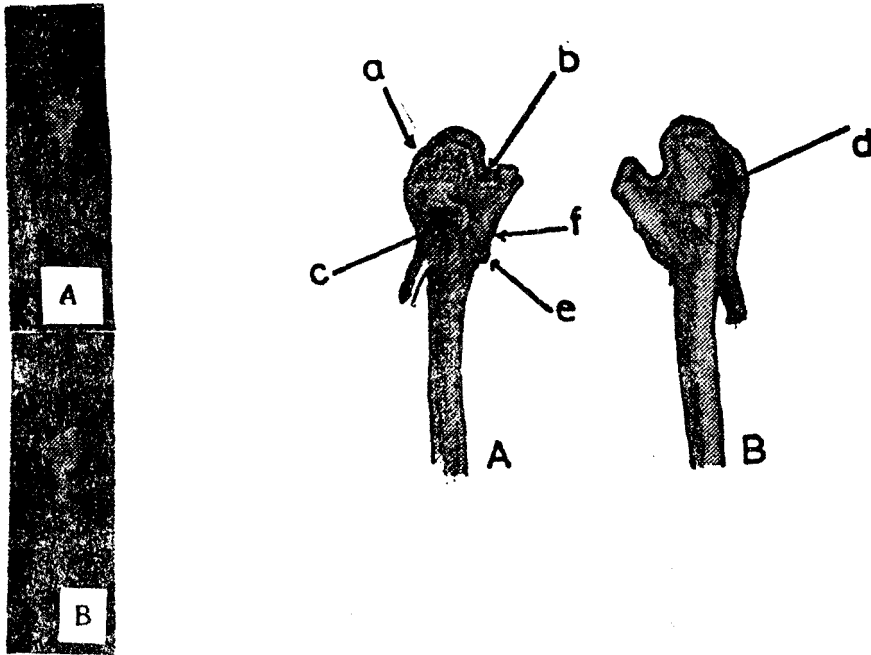


Fig. 2. *Tringa grigorescul n.sp.* — left carpometacarpus (LPUB 283).

A — Dorsal aspect. B — Ventral aspect. a — Trochlea carpale. b — Fovea carpalis. c — Fossa infratrochlearis. d — Fossa supratrochlearis. e — Processus alularis. f — Margo ventralis processus extensorius.

Tringa but *Phylomachus* is sloping deeply. The fossa supratrochlearis of the fossil remains is not perfectly developed, in the *Tringa* it is flat, and in the *Phylomachus* it is deep. The fossa infratrochlearis of *Tringa* is pit-like, but in *Phylomachus* it is wider and flatter. The margo ventralis processus extensorii above the processus alularis is curved while in the *Phylomachus* it is sudden hollowed [1].

Measurements: approximative length is 27—28 mm; breadth of proximal epiphysis is 6.42 mm; height of processus extensorius is 3.84 mm; breadth of metacarpus II is 2.40 mm.

Discussion: The fragmentary material makes possible the identification on the basis of morphological characters and sizes. Its characters are typical for *Charadriiformes*, excluding similar and other related species from the genera *Gallinago*, *Scolopax*, *Charadrius*, *Squatarola*, etc.

Its sizes and age indicate a *Tringa* species precluding the known fossil taxa. These facts made it possible to identify it as a new taxon.

Order Ralliformes

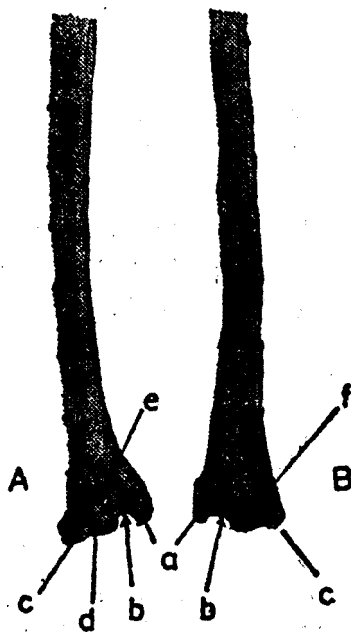
Family Otididae

Genus *Otis*



Fig. 3. *Otis bessarabicus* n.sp.
— left ulna (LPUI 62 MS).

A — Cranial aspect. B — Caudal aspect. a — Tuberculum carpale. b — Margo distalis tuberculum carpale. c — Condylus dorsalis. d — Condylus ventralis. e — Sulcus radialis. f — Sulcus tendineus.



Otis bessarabicus new species.

Holotype: distal fragment of left ulna (LPUI 62 MS) (Fig. 3).

Locality: Kishinev (Republic of Moldova).

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

Etymology: Bessarabia is a Romanian name of the region.

Species diagnosis: The piece corresponds to morphological characters of *Otididae* family, and its sizes are larger than those of *Otis tetrax* but are much smaller than those of *Otis tarda* or of the fossil *Otis affinis*. The tuberculum carpale of the distal part is triangular and its point turns down and inwards. The margo distalis is smoothly concave in a semicircle form. The condylus ventralis is rounded off and it does not form a sharp edge as in *Otis tetrax*. The sulcus radialis is well emphasized, rises above the sulcus tendineus in contrast with the recent species. Measurements: approximative length is 70 mm; breadth of diaphysis is 4.70 mm; breadth of distal epiphysis is 9.90 mm; thickness of distal epiphysis is 6.91 mm.

Discussion: The representatives of *Otididae* family appear rarely in earlier materials [2, 10]. The fossil genus *Paleotis* is known from Eocene and the recent genera *Otis*, *Chlamydotis* and *Neotis* are known only from Miocene, but their sizes are much larger than those of our fossil remains. *Gryzaja odessana* from Lower Pleistocene of Odessa (Republic of the Ukraine) is known only from tibiotarsus and on the basis of its morphological characters it is classified into another family [3]. Also, there are known other bustards with large sizes from Pliocene of Mălușteni (Romania): *Otis* sp. [6], and from Lower and Middle Pleistocene from Betfia (Romania): *Otis lambrechtii* and *Otis kálmáni*, with different sizes, too.

Conclusions. During the revision made in 1992 [7], there could be determined up to the species level the remains which had been provisionally described only up to genera. This experiment closes the process of determination of these problematical fossils. Including these three taxa, the Eastern Paratethys bird fauna amounts to 30 species. From paleoecological view, the majority of them come from aquatic environment. Among these species, there are more typical sea and oceanic taxa (*Gavia moldavica*, *Podiceps miocenicus*, *Diomedea rumana*, *Morus olsoni*, *Sarmatosula dobrogensis*), but the biggest part of them are ducks, geese, sandpipers and wading birds. Also, there are on the list a raptorial bird, two bustard-like species, three *Galliformes* and a crow. From this point of view the fauna list shows similarities to Western European Neogene fauna.

REFERENCES

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 Mus.“, 8, 1964, 195—335.
3. Brodkorb, P., *Catalogue of fossil birds, Part 3 (Ralliformes, Ichthyornithiformes, Charadriiformes)*, „Bull. Florida State Mus.“, 11, 1967, 99—220.
4. Grigorescu, D., Kessler, E., *The Middle Sarmatian avian fauna of South Dobrogea*, „Rev. Roum. Géol., Géophys. Géogr., Sér. Géol.“, 21, 1977, 93—108.

5. Grigorescu, D., Kessler, E., *New contributions to the knowledge of the Sarmatian birds from South Dobrogea in the frame of the Eastern Paratethys*, „Rev. Roum. Géol., Géophys. Géogr., Sér. Géol.” **32**, 1988, 91—97.
6. Kessler, E., *Noi contribuții privind studiul avifaunelor din Paratethys*, „Cristia”, **14**, 1984, 521—532.
7. Kessler, E., *Review of the Neogene waterfowl (Aves: Anatidae) of Eastern Paratethys*, „Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Biol.”, **37** (2), 1992, 47—54.
8. Kessler, E., Gál, E., *New contributions to the Sarmatian bird fauna of Paratethys*, „Rom. J. Stratigr.”, **76** (Suppl. 7), 1995; Abstr., 10th Congr. Reg. Committee on Mediterranean Neogene Stratigraphy, Bucharest, **1**, 53—54.
9. Kurochkin, E. N., Ganea, I. M., *Ptitsy Srednogo Sarmata Moldavii, pozvochnyye Neogena i Pleistotsena Moldavii*, pp. 45—70, Știința, Kishinev, 1972.
10. Olson, S. L., *The fossil record of birds*, „Avian Biol.”, **8**, 1985, 79—252.

PHYTOTOXISCHE ALACHLOR—WIRKUNGEN
AUF WEIZENKEIMPFLANZEN
(*TRITICUM AESTIVUM* L.)

ROZALIA VINTILA*, GEORGETA LAZAR-KEUL*, MARTIN KEUL* und
ALMA ANDREICA*

SUMMARY. — **Phytotoxic Effects of Alachlor on Wheat Seedlings (*Triticum aestivum* L.).** Alachlor applied in doses ranging between 50 and 800 µg/ml induced a strong inhibition of the seedling root and shoot growth, and decreased the fresh and dry mass accumulation. Alachlor concentrations between 25 and 100 µg/ml were effective for the inhibition and/or the cessation of the cytoplasmic streaming within the wheat root hairs. The results suggest that alachlor acts as an efficient plant growth inhibitor, especially at the root level. The herbicide may interfere with the cell growth as it was shown by the strong inhibitory effect on root hair (*Triticum*) and pollen tube (*Primula*) elongation.

Die intensive Anwendung von Pflanzenschutzmitteln zur chemischen Kontrolle von Unkräutern und Schädlingen in land — und forstwirtschaftlichen Kulturen ist neben phytotoxischen Wirkungen auf die geschützten Kulturpflanzen auch mit weitreichenden ökotoxikologischen Aspekten der Umweltverseuchung durch die verschiedensten Pestizide und ihre Degradierungsprodukte verbunden [30]. In dieser Hinsicht sind die Herbizide wegen ihrem großflächig durchgeführten und jährlich oft mehrmals wiederholten Einsatz von besonderem Interesse [11, 20, 23].

Alachlor [2-Chlor-*N*-(methoxymethyl)-*N*-(2', 6'-diäthylphenyl) acetamid] wird neben verwandten Herbiziden der Chloracetamide [6] zur Unkrautvertilgung in Mais-, Soja- und vielen anderen Kulturen eingesetzt [11, 21—23, 26]. Alachlor wird zwar unter aeroben Bedingungen mikrobiologisch rasch abgebaut [3, 21], doch gibt es zahlreiche Belege über die andauernde Persistenz der primären und sekundären Produkte in Böden, Grundwasser und Nahrungsmitteln [21—23, 30], über deren ökotoxikologische und cytogenetische Auswirkungen noch weitgehend Unklarheit herrscht [4, 5, 20].

Die meisten Chloracetamide werden leicht durch die Pflanze aufgenommen und vorwiegend apoplastisch transportiert [1, 2, 12, 22, 24]. Untersuchungen mit resistenten (Mais, Soja) bzw. mit relativ empfindlichen Kulturpflanzen (Hafer, Gurke) konnten belegen, daß die Wirkung dieser Herbizide nicht unmittelbar mit der absorbierten Menge, sondern mit der Geschwindigkeit ihres Abbaus und Metabolisierung in der Pflanze korreliert ist [15]. Trotz der bis jetzt durchgeführten Untersuchungen ist der Mechanismus der Alachlor—Wirkung nicht

* Institut für Biologische Forschungen, 3400 Cluj-Napoca, Rumänien

endgültig geklärt. Die Chloracetamide gelten allgemein als Hemmstoffe des Pflanzenwachstums [1, 6, 14], die über die Hemmung der Zellteilung und der Zellstreckung wirken [7, 13]. Der biochemische Wirkungsmechanismus beruht dabei primär nicht nur auf einer Hemmung der Proteinsynthese [6, 15], sondern, wie auch im Falle anderer Herbizide [14], in der vielseitigen Wechselwirkung mit dem Lipidstoffwechsel [10, 14, 31, 32] und anderen Angriffsorten [1, 6—8, 13] in der Pflanzenzelle.

In vorliegender Arbeit wird die phytotoxische Alachlor—Wirkung auf Wachstumsparameter bei Weizenkeimpflanzen und auf zellphysiologische Prozesse, wie das Zellwachstum (Weizen—Wurzelhaare und *Primula*—Pollenschlauch) und die Protoplasmaströmung (Weizen—Wurzelhaare), untersucht.

Material und Arbeitsmethoden. Als Versuchsmaterial wurden Weizenkeimpflanzen (*Triticum aestivum* L., cv. Dacia) und Pollen von *Primula obconica* Hance verwendet.

Die phytotoxische Wirkung von Alachlor [2-Chlor-N-(methoxymethyl)-N-(2,6-diäthylphenyl)acetamid] wurde auf das Keimlingswachstum, das Zellwachstum (Weizenwurzelhaare und *Primula*-Pollenschlauch) und die Protoplasmaströmung (Weizenwurzelhaare) untersucht, wobei Alachlor je nach der Empfindlichkeit der untersuchten Parameter in Konzentrationen zwischen 10 bis 800 μ g/ml (ca. 0,037—30 mM) getestet wurde. Alachlor kam als Handelspräparat Lasso (48% aktive Substanz) zur Anwendung. Das Herbizid wurde als wäßrige Emulsion in destilliertem Wasser verwendet. Die Wasserlöslichkeit von Alachlor beträgt 242 μ g/ml bei 20°C [11, 21].

Wachstumsmessungen. Weizenkaryopsen wurden in Linhardt-Schalen auf befeuchteten Filterpapierunterlagen mit destilliertem Wasser (Kontrolle) bzw. mit Alachlor in Mengen von 50 bis 800 μ g/ml unter Laborbedingungen (um 22°C) gekeimt. Die Wachstumsdynamik der Keimlinge wurde durch tägliche Längenmessungen des Wurzelsystems und des Sprosses (Koleoptile + Primärblatt) bis zum 6. Tag nach dem Ansetzen verfolgt. Die Versuche wurden mit je 25 Pflanzen in 2 Wiederholungen durchgeführt. Am Versuchsende wurden die Frisch- und Trockenmassen (65°C) bestimmt.

Messung des Wurzelhaarwachstums. Weizenkaryopsen wurden in Petri-Schalen auf mit Leitungswasser befeuchtetem Filterpapier 48 Stunden lang bei 24°C und im Dunkeln vorgekeimt. Die gesamte gekeimte Karyopse, mit einer Hauptseminalwurzel von ca. 1 cm Länge, wurde auf einem Objektträger mit Deckglasfüßchen zur mikroskopischen Beobachtung in einem Tropfen Leitungswasser (Kontrolle) bzw. in Alachlor-Lösungen von 25, 50 und 75 μ g/ml a.S. präpariert. Um Temperatureinflüsse auszuschalten wurde mit einem auf 24°C eingestellten thermoregulierbaren Mikroskop-Heiztisch (Leitz)** gearbeitet. Die Länge der Wurzelhaare wurde vom Beginn ihres Auswachsens alle 30 Minuten über eine Dauer von 6 Stunden mit einem geeichtem Meßschraubenokular (Zeiss, Jena) gemessen. Die Flüssigkeit unter dem Deckglas wurde alle 30 Minuten erneuert. Für jede Versuchsvariante, einschließlich der Kontrolle in Leitungswasser, wurden Messungen an 20—30 Wurzelhaaren durchgeführt. Die Meßergebnisse wurden in Prozenten der Endlänge der Kontrollwurzelhaare berechnet.

Messung der Geschwindigkeit der Protoplasmaströmung. Für die Versuche wurden Weizenwurzelhaare von ca. 700—900 μ m Länge mit relativ einheitlicher Rotationsströmung [25] herangezogen. Eine von der Karyopse abgetrennte 1,5—2 cm lange Seminalwurzel wurde auf einem Objektträger mit Deckglasfüßchen in Leitungswasser präpariert. Nach einer zum Abklingen des traumatischen Prä-

** Für die Gerätespende sind wir der Alexander von Humboldt — Stiftung zu besonderem Dank verpflichtet.

parationsschockes und zur Stabilisierung der photodynamischen Wirkung im Mikroskoplicht erforderlichen Zeitspanne von ca. 30 Minuten [16] wurde die Geschwindigkeit der Protoplasmaströmung der Kontrolle mit Stoppuhr und geeichtem Mikrometer-Okular im Phasenkontrast registriert. Danach wurden alle 15 Minuten frische Alachlor-Lösungen unter dem Deckglas durchgesaugt und ihre Wirkung auf die Geschwindigkeit der Rotationsströmung in Zeitintervallen von je 15 Minuten über eine Versuchsdauer von insgesamt 2 Stunden verfolgt, indem pro Zeitintervall je 30—60 Messungen durchgeführt wurden. Aus diesen Werten wurde die mittlere Geschwindigkeit der Protoplasmaströmung der entsprechenden Zeitintervalle berechnet. Je Variante wurden 3 Wiederholungen durchgeführt.

Pollenkeimung und Messung des Pollenschlauchwachstums. Frisch gesammelte Pollen von *Primula obconica* Hance wurden auf Hohlschliff-Objektträgern mit halbhartem Agar-Medium mit Saccharose [9] zur Keimung angesetzt. Dem Nährmedium wurde Alachlor bis zu einer Endkonzentration von 10, 25 und 50 µg/ml zugesetzt. Nach einer Inkubationsdauer von 4 Stunden bei 24°C wurde die Pollenkeimung festgestellt und die Länge von ca. 30 Pollenschläuchen je Variante mit einem geeichten Binokular-Mikrometer gemessen. Um die Variabilität möglichst auszuschalten wurden die mindestens dreimal wiederholten Versuchsserien jeweils mit Pollen derselben Blüte durchgeführt.

Die Versuchsergebnisse wurden nach den üblichen statistischen Methoden verarbeitet.

Ergebnisse und Diskussion. Die andauernde Alachlor-Behandlung verursacht nur in höheren Konzentrationen (über 100 µg/ml) eine leichte Verzögerung der Keimungsrate (Tabelle 1). Die Ausbildung der Seminalwurzeln wird im Falle niedriger Dosen (50—200 µg/ml) mit fortschreitender Wirkungsdauer signifikant beschleunigt, unter der Einwirkung höherer Dosen (400—800 µg/ml) jedoch gehemmt (Tabelle 1). Die festgestellte Stimulation in der Ausbildung der Seminalwurzeln ist

Tabelle 1

Die Wirkung von Alachlor auf die Keimungsrate der Karyopsen (%) und auf die Anzahl der Embryonalwurzeln bei Weizenkeimpflanzen (*Triticum aestivum* L.)

In Klammern sind die %-Werte gegenüber der Kontrolle angegeben

Dosis (µg/ml)	Keimungsrate (%)			Anzahl der Embryonalwurzeln				
	Tage			Tage				
	2	4	6	2	3	4	5	6
0	100	100	100	2,5 (100)	3,0 (100)	3,8 (100)	4,2 (100)	4,2 (100)
50	100	100	100	2,7 (108)	3,2 (107)	4,7 (124)	5,3 (126)	5,7 (136)
100	98	100	100	2,4 (96)	2,9 (97)	4,2 (110)	5,1 (121)	5,7 (136)
200	98	100	100	2,1 (84)	2,8 (93)	4,1 (108)	4,7 (112)	5,4 (129)
400	92	96	96	1,6 (64)	2,3 (77)	3,1 (82)	3,4 (81)	3,6 (86)
800	92	92	96	1,2 (48)	1,9 (63)	2,2 (58)	2,3 (55)	2,8 (67)

möglicherweise als eine adaptative Stressreaktion zu werten, wie sie bei Weizenkeimpflanzen z.B. unter hypoxischen Verhältnissen beschrieben wurde [33], während die Hemmwirkung bei höheren Dosen offensichtlich durch die betont phytotoxische Alachlor-Wirkung verursacht wird.

Die andauernde Alachlor-Behandlung induziert schon in den ersten Wachstumsphasen eine betonte Hemmung des gesamten Keimlingswachstums. Die Hemmwirkung (% der Kontrollwerte) auf das Längenwachstum des Wurzelsystems (Abb. 1) und der Koleoptile bzw. des Primärblattes (Abb. 2) nimmt mit der applizierten Alachlor-Dosis und der Wirkungsdauer fortschreitend zu, wobei die Empfindlichkeit des Wurzelsystems unter der direkten Herbizid-Einwirkung etwas stärker ausgeprägt ist. Im Gegensatz zu anderen Herbiziden, wie z.B. 2,4-D [9] und Trifluralin [28], treten unter der Einwirkung von Alachlor keine Wachstumsanomalien auf, obwohl auch morphologisch-anatomische Effekte beschrieben wurden [1, 27].

Die betonte Hemmwirkung auf das Wachstum der Koleoptile bzw. des Primärblattes läßt im Einklang mit den vorliegenden Literaturangaben hinsichtlich der Alachlor-Aufnahme durch die Pflanzen schließen [2, 12, 15, 22], daß das Herbizid auch im Falle der Weizenkeimpflanzen durch die Wurzeln leicht absorbiert und rasch in alle Pflanzenteile transportiert wird. Der fast gleichartige Verlauf der Dosis-Effekt-Kurven für die Wachstumshemmung des Wurzelsystems und des Sprosses am 4. Tag nach dem Ansetzen in der maximalen Wachstumsphase der Kontrolle (Abb. 3) belegt den systemischen Charakter der Alachlor-Wirkung.

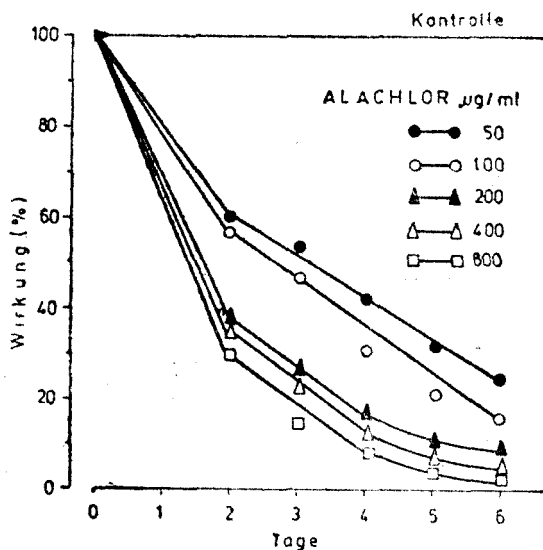


Abb. 1. Die Hemmwirkung von Alachlor auf die Wachstumsdynamik des Wurzelsystems bei Weizenkeimpflanzen (*Triticum aestivum* L.).

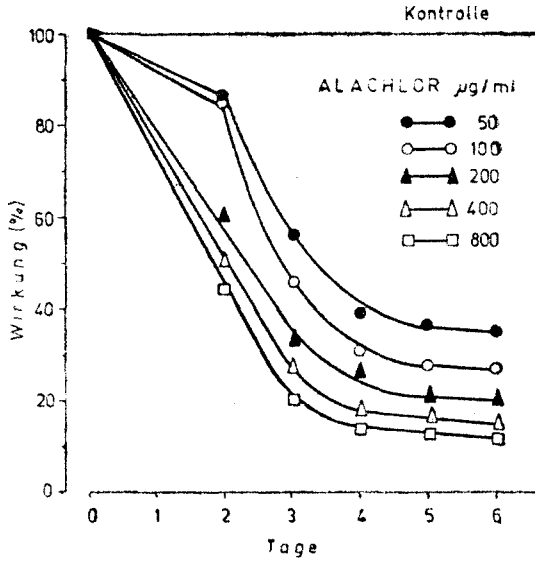


Abb. 2. Die Hemmwirkung von Alachlor auf die Wachstumsdynamik des Sprosses (Koleoptile + Primärblatt) von Weizenkeimpflanzen (*Triticum aestivum* L.).

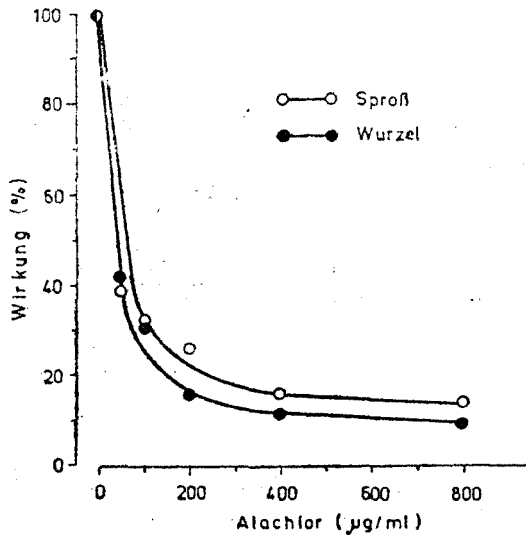


Abb. 3. Dosis-Effekt-Beziehung der Alachlor-Wirkung auf das Wachstum von Weizenkeimpflanzen (*Triticum aestivum* L.).

In Tabelle 2 sind die Alachlor-Wirkungen auf einige Wachstumsparameter am 6. Tag nach Beginn der Behandlung zusammengefaßt und können anhand der relativen %-Werte gegenüber der Kontrolle verglichen werden. Es ist ersichtlich, daß Alachlor mit der Hemmung des Längenwachstums auch die Frisch- und Trockenmassen im Verhältnis zur applizierten Dosis stark herabsetzt, wobei die Raten zwischen Sproß und Wurzelsystem mit steigender Dosis ähnlich wie beim Längenwachstum zunehmen. Dagegen werden die relativen Trockenmassen (mg/100 mg FG) und das Verhältnis zwischen Trockenmasse und Organlänge insbesondere beim Wurzelsystem mit zunehmender Alachlor-Dosis erhöht. Die betontere Hemmung der Frischmasse im Vergleich zur Trockenmasse läßt einerseits auf eine Beeinträchtigung des Wasserhaushaltes schließen, die durch die Verminderung des Vakuolensystems infolge gehemmten Streckungswachstums erklärt werden kann, ist andererseits aber möglicherweise auch morphologisch-anatomischen Veränderungen zu verdanken [1, 27].

Die erzielten Ergebnisse weisen darauf hin, daß die phytotoxische Wirkung von Alachlor erst nach der Keimung einsetzt und hauptsächlich in der drastischen Hemmung des Keimlingswachstums besteht. Alachlor wirkt dabei sowohl über die Blockierung der Zellproliferation als auch insbesondere über die Hemmung der Zellstreckung [1, 5, 7, 13].

Zur Untersuchung der Alachlor-Wirkung auf die Zellelongation wurden Versuche mit Weizenwurzelhaaren und *Primula*-Pollenschläuchen durchgeführt. Beide Zelltypen weisen ein ausgesprochen api-

Tabelle

Die Wirkung von Alachlor ($\mu\text{g/ml}$) auf einige Wachstumsparameter bei Weizenkeimpflanzen (*Triticum aestivum* L.) am 6. Tag nach dem Ansetzen (Versuchsende)

L = mittlere Sproßlänge (cm); WL = mittlere Wurzellänge (cm); FG = Frischgewicht (mg/Pflanze); TM = Trockenmasse (mg/Pflanze); TM% = relative TM (mg/100 mg FG). In Klammern sind die Wirkungen in % der Kontrolle angegeben.

Dosis ($\mu\text{g/ml}$)	Sproß (Kolcoptile + Primärblatt)					Wurzelsystem					SL/WL
	SL	FG	TM	TM%	TM/SL	WL	FG	TM	TM%	TM/WL	
0	7,41 (100)	71,0 (100)	8,47 (100)	12,0 (100)	1,14 (100)	6,45 (100)	53,2 (100)	4,61 (100)	8,7 (100)	0,71 (100)	1,15 (100)
50	2,52 (34)	33,3 (50)	6,75 (80)	20,3 (169)	2,68 (235)	1,64 (25)	21,2 (40)	3,02 (67)	14,2 (163)	1,84 (259)	1,54 (134)
100	2,02 (27)	28,2 (40)	5,33 (63)	18,9 (158)	2,64 (232)	1,03 (16)	14,6 (27)	2,39 (52)	15,8 (182)	1,91 (269)	1,94 (169)
200	1,52 (21)	23,6 (33)	4,43 (52)	18,9 (158)	2,91 (255)	0,56 (9)	11,8 (22)	2,15 (47)	18,7 (215)	3,83 (538)	2,7 (235)
400	1,07 (14)	18,8 (26)	3,27 (39)	18,0 (150)	3,06 (268)	0,44 (7)	8,4 (16)	1,45 (31)	18,8 (216)	4,25 (599)	3,30 (278)
800	0,88 (12)	14,3 (20)	2,63 (43)	18,4 (155)	3,00 (263)	0,25 (4)	7,1 (13)	1,34 (29)	18,9 (217)	5,36 (755)	3,54 (308)

kales Wachstum auf, dessen Kinetik mikroskopisch unmittelbar zu beobachten ist, wodurch sie sich als Biotests zur Untersuchung der Wirkung xenobiotischer Substanzen auf die Zellelongation bestens eignen [17, 19, 28].

Die Alachlor-Wirkung (25, 50, 75 und 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) auf das Zellwachstum der Wurzelhaare ist in Abb. 4 dargestellt. Gegenüber dem sigmoiden Wachstumsmodell der Kontrolle wird die Elongation der Wurzelhaare umso rascher und wirksamer bis zur endgültigen Blockierung gehemmt, je höher die applizierte Dosis war und je länger die Behandlung wirkte. So wird das Wurzelhaarwachstum unter der Einwirkung von 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ nach 6 Stunden Behandlungsdauer um ca. 50% gehemmt, während eine 4mal höhere Konzentration von 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ das Wachstum schon kurz nach Beginn der Verabreichung vollständig blockiert. Die Dosis-Effekt-Beziehung für die induzierte Hemmung verläuft linear (vgl. Abb. 6, 3). Die Hemmwirkung von Alachlor auf das Streckungswachstum wird dabei nicht von Wachstumsanomalien der Wurzelhaarzellen wie unter dem Einfluß von 2,4-D [19], Trifluralin [28] oder Fusilade [17] begleitet.

Die Hemmung der Zellelongation durch Alachlor wurde auch durch Untersuchungen an Pollenschläuchen von *Primula obconica* (vgl. Abb. 6, 2) bestätigt. Die Ergebnisse zeigen, daß Alachlor die Pollenkeimung nicht signifikant beeinflusst, das Wachstum der Pollenschläuche in Dosen über 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ dagegen progressiv hemmt, wobei eine etwa

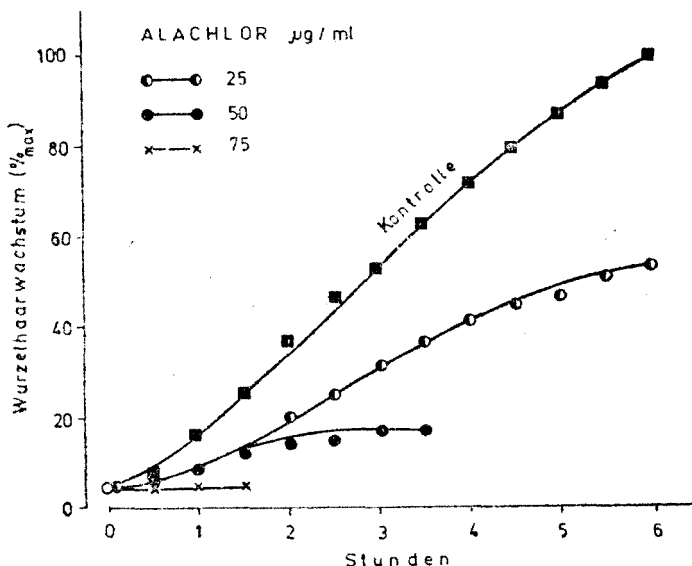


Abb. 4. Die Hemmwirkung von Alachlor auf das Wachstum der Wurzelhaare von Weizenkeimpflanzen (*Triticum aestivum* L.).

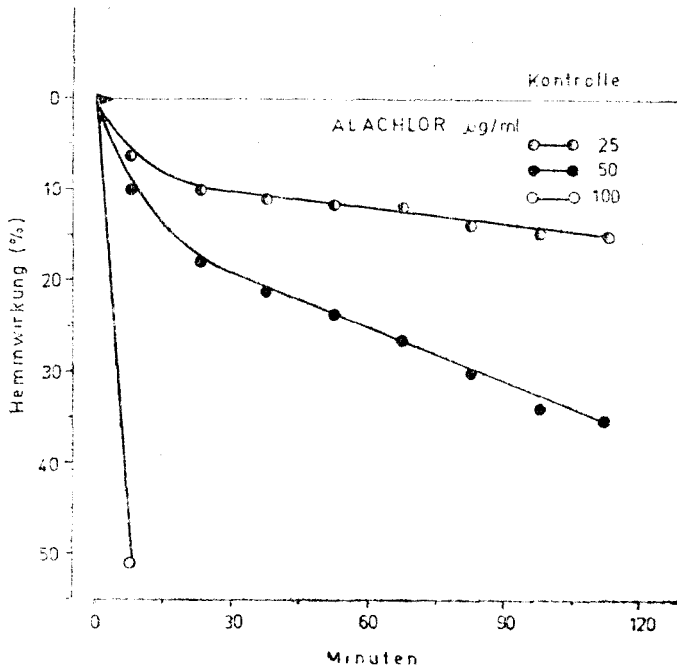


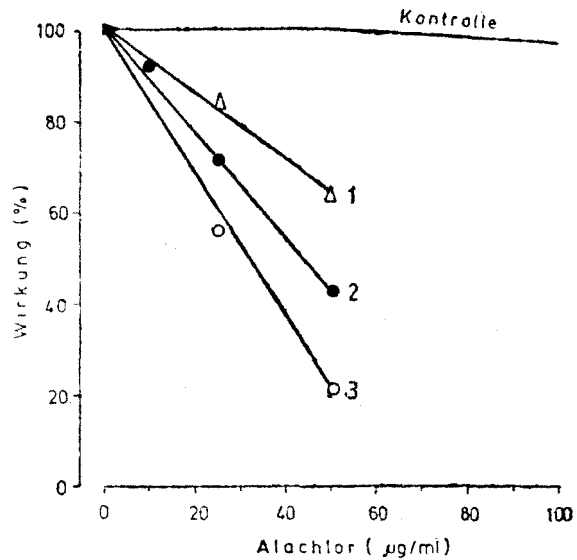
Abb. 5. Die Hemmwirkung von Alachlor auf die Geschwindigkeit der Protoplasmaströmung in den Wurzelhaaren von Weizenkeimpflanz (Triticum aestivum L.).

50%ige Hemmung unter der Einwirkung von 50 µg/ml verzeichnet wird.

Die Gegenwart der Protoplasmaströmung gilt im allgemeinen als geeigneter Zelltest zum Nachweis der uneingeschränkten Vitalität und Funktionalität der pflanzlichen Zelle. Die cytotoxische Alachlor-Wirkung zeigt (Abb. 5), daß die Plasmaströmung zwischen 10 und 50 µg/ml mit zunehmender Behandlungsdauer fortschreitend gehemmt und bei 100 µg/ml schon in den ersten 15 Minuten nach der Behandlung irreversibel sistiert wird. Spezifisch auf den Bewegungsmechanismus einwirkende Faktoren, wie z. B. Cytochalasin B [18], sind allerdings in weit geringeren Konzentrationen wirksam. Der biochemische Mechanismus der Alachlor-Wirkung auf die Protoplasmaströmung ist möglicherweise auf eine Reaktion mit Thiol-Gruppen zurückzuführen [6, 10, 15], die für die Funktion des kontraktilen Actomyosinsystems der Cytoplasmamotilität wichtig sind [29].

Die Wirksamkeit der Alachlor-Wirkung auf die Cytoplasmastromung und das Zellwachstum ist in Abb. 6 anhand der Dosis-Effekt-Beziehungen für eine Behandlungsdauer von jeweils 2 Stunden vergleichend dargestellt. Es ist ersichtlich, daß die cytotoxischen Wirkun-

Abb. 6. Dosis-Effekt-Beziehungen der Alachlor-Wirkung auf (1) die Protoplasmaströmung in den Wurzelhaaren (*Triticum aestivum* L.), (2) das Pollenschlauchwachstum (*Prima obconica* Hance) und (3) das Wurzelhaarwachstum (*Triticum aestivum* L.).



gen in allen Fällen geradlinig verlaufen, wobei die Steilheit der Geraden die Wirksamkeit des Herbizids auf die untersuchten Zellprozesse widerspiegelt. Die Zellelongation reagiert dabei viel empfindlicher auf Alachlor als die Protoplasmaströmung, woraus auf eine spezifische Wechselwirkung des Herbizids mit dem Mechanismus des Zellwachstums geschlossen werden kann. Dabei wird das Wachstum der Wurzelhaare stärker gehemmt als das der Pollenschläuche, was wohl mit der besonders dünnwandigen Struktur der Wurzelhaare als typische Absorptionszellen zusammenhängt.

Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen die bisherigen Befunde über die hemmende Wirkung von Alachlor auf das Pflanzenwachstum [1, 13—15, 24] und belegen, daß diese Wirkung insbesondere in der Beeinträchtigung der Zellstreckung besteht (Abb. 3 und 6). Der Wirkungsmechanismus von Alachlor betrifft dabei wohl vielschichtige Eingriffe in den pflanzlichen Stoffwechsel der Protein-, Lipid- und Kohlenhydratsynthesen [7, 8, 10, 14, 15, 31, 32], die das Zell- und Pflanzenwachstum plastisch und energetisch unterhalten.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Ashton, F. M., Crafts, A. S., *Mode of Action of Herbicides*, Wiley, New York, 1981.
2. Chandler, J. M., Basler, E., Santelmann, P. W., *Uptake and translocation of alachlor in soybean and wheat*, „Weed Sci.“, **22**, 1974, 253—258.
3. Chesters, G., Simsman, G. V., Levy, J., Alhajjar, B. J., Fathulla, R. N., Harkin, J. M., *Environmental fate of alachlor and metolachlor*, „Rev. Environ. Toxicol.“, **108**, 1989, 1—74.

4. Coman, N., Dordea, M., *Possible mutagenic effects of alachlor*. „Stud. Univ. Babeş-Bolyai, Biol.“, **35** (1), 1990, 132—136.
5. Coman, N., Dordea, M., Persecă, T., *The estimation of the action of alachlor and methalaxyl on cell division*, „Stud. Univ. Babeş-Bolyai, Biol.“, **35** (2), 1990, 55—60.
6. Corbet, J. R., *The Biochemical Mode of Action of Pesticides*, Acad. Press, London, 1974.
7. Deal, L. M., Hess, F. D., *An analysis of the growth inhibitory characteristics of alachlor and metolachlor*, „Weed Sci.“, **28**, 1980, 168—175.
8. Declaire, M., de Cat, W., *Modification des teneurs en ATP, glucose, fructose et saccharose dans les plantules de concombre (Cucumis sativus) sous l'action de divers herbicides*, „Weed Res.“, **21**, 1981, 93—97.
9. Diaconeasa, B., Andreica, A., *Câteva date privind fiziologia polenului de Primula obconica*, „Stud. Univ. Babeş-Bolyai, Ser. Biol.“, **13** (2), 1968, 43—49.
10. Fuerst, E. P., *Understanding the mode of action of the chloroacetamide and thiocarbamate herbicides*, „Weed Technol.“, **1**, 1987, 270—277.
11. Ghinea, I., Vlăduţu, I., Berca, M., *Efectele reziduale ale erbicidelor*, Ed. Acad. R.S.R., Bucureşti, 1987.
12. Hamill, A. S., Penner, D., *Interaction of alachlor and carbofuran*, „Weed Sci.“, **21**, 1973, 330—335.
13. Hess, F. D., *Herbicide interference with cell division in plants*, in Böger, P., Sandmann, G. (Eds.), *Target Sites of Herbicide Action*, pp. 85—103, CRC Press, Boca Raton, FL, 1989.
14. Hoppe, H. H., *Fatty acid biosynthesis — A target site of herbicide action*, in Böger, P., Sandmann, G. (Eds.), *Target Sites of Herbicide Action*, pp. 65—83, CRC Press, Boca Raton, FL, 1989.
15. Jaworski, E. G., *Analysis of the mode of action of herbicidal α -chloroacetamides*, „J. Agric. Food Chem.“, **17**, 1969, 165—170.
16. Keul, M., *Das Wirkungsspektrum der Photodinese in den Wurzelhaaren der Gerste (Hordeum vulgare L.)*, „Z. Pflanzenphysiol.“, **79**, 1976, 40—52.
17. Keul, M., Vintilă, R., Lazăr-Keul, G., Andreica, A., *Phytotoxische Fusilade-Wirkungen auf Weizen- und Maiskeimpflanzen. III. Teil. Wirkungen auf Zellwachstum und Cytoplasmastromung*, „Stud. Univ. Babeş-Bolyai, Biol.“, **37** (1), 1992, 47—57.
18. Lazăr-Keul, G., Keul, M., Wagner, G., *Reversible Hemmung der Protoplasmastromung in den Wurzelhaaren der Gerste (Hordeum vulgare L.) und Tomate (Lycopersicon esculentum Mill.) durch Cytochalasin B*, „Z. Pflanzenphysiol.“, **90**, 1978, 461—466.
19. Lazăr-Keul, G., Vintilă, R., Andreica, A., Keul, M., *Efecte citofiziologice ale erbicidului 2,4-D*, „Combaterea integrată a buruienilor“ (Bucureşti), **6**, 1988, 265—270.
20. Meisner, I. F., Belluck, D. A., Roloff, B. D., *Cytogenetic effects of alachlor and/or atrazine in vivo and in vitro*, „Environ. Molec. Mutagen.“, **19**, 1992, 77—82.
21. Pothuluri, J. V., Freeman, J. P., Evans, F. E., Moorman, T. B., Cerniglia, C. E., *Metabolism of alachlor by the fungus Cunninghamella elegans*, „J. Agric. Food Chem.“, **41**, 1993, 483—488.
22. Pylypiw, H. M., Bugbee, G. J., Frink, C. R., *Uptake of preemergent herbicides by corn: distribution in plants and soil*, „Bull. Environ. Contam. Toxicol.“, **50**, 1993, 474—478.
23. Schottler, S. P., Eisenreich, S. J., Capel, P. D., *Atrazine, alachlor, and cyanazine in a large agricultural river system*, „Environ. Sci. Technol.“, **28**, 1994, 1079—1089.
24. Seresi, N., Loffredo, E., Padovano, G., *Effects of humic acid-herbicide interactions on the growth of Pisum sativum in nutrient solution*, „Plant Soil“, **127**, 1990, 41—47.
25. Soran, V., Lazăr-Keul, G., *Relationship between cell growth and rate of protoplasmic streaming*, „Cytologia“, **43**, 1978, 265—271.

26. Șarpe, N., Strejan, G., *Combaterea chimică a buruienilor din culturile de câmp*, Ed. Ceres, București, 1981.
27. Ungureanu, I., Sândoiu, D. D., Ciontu, C., Matei, E., *Modificări morfo-fiziologice la porumb sub influența alaclorului și a atrazinului*, „Combaterea integrată a buruienilor” (Târgoviște), 7, 1990, 233—244.
28. Vintilă, R., Lazăr-Keul, G., Keul, M., *Cresterea perilor radiculari de grâu și evoluția mișcării citoplasmatică sub efectul Trifluromului 24 EC*, „Combaterea integrată a buruienilor” (Târgoviște) 7, 1990, 225—232.
29. Wagner, G., *Actomyosin as a basis mechanism of movement in animals and plants*, in Haupt, W., Feinleib, M. E. (Eds.), *Physiology of Movements*, *Enycl. Plant. Physiol., New Ser.*, Vol. 7, pp. 114—126, Springer, Berlin, 1979.
30. Wang, W., Freemark, K., *The use of plants for enviromental monitoring and assessment*, „*Ecotoxicol. Environ. Safety*”, 30, 1995, 289—301.
31. Weisshaar, H., Böger, P., *Primary effects of chloracetamides*, „*Pestic. Biochem. Physiol.*”, 28, 1987, 286—293.
32. Weisshaar, H., Retzlaff, G., Böger, P., *Chloroacetamide inhibition of fatty acid synthesis*, „*Pestic. Biochem. Physiol.*”, 32, 1988, 212—216.
33. Wiedenroth, E.-M., *Responses of roots to hypoxia: their structural and energy relations with the whole plant*, „*Environ. Exp. Bot.*”, 33, 1993, 41—51.

HEAVY METALS IN THREE SPECIES OF EDIBLE MUSHROOMS

ADRIANA POP* and ANA NICOARA*

SUMMARY. — The paper deals with Cd, Pb, Cr, Cu, Zn and Mn in the edible mushroom species *Macrolepiota procera*, *Armillaria mellea* and *Amanita rubescens*, collected from more or less polluted areas of Transylvania. The concentration of heavy metals in mushrooms (mg/kg dry matter) varies within a large range: Cd from 2.67 to 69.34; Pb from 5.02 to 146.34; Cr from 7.31 to 275.58; Cu from 2.52 to 375.05; Zn from 38.55 to 297.00 and Mn from 13.70 to 163.46. The highest content (especially Cd and Pb) was found in mushrooms collected in the polluted areas. The accumulation of trace elements is highest in *Macrolepiota procera* (lawn decomposer). Young mushrooms were found to contain larger quantities of heavy metals than the mature ones.

Resisting natural breakdown, heavy metals accumulate at different levels of the trophic chains of terrestrial and aquatic ecosystems in concentrations that can have a negative influence on the quality of environment and human health.

Mushrooms are already known for their property to accumulate heavy metals, and even to concentrate some of them (Hg, Cd, Se) in their fruiting bodies.

Data from the literature demonstrate an increase of highly toxic heavy metal contents, especially of mercury, cadmium, lead, and selenium, in mushrooms collected from polluted areas [1—15].

Metal accumulation in the fruiting bodies of mushrooms depends on the species, ecological group, age, part of the fruiting body (cap, stalk, lamellae), habitat and time of collecting.

The paper presents the contents of Cd, Pb, Cr, Cu, Zn and Mn in three largely spread and frequently consumed mushroom species, namely in *Macrolepiota procera* (Scop.) Sing., *Armillaria mellea* (Vahl.) Kumm. and *Amanita rubescens* Pers. comparatively from polluted and less polluted areas of Transylvania.

Material and methods. Samples of mushroom fruiting bodies were collected (between 1984—1993) from Zlatna, from Târnava and Ștenia near Copsa Mică and from Cugir, three areas which are known to be mostly polluted with SO₂, SO₃, Pb, Cu, and Zn oxides produced by the local factories. For comparison, samples from less polluted areas of Cluj-Napoca (Mănăștur forest), Mociu, Sighiștel and Tg. Lăpuș were taken.

Metal analysis was performed by acetylene flame atomic absorption spectrophotometry (AAS 1N). Oven-dried (at 80°C) samples of fruiting bodies were mineralised in concentrated HNO₃ and H₂O₂. The analytical data are given as mean values, in mg/kg dry matter.

* Biological Research Institute, 3400 Cluj-Napoca, Romania

Results. Contents of Cd, Pb, Cr, Cu, Zn and Mn in the fruiting bodies of the examined mushrooms depend on the species and the area where they are collected (Tables 1—3).

Of the metals analysed, Cd and Pb are known to be the most toxic for the human body.

Table 1

Metal contents (mg/kg dry matter) in the fruiting bodies of *Macrolepiota procera* (Scop.) Sing.

Place and time of collecting	Cd	Pb	Cr	Cu	Zn	Mn
Meciu, June 1990	2.67	5.02	7.31	59.10	58.18	31.72
Tg. Lăpuș, Aug. 1989	3.85	22.52	19.58	99.23	47.80	19.22
Ștenia, Sept. 1988	33.03	108.50	213.60	210.41	175.37	163.46
Târnava, Sept. 1988	69.34	100.93	212.73	375.05	112.14	20.60

Table 2

Metal contents (mg/kg dry matter) in the fruiting bodies of *Armillaria mellea* (Vahl.) Kumm.

Place and time of collecting	Cd	Pb	Cr	Cu	Zn	Mn
Cluj-Napoca, Sept. 1989	3.02	11.00	29.67	2.52	297.00	161.71
Cugir, Sept. 1985	8.53	55.52	275.58	16.40	38.55	39.34
Zlatna, Oct. 1984	7.24	60.00	34.85	71.85	140.40	13.70

Table 3

Metal contents (mg/kg dry matter) in the fruiting bodies of *Amanita rubescens* Pers.

Place and time of collecting	Cd	Pb	Cr	Cu	Zn	Mn
Zlatna, June 1984 (young specimens)	8.03	146.34	221.73	81.96	197.74	102.00
Zlatna, June 1984 (mature specimens)	6.84	78.22	193.43	51.92	182.31	27.44
Târnava, Oct. 1989 (mature specimens)	12.39	69.33	23.28	10.50	182.50	16.57
Sighiștel, Oct. 1993	2.07	7.41		26.16	110.59	77.93

Cadmium concentrations in the three species of mushrooms range between 2.67 and 69.34 mg/kg dry matter. The highest values were recorded in *Macrolepiota procera* collected from Tárnava and Štenia, that is from the most polluted areas (Table 1).

The values of lead concentrations vary between 5.02 and 146.34 mg/kg dry matter. The highest concentration was found in *Amanita rubescens*, collected from Zlatna (Table 3). High values were also detected in *Macrolepiota procera* from Štenia and Tárnava (108.50 mg/kg and 100.93 mg/kg dry matter, respectively; Table 1).

High contents in Cr, Cu, Zn and Mn were recorded as follows: 7.31—275.58 mg/kg for Cr; 2.52—375.05 for Cu; 38.55—297.90 mg/kg for Zn and 13.70—163.46 mg/kg for Mn (Tables 1—3).

In young fruiting bodies, metal concentrations were higher as compared to mature ones (Table 3).

Conclusions. 1. The contents of heavy metals, especially of Cd and Pb, in the mushrooms collected from the most polluted areas exceed the WHO health security standards (13 times for Cd and 4 times for Pb).

2. Of the three investigated species, *Macrolepiota procera* accumulates the highest quantities of heavy metals.

3. Young fruiting bodies contain more noxae than the mature ones.

REFERENCES

1. Bargaglia, R., *Rivelamenti quantitativi di elementi in tracce nei macromiceti del Monte Amiata*, „Micol. Ital.“, **13** (3), 1984, 25—35.
2. Irlet, B., Rieder, K., *Cadmium und Blei in Pilzen aus der Alpenen Staue der Schweizer Alpen*, „Mycol. Helv.“, **1** (6), 1985, 393—399.
3. Kojo, M.-R., Lodenius, M., *Cadmium and mercury in macrofungi. Mechanisms of transport and accumulation*, „Angew. Bot.“, **63**, 1989, 46—58.
4. Laaksovirta, K., Alakuijala, P., *Lead, cadmium and zinc content of fungi in the parks of Helsinki*, „Ann. Bot. Fenn.“, **15**, 1978, 253—257.
5. Laub, E., Waligorski F., Woller, R., Lichtenthal, H., *Cadmium uptake by mushrooms*, „Z. Lebensm. Unters.-Forsch. 164“ „Chem. Abstr.“, **87**, 1977, 269—271.
6. Lodenius, M., Kausi, T., Laaksovirta, K., Liukkonen-Lilja, H., Piepponen, S., *Lead, cadmium and mercury contents of fungi in Mikkeli, SE Finland*, „Ann. Bot. Fenn.“, **18**, 1981, 183—186.
7. Meisch, H.-U., Schmitt, J. A., Reinle, W., *Schwermetalle in höheren Pilzen: Cadmium, Zink und Kupfer*, „Z. Naturforsch.“, **32C**, 1977, 172—181.
8. Palloti, G., Bencivenga, B., Vegliante, A., *Contenuto in mercurio totale in funghi selvatici e coltivati*, „Ind. Alim.“, **15** (12), 1976, 57—60.
9. Quinche, J.-P., *Les teneurs en huit elements traces de Boletus edulis*, „Mycol. Helv.“, **1** (2), 1983, 89—91.
10. Schmitt, J. A., Meisch, H.-U., *Cadmium in mushrooms — distribution, growth effects and binding*, „Trace Elements Med.“, **2**, 1985, 163—166.
11. Saeger, R., Meyer, E., Schoenhut, S., *Lead in mushrooms*, „Z. Lebensm. Unters.-Forsch. 162“, 1976, 7—10.

12. Seeger, R., Nützel, R., Dill, U., *Cadmium in Pilzen*. „Z. Lebensm. Unters.-Forsch. 166“ 1978, 23—34.
13. Stijve, T., *Selenium content of mushrooms*, „Z. Lebensm. Unters.-Forsch. 164“, 1977, 201—203.
14. Stijve, T., Besson, R., *Mercury, cadmium, lead and selenium content of mushroom species belonging to the genus Agaricus*, „Chemosphere“, (2), 1976, 151—158.
15. Stijve, T., Roschnik, R., *Mercury and methyl mercury content of different species of fungi*, „Trav. Chim. Alim. Hyg.“, 65, 1974, 209—220.

HEAVY METAL CONTENTS IN SOIL AND CULTIVATED PLANTS
(*ZEA MAYS* L., *SOLANUM TUBEROSUM* L.)
UNDER THE INFLUENCE OF FERTILIZERS

DANA BĂTHORY*, PETRU GUȘ**, ANA NICOARA* and VICTOR BERCEA*

SUMMARY. — The paper describes the effects of treatments for improving the agricultural soils in the industrial area Zlatna (Alba county), by using manure and chemical fertilizers (NPK) and CaCO_3 , as well as their influence upon the heavy metal contents in food vegetal material (corn caryopses and potato tubercles). In the polluted soil (control) the heavy metal contents were: Pb — 68.66 mg kg^{-1} , Zn — 405.85 g kg^{-1} , Cu — 247.50 kg^{-1} , Cd — 5.45 mg kg^{-1} , Fe — 10.50 g kg^{-1} . The results show that fertilizers determined increases in Pb, Zn, and Cd contents of contaminated soils, CaCO_3 contributed to the increase of the solubility of chemical compounds and to the metal uptake by plants. The heavy metal concentrations, higher in potato tubercles than in corn caryopses, might be the result of some tolerance mechanisms to the excess of heavy metals manifested by fixation of potentially toxic elements in the vegetative organs.

The agroecosystems in industrial areas are affected by gaseous and dust emissions resulted from technological processes. Particles in suspension with a high content in heavy metals oxides (Pb, Zn, Cu, Cd, etc.) deposit on the surface of plants and soils in the surroundings of the factories, or even at great distances as a result of air currents. The deposited materials cause changes in soil quality and equilibrium of the soil-plant system. Soils have an ability to buffer changes depending on bulk properties such as texture, organic matter content, and pH. However, there are important implications if the buffering capacity of soils is exceeded; reversing undesirable changes present difficult management problems [8].

Uptake and accumulation of heavy metals in plants, as well as the reaction of the plants to these influences have become lately one of the researchers' main concern. The accumulation of heavy metals in vegetal organisms represents a contamination factor through food chains [7, 8].

The high concentrations of heavy metals in soil have damaging effects on vegetal organisms; the most frequent effect is the inhibition of the growth process. Many metals impair cell physiological functions including cytoplasmic enzyme activity, and transport functions [5].

The present paper is dedicated to the effects of treatments for improving the agricultural soils in the industrial area Zlatna (Alba

* Institute of Biological Research, 3400 Cluj-Napoca, Romania

** University of Agricultural Sciences, 3400 Cluj-Napoca, Romania

county), by using manure and chemical fertilizers (NPK) and CaCO_3 , as well as their influence upon the heavy metal contents in food vegetal material (corn caryopses and potato tubercles).

Materials and method. The experiment was carried out in Pătrângenii, a locality 5 km down the factory processing non-ferrous metals in Zlatna (Alba county), the source of pollution with sulphur oxides and heavy metals of the agricultural and forest lands of the Ampoi valley [1, 2]. The experimental plots have been organized into two distinct sets, characterized by supplementary calcium carbonate ($+\text{CaCO}_3$) at 5 tons/ha, or without calcium carbonate ($-\text{CaCO}_3$). The control plot has not been treated at all, while the treatments comprised the following variants:

- V1 — manure (45 t/ha);
- V2 — manure (90 t/ha);
- V3 — NPK 150 kg/ha (60:50:40);
- V4 — NPK 300 kg/ha (120:100:80);
- V5 — NPK 600 kg/ha (240:200:160);
- V6 — non-fertilized soil, treated with CaCO_3 (5 t/ha).

The plots were cultivated with corn and potato plants, according to the standards proper to each species. At the end of the vegetation period, soil was sampled both from the control, the manure fertilized soils — 90 t/ha (without CaCO_3 and with CaCO_3) and the soils treated with NPK — 300 kg/ha (without CaCO_3 and with CaCO_3). Vegetal material samples (corn cobs and potato tubercles) have also been taken from all the experimental variants. Estimation of heavy metals has been performed three times from the dried material minced to fine powder and macerated in HNO_3 (the vegetal material) and in a mixture of concentrated acids (H_2SO_4 , HNO_3 , HClO_4 — the soil samples). Measurements were registered by means of a spectrophotometer with atomic absorption. The results have been processed statistically: the mean, the standard deviation (S.D.), and the significance of difference ("t" test) have been calculated.

Results and discussions. The arable soil (control) has high concentrations of Pb, Zn, Cu, Cd, Fe in the area influenced by atmospheric pollution, 5 km down from the contaminating source (Table 1). Under the influence of fertilizers significant changes in the contents of Zn, Pb and Cd take place. Thus, Zn increases significantly ($P < 0.001$) in all the variants, as compared to the control. Pb increases by 8—12% in soils treated with manure and NPK, and decreases by about 30% ($P < 0.01$) in soils with combined treatment (fertilizers + CaCO_3). Copper concentrations do not show significant changes, although the limits of the variability are very large. It is only under the influence of manure treatment and CaCO_3 that the Cu content in soil becomes more homogenous (Table 1). On the other hand, Cd increases significantly in all the variants, especially in soils without CaCO_3 addition.

The heavy metal contents in the vegetal material differ in the two species under study (Tables 2 and 3). In potato tubercles (Table 2), quantities of Zn vary between 24.12 and 53.81 mg kg^{-1} d.w., Cu between 8.09 and 15.61 mg kg^{-1} d.w., Fe between 0.37 and 22.48 mg kg^{-1} d.w. Corn caryopses contain: Zn (25—110 mg kg^{-1} d.w.), Cu (1.35—4.85 mg kg^{-1} d.w.), Fe (0.34—17.76 mg kg^{-1} d.w.) (Table 3). We have observed the absence of Cd, as well as equal quantities of Pb (1.61 mg kg^{-1} d.w.) in all the experimental variants, except for V6 in potato tubercles (3.23 mg kg^{-1} d.w.).

Table 1

Heavy metal contents in contaminated soils under the influence of fertilizers

Heavy metals	C*	V1	V2	V3	V4
Pb (mg kg ⁻¹ d.w.)	68.66	74.32	46.85	77.55	46.05
S.D. ±	19.44	5.60	3.70	51.81	15.13
%	100	108.24	68.23	112.94	67.06
Zn (mg kg ⁻¹ d.w.)	405.85	1054.25	1024.13	1129.80	1066.03
S.D. ±	15.29	15.10	10.11	64.15	44.97
%	100	259.76	252.26	278.37	262.66
		***	***	***	***
Cu (mg kg ⁻¹ d.w.)	247.50	222.50	231.66	254.16	260.83
S.D. ±	46.83	45.89	12.58	76.37	41.85
%	100	89.69	93.60	102.69	105.38
Cd (mg kg ⁻¹ d.w.)	5.45	7.20	6.79	7.71	7.51
S.D. ±	0.35	0.64	0.31	0.61	0.35
%	100	132.11	124.58	141.46	137.79
		*	*	**	**
Fe (g kg ⁻¹ d.w.)	10.50	11.25	10.88	12.12	10.88
S.D. ±	0.13	0.15	0.35	1.60	0.74
%	100	107.14	103.61	115.71	103.61
		**			

* C — Control, V1 — Manure (90 t/ha—CaCO₃), V2 — Manure (90 t/ha+CaCO₃), V3 — NPK (300 kg/ha—CaCO₃), V4 — NPK (300 kg/ha+CaCO₃). The results represent the mean of three replicates ± S.D. The values are significantly different at * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001.

Table 2

Heavy metal contents (mg kg⁻¹ d.w.) in potato (tubercles) grown in contaminated and fertilized soils

Variant	Pb	Zn		Cu		Fe	
		Mean ± S.D.	%	Mean ± S.D.	%	Mean ± S.D.	%
Control	1.61	43.09 ± 0.05	100	11.42 ± 0.38	100	5.01 ± 0.37	100
- CaCO ₃							
V1	1.61	28.02 ± 0.56	65.03 ***	10.96 ± 0.16	96.00	15.02 ± 0.03	299.60 ***
V2	1.61	29.94 ± 0.57	69.48 ***	15.61 ± 0.16	136.71 **	21.38 ± 0.34	426.46 ***
V3	1.61	29.95 ± 0.56	69.51 ***	8.92 ± 0.16	78.13 **	14.93 ± 0.19	297.800 ***
V4	1.61	30.12 ± 0.27	69.88 ***	15.03 ± 0.16	131.64 **	20.05 ± 0.37	400.00 ***
V5	1.61	32.09 ± 0.69	74.47 ***	14.45 ± 0.16	126.56 **	22.48 ± 0.77	448.40 ***
+ CaCO ₃							
V1	1.61	41.65 ± 0.32	96.65 *	8.09 ± 0.09	70.86 **	0.41 ± 0.06	8.17 **
V2	1.61	53.81 ± 0.63	124.86 ***	11.83 ± 0.16	103.61	0.37 ± 0.06	7.38 ***
V3	1.61	24.12 ± 0.11	55.97 ***	9.39 ± 0.35	82.25 ***	8.94 ± 0.38	178.32 **
V4	1.61	48.47 ± 0.32	112.47 ***	14.74 ± 0.16	129.10 ***	19.39 ± 0.94	386.90 ***
V5	1.61	37.42 ± 0.31	86.84 ***	12.14 ± 0.13	106.30 *	3.38 ± 0.38	67.42 ***
V6	3.23	48.80 ± 0.12	113.24 ***	12.80 ± 0.50	112.08	9.92 ± 0.38	197.87 ***

The results represent the mean of three replicates ± S.D. Differences are significant at * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001.

In accordance with the applied soil treatment, there is a significant decrease of Zn content in the potato tubercles, throughout the series with no CaCO_3 addition and the NPK (150 kg/ha + CaCO_3) variant; there is a significant decrease of Cu content in NPK (150 kg/ha — CaCO_3), manure (45 t/ha + CaCO_3) and NPK (150 kg/ha + CaCO_3) treatments. Significant, about 30% increases in the Cu quantities can be noticed, as compared to the control, in the no- CaCO_3 variants (manure 90 t/ha, NPK 300 and 600 kg/ha) and in the NPK (300 kg/ha + CaCO_3) treatment. At the same time, the Fe content increases in the variants with fertilizers without CaCO_3 and in the series treated with CaCO_3 , under the influence of NPK (150 and 300 kg/ha). The lowest values in Fe content were recorded in the case of V1, V2 and V5 with added CaCO_3 .

In corn caryopses (Table 3) there were increased Zn quantities, in the case of manure treatment (90 t/ha — CaCO_3) and significant decrease in the NPK (300 kg/ha — CaCO_3) variant. Under the influence of CaCO_3 the Zn quantity increases significantly in the V1, V2, V3 and V4 variants. Under the influence of NPK at the higher concentration, the Zn content decreases with over 20%. Copper concentration in corn caryopses is lower than in tubercles, but the oscillating values are ampler among the treated variants. Treatments without CaCO_3 reveal Fe quantities under 1 mg kg^{-1} d.w., while treatments with CaCO_3 show significant increases of Fe quantities, especially in V2, V4, V5.

The ecological consequences of the soil pollution with heavy metals are also influenced by metal solubility and mobility. These che-

Table 3

Heavy metal contents (mg kg^{-1} d.w.) in corn (caryopses) grown in contaminated and fertilized soils

Variant	Pb	Zn		Cu		Fe	
		Mean \pm S.D.	%	Mean \pm S.D.	%	Mean \pm S.D.	%
Control	1.61	36.25 \pm 0.23	100	2.21 \pm 0.20	100	1.75 \pm 0.38	100
— CaCO_3							
V1	1.61	36.72 \pm 0.27	101.28	2.60 \pm 0.53	117.40	4.03 \pm 0.38	230.28 ***
V2	1.61	45.56 \pm 0.28	125.60 ***	2.21 \pm 0.19	100.15	1.41 \pm 0.37	80.76 ***
V3	1.61	35.57 \pm 0.56	98.12	3.99 \pm 0.85	180.42	3.16 \pm 0.19	180.57 **
V4	1.61	25.56 \pm 0.48	70.50 ***	4.85 \pm 0.16	219.27 **	0.95 \pm 0.05	54.28 *
V5	1.61	37.70 \pm 0.28	103.99 *	3.68 \pm 0.16	166.56 **	0.93 \pm 0.07	53.52 *
+ CaCO_3							
V1	1.61	52.89 \pm 0.32	145.89 ***	1.35 \pm 0.16	61.14 *	0.35 \pm 0.03	20.00 *
V2	1.61	110.29 \pm 0.44	304.22 ***	2.52 \pm 0.16	144.00	10.35 \pm 0.75	591.61 **
V3	1.61	44.08 \pm 0.28	121.60 ***	3.12 \pm 0.12	141.26 **	3.38 \pm 0.38	193.14 ***
V4	1.61	48.50 \pm 0.28	133.79 ***	3.99 \pm 0.85	180.42	17.76 \pm 0.94	1015.23 ***
V5	1.61	27.66 \pm 0.48	76.29 ***	2.90 \pm 0.01	131.17 *	6.65 \pm 0.38	380.00 ***
V6	1.61	33.33 \pm 0.56	91.95 **	2.52 \pm 0.16	114.00	0.34 \pm 0.01	19.61 *

The results represent the mean of three replicates \pm S.D. Differences are significant at: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

mically related factors determine the transfer of polluting agents from soil to the groundwater, microorganisms, native plant and animal communities, cultivated plants and finally to the human food [15]. The uptake of heavy metals, especially of those having high mobility, reflects the concentrations in soils. Therefore, it is very important that heavy metal concentrations in soils and plants should be known, as accumulations may become sometimes dangerous for man without visible damaging effects on vegetal organisms. Bibliographic data concern mostly Pb and Cd, whose toxic effects on plants become significant at concentrations over the risk level for human beings. Reverse effects were revealed for Zn and Cu [15].

The concentration of about 70 mg kg⁻¹ d.w. in Pb (Table 1) in the control exceeds the "normal" concentration of 30—40 mg kg⁻¹ in agricultural soils [12], revealing thus a high pollution level. The following critical values (maximum tolerable levels) for trace elements in agricultural soils were proposed: Pb — 90 ppm, Zn — 150—300 ppm, Cu — 80—140 ppm, Cd — 1.6—3 ppm [7].

The high Pb contents in soils treated only with manure and NPK may be determined by the formation of some organo-mineral, insoluble compounds. The presence of CaCO₃ determined a 30—40% decrease in Pb content, which might be due to mineralization of organic substance and to Pb uptake by plants in this area. Lead is known to have a relatively low mobility in soil, but at high concentrations it may become the source of excessive accumulations in plants, mostly in the roots [9, 12]. Scientific information points out that cereal seeds contain between 0.2 and 1 mg kg⁻¹ d.w. Pb, even in soils treated with sewage sludge [12]. As compared to these values, our results reveal higher Pb concentrations both in corn caryopses and potato tubercles, without any correlation to doses and treatment variants.

The about 3-fold increase of Zn concentration in soil treated with fertilizers without CaCO₃ might be determined by the formation of insoluble compounds, that prevent Zn uptake. This idea is also confirmed by Zn concentration in the vegetal material, diminished as compared to the control, especially in potato tubercles. An additional CaCO₃ treatment intensifies Zn accumulations in corn caryopses. Bibliographic information mentions the root and leaves as organs with the highest Zn accumulation [3]. Davis [6] found that at 40 mg kg⁻¹ Zn in soil the *Arachis hypogaea* L. leaves had 400—500 ppm Zn, while Dudka *et al.* [7] found 97.5 ppm Zn in grains of *Triticum vulgare* L. grown in soils with 300 ppm Zn. The study of fertilizer efficiency in cotton [10] revealed Zn distribution as 23% in leaves, 18% in stems and 48% (30 mg kg⁻¹) in seeds, while Cu was distributed as 26% in stem, 29% in leaves and 28% (5.4 mg kg⁻¹) in seeds. Schumacher *et al.* [14] reported very low Zn and Cu concentrations in potato tubercles (as compared to the values resulted from our experiments), namely 2.81—3.47 ppm Zn, and 1.38—1.69 ppm Cu, respectively.

Both Zn and Cu are essential nutrients for plants, but an excessive accumulation may cause harmful structural and physiological effects.

High concentrations lead to chlorosis, inhibit the radicular growth, alter the permeability of plasma membrane, having negative effects in the absorption and transfer of Ca, Mg, Fe, K [3, 6, 7, 11]. Besides all these aspects, there is another important one: the heavy metal concentration in the plant tissues used as food. As compared to the admitted levels for Zn (15 mg/day) and Cu (2—3 mg/day) [14], the concentrations we have obtained are among the relatively normal values for Zn in corn caryopses and tubercles, but they are high for Cu in potato tubercles.

Though Cd was not present in the experimental vegetal material, we suppose its presence in other organs, considering the results mentioned by other authors [3, 4, 7, 13]. During the experiments with spring wheat grown in Cd-treated soil, D u d k a *et al.* [7] obtained higher Cd levels in stems and grains, considering them as dangerous for animals, as a concentration of 0.5 mg kg⁻¹ Cd in fodder causes chronic toxicity. The authors consider that the ability of cultivated plants to tolerate high contents of Cd without showing any symptoms of toxicity creates a serious problem in terms of animal and human poisoning with this metal through the food chain.

Conclusions. 1. Applying manure and NPK to contaminated soils determined an increase in the soil contents of Pb, Zn and Cd, as a probable result of the formation of some organo-mineral, insoluble compounds. The improving treatments with CaCO₃ contributed to the increase of solubility of chemical compounds and uptake of metals, especially Pb. There are no significant changes in Fe contents.

2. The heavy metal concentrations, higher in potato tubercles than in corn caryopses, might be the result of some tolerance mechanisms to the excess of heavy metals manifested by fixation of potentially toxic elements in the vegetative organs.

3. Examining of heavy metal contents in plants represents an estimation method for the quality of soils in industrial areas, but the method needs to be applied to all the plant organs, especially when such plants are consumed as food. The uptake and concentration of heavy metals may be significantly different both among plant species and various plant parts.

REFERENCES

1. Băthory, D., Bercea, V., Rusu, A., *Manifestări metabolice sub influența factorilor de poluare la nivelul frunzelor de jag și carpen*, „Contrib. Bot.” (Cluj-Napoca), 1991—1992, 203—208.
2. Bercea, V., Băthory, D., *Neutralizarea efectului toxic al poluanților cu SO₂ la salcâm (Robinia pseudacacia L.) prin aplicarea de soluții bazice fertilizante*, „Contrib. Bot.” (Cluj-Napoca), 1993—1994, 185—192.
3. Brune, A., Dietz, K. J., *A comparative analysis of element composition of roots and leaves of barley seedlings grown in the presence of toxic cadmium, molybdenum, nickel, and zinc concentrations*, „J. Plant Nutr.”, 18, 1995, 853—869.

4. Costa, G., Morel, J. L., *Water relations, gas exchange and amino acid content in Cd-treated lettuce*, „Plant Physiol. Biochem.“, 32, 1994, 561—570.
5. Cumming, J. R., Tomsett, A. B., *Metal tolerance in plants: signal transduction and acclimation mechanisms*, in Adriano, D. C. (Ed.), *Biogeochemistry of Trace Metals*, pp. 329—364, Lewis, Boca Raton, 1992.
6. Davies, B. E., *Inter-relationships between soil properties and the uptake of cadmium, copper, lead and zinc from contaminated soils by radish (Raphanus sativus L.)*, „Water, Air Soil Pollut.“, 63, 1992, 331—342.
7. Dudka S., Piotrowska, M., Chlopecka, A., *Effect of elevated concentrations of Cd and Zn in soil on spring wheat yield and the metal contents of the plant*, „Water, Air Soil Pollut.“, 76, 1994, 333—341.
8. Haygarth, P. M., Jones, K. C., *Atmospheric deposition of metals to agricultural surfaces*, in Adriano, D. C. (Ed.), *Biogeochemistry of Trace Metals*, pp. 249—276, Lewis, Boca Raton, 1992.
9. Kahle, H., *Response of roots of trees to heavy metals*, „Environ. Exp. Bot.“, 33, 1993, 99—119.
10. Mullins, G. L., Burmester, C. H., *Accumulation of copper, iron, manganese and zinc by four cotton cultivars*, „Field Crops Res.“, 32, 1993, 129—140.
11. Ouzounidou, G., *Copper-induced changes on growth, metal content and photosynthetic functions of Alyssum montanum L. plant*, „Environ. Exp. Bot.“, 34, 1994, 165—172.
12. Piotrowska, M., Dudka, S., Ponce, H. R., Witek, T., *The spatial distribution of lead concentrations in the agricultural soils and main crop plants in Poland*, „Sci. Total Environ.“, 158, 1994, 147—155.
13. Punz, W. F., Sieghardt, H., *The response of roots of herbaceous plant species to heavy metals*, „Environ. Exp. Bot.“, 33, 1993, 85—98.
14. Schuhmacher, M., Domingo, J. L., Llobet, J. M., Corbella, J., *Chromium, copper and zinc concentrations in edible vegetables grown in Tarragona Province, Spain*, „Bull. Environ. Contam. Toxicol.“, 50, 1993, 514—521.
15. Tiller, K. G., *Heavy metals in soils and their environmental significance*, „Adv. Soil Sci.“, 9, 1989, 113—142.

EFFECTS OF DIETHYLSTILBESTROL ON CALCIUM FLUXES THROUGH THE INNER MEMBRANE OF RAT HEPATIC MITOCHONDRIA

FERENC KOSA* and CORNELIU TARBA*

SUMMARY. — The effects of diethylstilbestrol (DES) on Ca^{2+} transport in isolated rat liver mitochondria have been studied by the use of spectrophotometric methods, employing arsenazo III for Ca^{2+} and safranin for membrane potential. In the concentration range studied (3—43 μM), DES produces an efflux of the accumulated calcium. Up to 23 μM DES, the efflux is reversible and can be inhibited by ruthenium red (RR), which indicates that it probably occurs through the calcium uniporter. The efflux can be explained by the reduction of the membrane potential observed under these conditions. Above 26 μM DES, the calcium efflux becomes irreversible and cannot be inhibited by RR. The phenomenon is accompanied by membrane potential collapse and irreversible swelling of mitochondria. Up to 20 μM , DES also inhibits the Na^{+} -independent Ca^{2+} efflux measured in the presence of RR. By collapsing the membrane potential generated by respiration or by addition of valinomycin to mitochondria suspended in a low K^{+} medium, DES also inhibits Ca^{2+} influx through the calcium uniporter.

Diethylstilbestrol (DES) is an artificial estrogen which was given world-wide to more than two millions of pregnant women during a period of about 3 decades, starting in 1947, in the mistaken belief that it would prevent miscarriage [6, 7]. Instead, years later, it caused cancer in some of the children born out of these pregnancies and non-cancerous abnormalities in many others [6, 7].

DES was also used virtually without restraint for over 40 years as a growth stimulant in ruminants and chickens [6]. It has been estimated that from 1955 until 1979 (when it was banned), DES was administered to almost 80% of the cattle and lambs in U.S.A. [8].

Evaluating the available scientific information, the International Agency for the Research on Cancer (IARC/WHO) has estimated that there was sufficient evidence for DES to be classified as a human carcinogen [7].

Despite its well-documented carcinogenicity in humans and experimental animals, the mechanism of action of DES still remains obscure. However, certain data are now available regarding its action on several membrane-dependent processes. Thus, it has been shown that DES is a new kind of energy transduction inhibitor, acting on mitochondrial ATP synthase [10, 11] and respiratory enzymes [16]. In previous studies [5, 16], we have also demonstrated an uncoupling effect on oxidative phosphorylation, besides its inhibitory effect.

* Babeș-Bolyai University, Department of Animal Physiology, 3400 Cluj-Napoca, Romania

In eukaryotic cells, DES is the only agent known to inhibit all three classes of proton ATPases, i.e. the P type, the V or vacuolar type and F or F_0F_1 type [12]. It also inhibits the Ca^{2+} pump of the sarcoplasmic reticulum (SERCA) as well as that of the plasma membrane (PMCA) [9] (also, Kósa and Magócsi, unpublished observations). The cytosolic free Ca^{2+} concentration (10^{-7} M) is four orders of magnitude lower than the free Ca^{2+} concentration found in the extracellular fluid. Such a low cytosolic calcium concentration is achieved through the concerted action of Ca^{2+} transporters present in the plasma membrane, endoplasmic reticulum and mitochondria. Under the conditions in which the calcium translocation across the SERCA and PMCA type Ca^{2+} pumps are markedly decreased, following the administration of DES, the maintenance of Ca^{2+} homeostasis could rely on the capacity of mitochondria to sequester excess amounts of calcium and thus buffer cytosolic Ca^{2+} concentration.

Intramitochondrial Ca^{2+} homeostasis is controlled by a well-defined uptake pathway and by release mechanisms that have been only partially characterized.

Ca^{2+} uptake in mitochondria is mediated through a specific, electrogenic, ruthenium red (RR)—inhibitible uniporter, driven by the Ca^{2+} electrochemical gradient [3]. Ca^{2+} uptake can be naturally energized by respiration-linked or ATP-linked proton extrusion and, artificially, by the diffusion potential set up by the outward flux of K^+ induced by valinomycin [3], a specific K^+ ionophore.

The primary Ca^{2+} efflux mechanism of mitochondria from heart, brain, skeletal muscle, parotid gland, adrenal cortex, brown fat tissue and most tumours appear to be a Ca^{2+}/nNa^+ exchange [3, 19]. In contrast, the primary efflux mechanism of liver, kidney, lung and smooth muscle is Na^+ -independent [3, 19]. However, there seems to be some Na^+ -dependent efflux in liver mitochondria, too [18]. In addition, Ca^{2+} may be released from mitochondria due to a reversible increase of inner membrane permeability triggered by permeability transition (PT) inducers (P_i , *tert*-butyl-hydroperoxide, etc.), through the formation of the so-called permeability transition pore (PTP) [3, 19, 20]. The increase of the inner membrane permeability is unspecific and is characterized by leakiness to small ions and proteins, swelling of mitochondria, collapse of membrane potential ($\Delta\psi$) [3, 19, 20]. The PTP is inhibited very specifically by nanomolar concentrations of cyclosporin A [19, 20].

Nothing is known about the effects of DES on any of these calcium transport systems in rat liver mitochondria. To our knowledge, there is only one article describing the inhibitory effect of DES on the calcium influx in the mitochondria of the human myometrium [1]. Therefore, in the present study, we examined DES effects on Ca^{2+} transport systems of rat liver mitochondria (RLM).

Materials and methods. Mitochondria were isolated from the livers of freshly decapitated white rats (150–250 g) of an inbred Wistar line, essentially according to Johnson and Lardy [4]. The isolation medium consisted of

250 mM sucrose, 5 mM Tris-HEPES (pH 7.3), 0.15 mM EDTA and 0.1 mM EGTA, while the washing and suspending media lacked the chelating agents.

All measurements were recorded with a Specord M-40 spectrophotometer (Carl Zeiss, Jena) and were carried out at room temperature in a standard medium containing 250 mM sucrose, 10 mM Tris-HEPES (pH 7.4) and $10 \mu\text{M Ca}^{2+}$, at a mitochondrial protein concentration of 1 mg/ml.

Ca^{2+} movements across the mitochondrial inner membrane were followed by monitoring the absorbance changes of the metallochromophoric dye arsenazo III ($25 \mu\text{M}$), at 660 nm [13]. At the concentrations used, DES does not interfere with the spectral characteristics of arsenazo III or with its calcium binding properties.

Membrane potential generated by succinate respiration was estimated by the use of safranin ($10 \mu\text{M}$). The absorbance changes of this dye were recorded at 540 nm, under conditions generally similar to those described previously [14–16]. Unlike in the case of diS-C₂-(5) (a cyanine dye) [16], DES did not interfere with the safranin response to membrane potential. To avoid interference with swelling, a special procedure was used, in which the dye was present only in the sample cuvette and all additions were made concomitantly in both cuvettes (see [15, 16]).

Mitochondrial swelling was measured by the apparent absorbance changes at 540 nm, in the absence of any indicator, making additions only to the sample cuvette.

All the chemicals used were of analytical grade. DES, HEPES, rotenone, valinomycin, nigericin, safranin, ruthenium red and arsenazo III were from Sigma, Tris from Merck and sucrose from Serva.

Results and discussion. *DES effects on Ca^{2+} efflux.* As can be seen from Fig. 1 (trace A), the addition of succinate to a RLM suspension initiated a process of calcium uptake which reached a steady state in about 2–3 min. The DES-induced Ca^{2+} release is concentration-dependent. The addition of $3.3 \mu\text{M}$ DES initiates a process of Ca^{2+} efflux, which leads to a new steady state in 1–2 min. As can also be seen, increasing DES concentrations produce a gradual efflux of the accumulated calcium. A complete efflux of the accumulated calcium occurs at a final concentration of $42.9 \mu\text{M}$ DES.

Since several mechanisms have been suggested to account for xenobiotic-induced Ca^{2+} release, such as non-specific membrane damage, decreased transmembrane potential, increased mitochondrial inner membrane permeability [3], the contribution of each of these mechanisms to DES-induced mitochondrial Ca^{2+} release was investigated.

Parallel measurements of $\Delta\psi$ were performed under the same conditions as above. Upon energization with succinate, in the presence of rotenone, mitochondria generated a $\Delta\psi$ stable for several minutes (Fig. 1, trace B). The addition of DES resulted in a concentration-dependent decrease in $\Delta\psi$. $26.4 \mu\text{M}$ DES collapses completely the membrane potential. As $\Delta\psi$ is the main driving force for mitochondrial Ca^{2+} uptake [3], a reduction in the membrane potential to such a degree as that seen in our experiments is sufficient to explain the efflux of calcium. The decrease of membrane potential by DES may be explained by the protonophoric action of this drug. McENERY [11] showed that in phosphatidylcholine (PC) liposomes, at the same con-

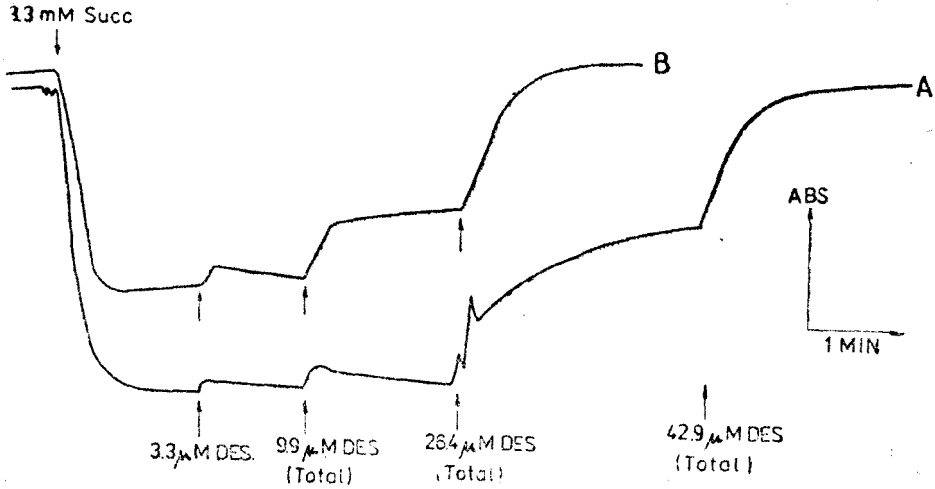


Fig. 1. Effects of increasing concentrations of DES on mitochondrial calcium fluxes (A) and membrane potential (B).

RLM were incubated at a protein concentration of 1 mg/ml in the standard medium (see „Materials and methods”). After the release of the endogenous calcium, in the presence of $6.6 \mu\text{M}$ rotenone, $10 \mu\text{M}$ Ca^{2+} was added and mitochondria were energized with 3.3 mM succinate (Succ.). Different concentrations of DES were added at the sites indicated. Trace A was recorded in the presence of $25 \mu\text{M}$ arsenazo III, at 660 nm , and trace B in the presence of $10 \mu\text{M}$ safranin, at 540 nm . An upward deflection indicates calcium efflux (trace A) or membrane potential decrease (trace B). The length of the standard arrow for absorbancy (ABS) is 0.05 units in A and 0.1 units in B.

concentrations as those used by us, DES induced proton transport through the lipid bilayer. In a previous paper [16], we have also presented indirect evidence in this respect, as deduced from the uncoupling effect of DES on oxidative phosphorylation.

The drug ruthenium red ($3.3 \mu\text{M}$) increases the membrane potential (Fig. 2, trace B) and inhibits the calcium efflux induced by 3.3 – $20 \mu\text{M}$ DES (Fig. 2, trace A). Even though additions of DES (below $26 \mu\text{M}$ DES) do not produce calcium efflux, they slightly depolarize the membrane. However, $26.4 \mu\text{M}$ DES produces an appreciable calcium efflux and a strong decrease of membrane potential (Fig. 2, traces A and B).

The nature of DES-induced Ca^{2+} efflux seems to be related to the reversal of the uniporter, subsequent to the decrease of $\Delta\psi$, rather than to the activation of an independent Ca^{2+} efflux pathway. This assumption is supported by our findings that the DES-induced efflux is considerably faster than that reported for the Na^+ -independent, Ca^{2+} efflux pathways [18] and that the efflux is inhibited by RR. Up to the concentration of $23 \mu\text{M}$ DES, Ca^{2+} effluxes are reversible: addition of $0.25 \mu\text{g/ml}$ nigericin produces a transient reaccumulation of calcium in the mitochondrial matrix (Fig. 3, trace B). These data thus

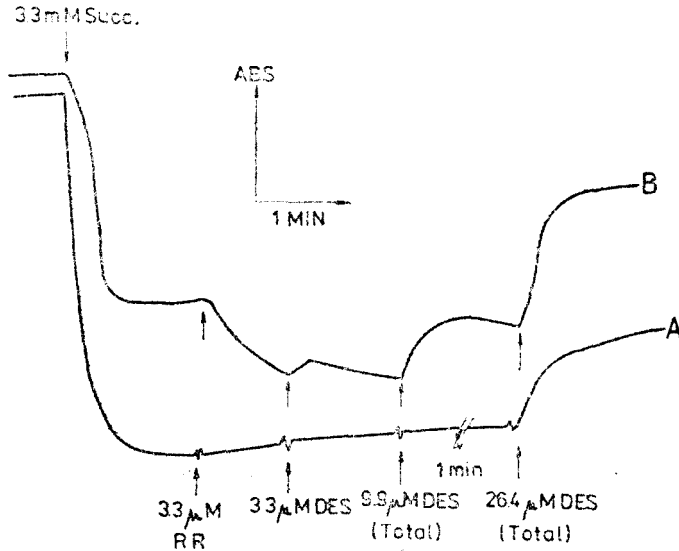


Fig. 2. Effects of increasing concentrations of DES on mitochondrial calcium fluxes (A) and membrane potential (B) in the presence of $3.3 \mu\text{M}$ ruthenium red (RR).

The rest of the conditions are identical to those in Fig. 1.

exclude the possibility that the Ca^{2+} efflux produced by $3\text{--}26 \mu\text{M}$ DES could be due to an irreversible damage of the inner mitochondrial membrane. Such irreversible damages, however, take place at concentrations above $26 \mu\text{M}$ DES. At these concentrations, the Ca^{2+} efflux is no longer reversible, $\Delta\psi$ is collapsed and the efflux cannot be inhibited by RR. At the same time, DES also produces an irreversible swelling of mitochondria (Fig. 3, trace A).

The efflux of the accumulated calcium, produced by concentrations of DES higher than $26 \mu\text{M}$, in the presence of RR (Fig. 2, trace A) may be explained both through the irreversible damages of the inner mitochondrial membrane (IMM) and/or by the induction of the permeability transition, i.e. the opening of the PTP, when there is enough calcium accumulated in the matrix, if RR and a protonophore are simultaneously present. Taking into account the protonophoric activity of DES [11], the three conditions necessary for PT induction are concomitantly satisfied in the experiment presented in Fig. 2. While the Ca^{2+} efflux in Fig. 1 (trace A) can be entirely explained by the irreversible damages of the mitochondrial membranes, for the explanation of the efflux observed in the presence of RR (Fig. 2, trace A) one could not eliminate the induction of the permeability transition, in addition to the irreversible damages. Since both membrane damages and the permeability transition are accompanied by a similar sympto-

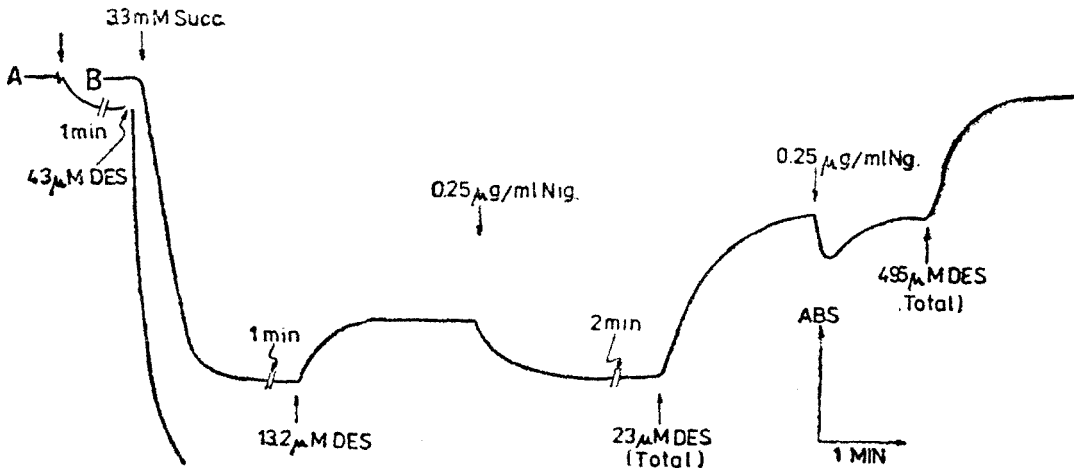


Fig. 3. A. Swelling of Ca^{2+} -loaded RLM induced by $43 \mu\text{M}$ DES. B. Reversibility of DES-induced Ca^{2+} efflux.

Conditions are similar to those in Fig. 1. In A, the recording was performed at 340 nm in the absence of rotenone and any indicator; in B, $0.25 \mu\text{g/ml}$ nigericin (Nig) was added as indicated, under basal conditions equivalent to those in trace A of Fig. 1.

matology (membrane potential collapse, RR uninhabitable Ca^{2+} efflux, irreversible swelling), the degree of contribution of the two mechanisms to the calcium efflux observed in the presence of RR cannot be estimated by the methods used in the present study.

Na^+ -independent Ca^{2+} efflux can be observed if RR is added to mitochondria which have previously accumulated calcium (Fig. 4). Since RR inhibits both the calcium influx and efflux through the uniporter, the efflux observed in the presence of RR is due exclusively to the Na^+ -independent calcium transport (in the absence of Na^+ , as in our experiments, the $\text{Ca}^{2+}/\text{nNa}^+$ antiporter, also present in RLM is not functioning). One can see that the Na^+ -independent calcium efflux (Fig. 4) is much slower than the calcium efflux through the uniporter (Fig. 1, trace A).

As can be observed from Fig. 4, up to approximately $20 \mu\text{M}$ DES, there is an inhibition of the Na^+ -independent calcium efflux. At higher concentrations, however, even in the presence of RR, due to its protonophoric activity, DES produces permeability transition and calcium efflux.

DES effect on Ca^{2+} influx. The effects of DES on the calcium influx generated by succinate respiration or by the use of valinomycin are shown in Fig. 5. Regardless of the way in which the electrochemical gradient was generated, concentrations of $10 \mu\text{M}$ DES inhibited the Ca^{2+} influx. Because DES produces a rapid efflux of the calcium accumulated through the uniporter, the inhibition of the calcium in-

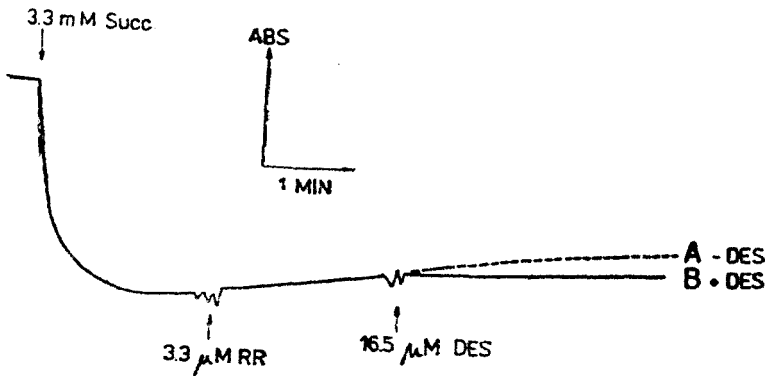


Fig. 4. DES inhibition of ruthenium red-induced Ca^{2+} efflux. Conditions are similar to those in trace A of Fig. 2.

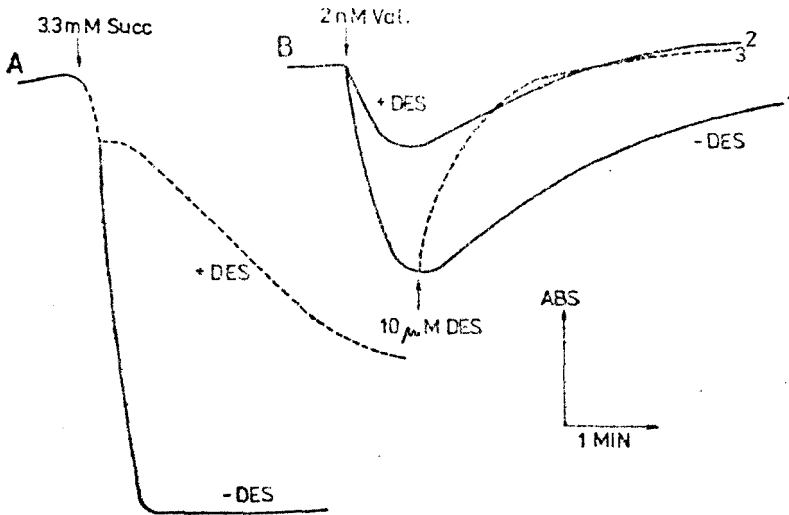


Fig. 5. Inhibition by $10 \mu M$ DES of succinate-generated (A) and valinomycin-generated (B) Ca^{2+} influx.

Conditions are similar to those in trace A of Fig. 1, but DES was added two minutes before succinate and valinomycin (Val.).

flux cannot be explained by a direct inhibition of DES on the uniporter.

The inhibition of calcium influx generated by succinate respiration (Fig. 5A), is indirect and can be explained by the reduction of the membrane potential, the most important component in the induction and maintenance of Ca^{2+} influx. DES affects $\Delta\psi$ by at least two mechanisms: on one side, by inhibiting directly the respiratory chain enzymes [5, 16] and, on the other, by its protonophoric activity.

In the case of the calcium influx generated with the aid of the valinomycin-induced membrane potential (Fig. 5B), protonophoric agents (including DES) also inhibit the process by collapsing this potential. It is known from the literature data that the diffusion potential generated by valinomycin in the presence of a K^+ gradient induces a proton influx by increasing the so-called non-ohmic conductance of IMM for protons [2]. We have observed (data not shown in the figure) that in the presence of DES the collapse of the valinomycin-generated membrane potential is also accelerated. The mechanism of this effect, however, may be almost as complex as that discussed in the case of the respiration-dependent calcium transport.

In conclusion, our results indicate that DES could act on the mitochondrial calcium transport by several related indirect mechanisms, depending on concentration: increase of IMM permeability for protons, induction of the permeability transition and/or membrane damage. The loss of the mitochondrial ability to retain calcium could clearly compromise their function as a buffer of the cytosolic Ca^{2+} concentration during DES-induced cytotoxicity and may lead to the inappropriate stimulation of a number of Ca^{2+} -activated catabolic enzymes, such as proteases, phospholipases and endonucleases [7], with grave consequences on the survival capacity of both mitochondria and cell.

REFERENCES

1. Batra, S., Bengtsson, L. P., *Inhibition by diethylstilbestrol of calcium uptake by human myometrial mitochondria*, „Eur. J. Pharmacol.", **18**, 1972, 281—283.
2. Brown, G. C., Brand, M. D., *Changes in permeability to protons and other cations at high proton motive force in rat liver mitochondria*, „Biochem. J.", **234**, 1986, 75—81.
3. Gunter, T. E., Pfeiffer, D. R., *Mechanisms by which mitochondria transport calcium*, „Am. J. Physiol.", **258**, 1990, C755—C786.
4. Johnson, D., Lardy, H., *Isolation of liver or kidney mitochondria*, in Colowick, S. P., Kaplan, N. O. (Eds.), *Methods in Enzymology*, Vol. 10, pp. 94—96, Acad. Press, New York, 1967.
5. Kósa, F., Tarba, C., *Multiple effects of diethylstilbestrol on certain bioenergetic functions of rat liver mitochondria*, „Stud. Cercet. Biochim.", **32** (1), 1989, 59.
6. Laštman, C., *DES on prescription: it's time for Europe to act*, „Sci. Eur.", (Oct.), 1990, 27—29.
7. Marselos, M., Tomatis, L., *Diethylstilbestrol: I. Pharmacology, toxicology and carcinogenicity in humans*, „Eur. J. Cancer", **3A** (6/7), 1992, 1182—1189.
8. Marselos, M., Tomatis, L., *Diethylstilbestrol: II. Pharmacology, toxicology and carcinogenicity in experimental animals*, „Eur. J. Cancer", **29A** (1), 1993, 149—155.
9. Martínez-Azorin, F., Ternel, J. A., Fernández-Belda, F., Gómez-Fernández, J. C., *Effects of diethylstilbestrol and related compounds on the Ca^{2+} -transporting ATPase of sarcoplasmic reticulum*, „J. Biol. Chem.", **267**, 1992, 11923—11930.

10. Mc Enery, M. W., Hulihan, J., Pedersen, P. L., *F₀ „proton channel“ of rat liver mitochondria — rapid purification of a functional complex and a study of its interaction with the unique probe diethylstilbestrol*, „J. Biol. Chem.“, **264**, 1989, 12029—12036.
11. Mc Enery, M. W., Pedersen, P. L., *Diethylstilbestrol: A novel F₀-directed probe of the mitochondrial proton ATPase*, „J. Biol. Chem.“, **261**, 1986, 1745—1752.
12. Pedersen, P. L., Carafoli, E., *Ion motive ATPase. I. Ubiquity, properties, and significance to cell function*, „Trends Biochem. Sci.“, **12**, 1987, 146—150.
13. Scarpa, A., *Measurements of cation transport with metallochromic indicators*, in Colowick, S. P., Kaplan, N. O. (Eds.), *Methods in Enzymology*, Vol. 56, Part. G, pp. 301—338, Acad. Press, New York, 1979.
14. Tarba, C., *Membrane potentials in mitochondria estimated by absorption of cyanine dye*, „Rev. Roum. Biochim.“, **20**, 1983, 61—65.
15. Tarba, C., Crăciun, C., *A comparative study of the effects of procaine, lidocaine, tetracaine and dibucaine on the functions and ultrastructure of rat liver mitochondria*, „Biochim. Biophys. Acta“, **1019**, 1990, 19—28.
16. Tarba, C., Kósa, F., *Effects of diethylstilbestrol on oxidative phosphorylation of rat liver mitochondria*, „Stud. Univ. Babeş-Bolyai, Biol.“, **35** (2), 1990, 61—69.
17. Trump, B. F., Berezesky, I. K., *Calcium-mediated cell injury and cell death*, „FASEB J.“, **9**, 1995, 219—228.
18. Wingrove, D. F., Gunter, T. E., *Kinetics of mitochondrial calcium transport. I. Characteristics of the sodium-independent calcium efflux mechanism of liver mitochondria*, „J. Biol. Chem.“, **261**, 1986, 15159—15165.
19. Zoratti, M., Szabó, I., *Channels and currents of the inner mitochondrial membrane*, in Menon, J. (Ed.), *Trends in Biomembranes & Bioenergetics*, Vol. 1, pp. 263—329, Compilers Intl., Trivandrum (India), 1991.
20. Zoratti, M., Szabó, I., *The mitochondrial permeability transition*, „Biochim. Biophys. Acta“, **1241**, 1995, 139—176.

EVOLUȚIA ACTIVITĂȚII TRANSAMINAZELOR SERICE ÎN TOXICOZA HEPATICA INDUSĂ CU TETRAKLORURĂ DE CARBON LA ȘOBOLANI DE DIFERITE VÂRSTE

NICOLAE BUCUR* și MIRCEA A. RUSU*

SUMMARY. — Evolution of the Activity of Serum Transaminases in Liver Toxicosis Induced by Carbon Tetrachloride in Rats of Different Ages. The evolution of the activity of serum transaminases has shown that the reactivity of rats to the toxic action of carbon tetrachloride is high at younger ages, at which the processes of liver recovery are also more intense. These findings were confirmed by histological and histoenzymological analyses of liver.

Impactul xenobioticelor cu organismul uman și animal produce în anumite condiții (doze, durată de tratament) alterări ale homeostaziei funcționale și ale structurilor la nivelul unor organe de obicei denumite „țintă“. Printre aceste organe un loc central îl ocupă ficatul, care datorită echipamentului său enzimatic bogat și adecvat participă prioritar la metabolizarea xenobioticelor. La nivel experimental se utilizează numeroase substanțe cu tropism hepatic care provoacă leziuni hepatice tipice „standard“ care permit studierea evoluției proceselor patologice în vederea utilizării unor produse hepatoprotectoare. În experiențele noastre am inițiat studierea afectării hepatice de către tetrachlorură de carbon (CCl_4), o substanță foarte utilizată în hepatologia experimentală [7], dar ale cărei mecanisme de acțiune au fost evidențiate recent, și nu în totalitate. Intoxicarea cu CCl_4 este un model util și practic de studiere a proceselor de fibrozare [8], reprezentând, în același timp, un model adecvat și pentru studierea, prin asemănare, a hepatitei umane [4]. Unul din efectele remarcabile ale acțiunii tetrachlorurii de carbon este creșterea majoră a transaminazelor serice.

În cercetările noastre am urmărit evoluția în ontogenie a activității transaminazelor serice în toxiciza hepatică indusă cu CCl_4 la șobolanul alb.

Material și metode. Șobolanii din rasa Wister alb masculi în vârste diferite (4 vârste) au fost intoxicați cu CCl_4 , timp de 7 zile. S-au sacrificat imediat după intoxicare, iar o parte după o perioadă de refacere de 7—20 zile. Din sângele recoltat s-a determinat activitatea transaminazelor serice cu metoda Reitman—Fronkel. De asemenea, s-a studiat histologia și histoenzimologia ficatului cu metode uzuale [5].

Experimentul Ia. Lotul intoxicat cu CCl_4 este notat cu C. Șobolanii juvenili în vârstă de 21 de zile, în greutate medie de 35 g, au primit, fiecare, zilnic câte 0,03 ml CCl_4 în 0,3 ml ulei de floarea soarelui/100 g greutate corporală, timp de 7 zile. Perioada de refacere a fost de 10 zile.

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

Experimentul Ib. Șobolani juvenili în vârstă de 30 de zile și greutate medie de 48 g au primit zilnic câte 0,05 ml CCl_4 în 0,3 ml ulei de floarea soarelui/100 g greutate corporală, timp de 7 zile. Perioada de refacere a fost de 20 de zile.

Experimentul II. S-au folosit șobolani tineri în vârstă de 42 de zile, în greutate de 70 g. Fiecare animal a primit, zilnic, câte 0,1 ml CCl_4 în 0,3 ml ulei de floarea soarelui/100 g greutate corporală, timp de 7 zile. Animalele au fost sacrificate după 7, 14 și, respectiv 21 de zile.

Experimentul III. Animale adulte în greutate de 200 g au fost tratate ca cele din experimentul II.

Rezultate și discuții. În cazul experimentului I, nivelul transaminazelor serice, în special activitatea GPT, a crescut la lotul intoxicat cu 196% față de lotul martor, iar activitatea GOT a crescut cu 105%. După perioada de refacere de 10 zile, activitatea GPT a scăzut până la 23%, iar cea a GOT la 5% (Fig. 1).

În experimentul Ib, creșterea activității GPT la lotul intoxicat a fost de 378%, în timp ce activitatea GOT a crescut cu 68%. După cele 20 de zile de refacere, nivelul transaminazelor a scăzut până la nivelul martorilor (Fig. 2).

În experimentul II, efectul intoxicației asupra șobolanilor tineri a fost foarte puternic: activitatea GPT a crescut la 434 μ g acid piruvic/ml ser, față de 75 μ g cât au avut martorii (creștere cu 476%). Nivelul GOT a fost de +56% față de lotul martor. După 7 zile de repaos, ambele activități s-au micșorat. După 14 zile de refacere, activitatea a scăzut la +12% la GPT și la -2% la GOT, față de lotul martor (Fig. 3).

În experimentul III, la șobolanii adulți intoxicația provocată de CCl_4 a dus la creșterea ambelor activități, creșterea fiind de 450% la

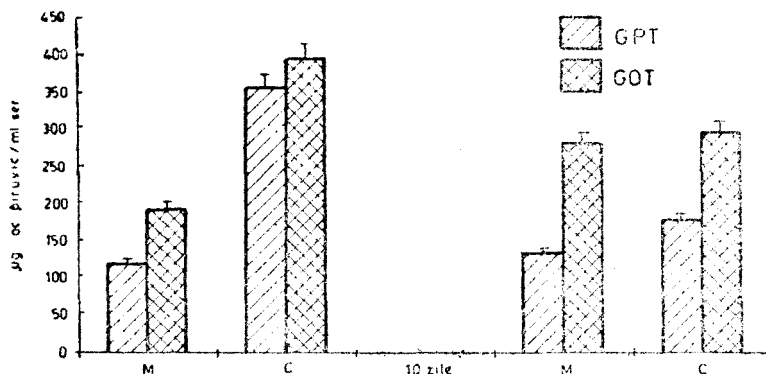


Fig. 1. Experimentul Ia. Șobolani juvenili în vârstă de 21 zile.

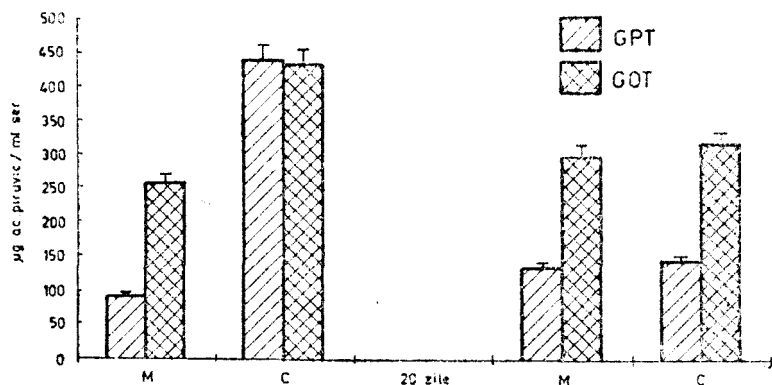


Fig. 2. Experimentul Ib. Șobolani juvenili în vârstă de 30 zile.

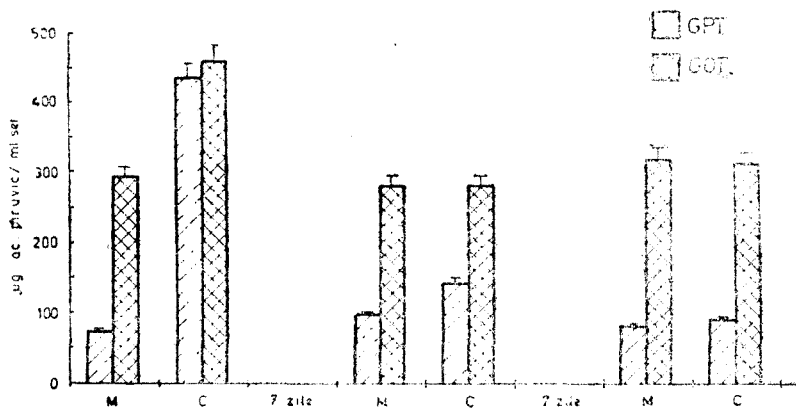


Fig. 3. Experimentul II. Șobolani tineri.

GPT și de 520% la GOT. După 14 zile de refacere, nivelul ambelor transaminaze serice a revenit la normal (Fig. 4).

Transaminazele serice, în special GPT, sunt elemente importante în definirea agresiunii și leziunilor hepatice apărute consecutiv intoxicației cu tetraclorură de carbon. Datele noastre obținute în ontogenie confirmă astfel unele rezultate din literatura de specialitate [1, 6, 9], subliniind faptul că creșterea activității transaminazelor însoțește obligatoriu, ca elementul de bază, procesele lezionale complexe determinate de intoxicația acută cu CCl_4 . Această creștere a activității transaminazelor serice și în special a GPT (care este caracteristică ficatului [2]), are la bază multiple cauze legate de modificarea proceselor de oxidoreducere și fosforilare oxidativă care implică apoi modificări limitative negative în ceea ce privește activitatea de transport, permeabilitatea

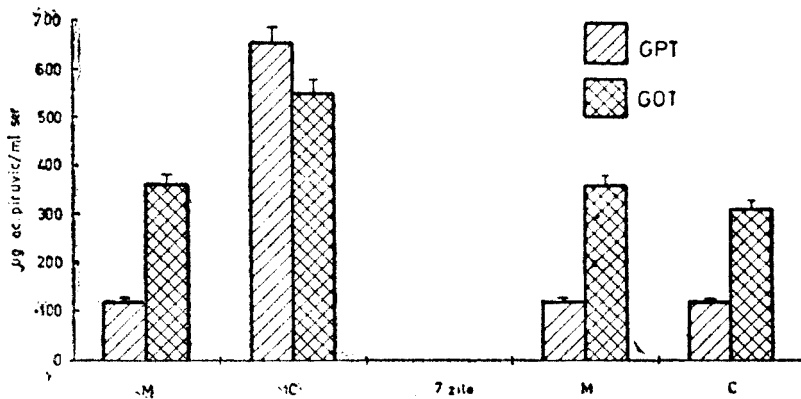


Fig. 4. Experimentul III. Șobolani adulți.

membranelor extra- și intracelulare. La nivel histologic sunt modificări pregnante care constă în principal în celule și zone cu celule balonizate, celule în necrobioză în special în zona a III-a acinară și steatoză, ceea ce confirmă numeroasele date din literatura de specialitate privitoare la efectele CCl_4 [3], precum și corelația strânsă existentă între extinderea necrozelor și mărimea „revărsării” transaminazelor în ser [1]. Observarea în ontogenie a evoluției transaminazelor aduce anumite aspecte inedite în cercetarea toxicozei cu tetraclorură de carbon, evidențiind unele particularități de reactivitate ale organismului în funcție de vârstă.

Concluzii. Evoluția activității transaminazelor serice GPT și GOT a arătat că reactivitatea șobolanilor la acțiunea toxică a CCl_4 este crescută la vârstele mai tinere, la care și procesele de refacere hepatică sunt mai intense. Aceste rezultate au fost confirmate de analizele histologice și histoenzimologice ale ficatului.

BIBLIOGRAFIE

1. Bang, S., Myren, P., Linnestad, P., *Effects of the prostaglandine E_2 analogue enprostil on the carbon tetrachloride induced necrosis of liver cells in mice*, „Acta Pathol. Microbiol. Immun. Scand. (APMIS)”, **100**, 1992, 963—966.
2. Cucuianu, M., *Biochimie clinică*, Ed. Dacia, Cluj-Napoca, 1977.
3. Elsisi, A. E. D., Earnest, D. I., Săpos, I. G., *Vitamin A potentiation of carbon tetrachloride hepatotoxicity: role of liver macrophages and active oxygen species*, „Toxicol. Appl. Pharmacol.”, **119**, 1993, 295—301.
4. Moșoș, G., Sîtcu, E., *Toxicologie clinică*, Vol. I, Ed. Med., București, 1988.
5. Mureșan, E., Bogdan, A. T., Gaboreanu, M., Baba, A. I., *Tehnică de histochimie normală și patologică*, Ed. Ceres, București, 1975.
6. Raucy, J. L., Kraner, J. C., Lasker, J., *Reactivation of halogenated hydrocarbons by cytochrome P450 2E1*, „Crit. Rev. Toxicol.”, **23** (1), 1993, 1—20.

7. Rusu, M. A., Bucur, N., Tămaş, M., *Unele aspecte biochimice și histochimice ale acțiunii unor extracte vegetale în toxiciza cu tetraclorura de carbon*, „Stud. Univ. Babeş-Bolyai, Biol.”, **39** (1), 1994, 89—93.
8. Seifert W. F., Bosma, A., Hendriks, M. F. J., *Beta-carotene (pro-vitamin A) decreases the severity of CCl₄-induced hepatic inflammation and fibrosis in rats*, „Liver”, **15**, 1995, 1—8.
9. Teschke, R., Vierke, R., Goldermann, L., *Carbon tetrachloride levels and serum activities of liver enzymes following acute CCl₄ intoxication*, „Toxicol. Lett.”, **17**, 1993, 171—180.

ASPECTE ALE ACȚIUNII SUCULUI PRESAT DIN
VERONICA OFFICINALIS ASUPRA FICATULUI INTOXICAT CU
TETRACLORURĂ DE CARBON, LA ȘOBOLANI

MIRCEA A. RUSU*, NICOLAE BUCUR*, MIRCEA TAMAS** și
CONSTANTIN PUICA*

SUMMARY. — *Aspects of the Action of Juice Pressed from Veronica officinalis on the Carbon Tetrachloride—Intoxicated Liver in Rats.* The utilisation of juice pressed from *Veronica officinalis* in acute intoxication with carbon tetrachloride produced some positive effects in liver, especially at histological and histochemical levels.

În mediul înconjurător al omului actualmente se acumulează o multitudine de produse chimice, mai mult sau mai puțin toxice, care sunt străine organismului uman și animal. Astfel, s-au acumulat și continuă să se acumuleze în lanțul trofic, al cărui punct final este omul: pesticide, îngrășăminte chimice, aditivi alimentari, solvenți industriali, mase plastice, detergenți, unele medicamente etc. Toate aceste produse intră în categoria substanțelor xenobiotice de natură chimică și afectează într-o măsură mai mare sau mai mică organismul uman sau animal.

Ultimele cercetări au permis înțelegerea accesului xenobioticelor în celule [6]. Ajunse în celule, aceste substanțe în ultima instanță acționează asupra enzimelor prin inhibiția sau chiar stimularea acestora, practic se realizează „leziunile metabolice“ constituind fundamentul unor modificări funcționale și structurale care apoi se manifestă la nivelul diferitelor organe. Un organ „țintă“ al acțiunii xenobioticelor este ficatul [5, 11, 12], deoarece în acest organ se produce metabolizarea cu precădere a majorității xenobioticelor, deși și rinichiul, plămânul sau chiar creierul [3] pot să participe la metabolizarea unor xenobiotice.

Ficatul are capacitatea de a detoxifica organismul, atât de produșii endogeni de metabolism, cât și de produși exogeni (xenobiotice). Această calitate îl face vulnerabil la acțiunea numeroaselor substanțe chimice din mediu.

Ficatul este compus din cel puțin 6 tipuri de celule care cooperează între ele [7, 10]. Actualmente se acceptă structura acinară a ficatului; hepatocitele din zona a III-a în special, dar și din a II-a participă la procesele de metabolizare și detoxifiere a xenobioticelor [7]. Aceste zone sunt cele mai vulnerabile, fiind cele mai expuse leziunilor. Fiind vulnerabil la acțiunea unor substanțe toxice, ficatul este în același timp un organ cu o mare capacitate regenerativă.

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

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

În general, refacerea (regenerarea) hepatică se produce în mod natural la om, după leziunile hepatice cauzate de boli sau de ablații chirurgicale. Pe plan experimental s-au făcut multe cercetări asupra refacerii ficatului, în special la șobolani. Refacerea hepatică este un proces complex care se desfășoară sub influența unor factori stimulatori și inhibitori [2]. În studiile experimentale care se întreprind cu privire la toxicoza și refacerea ficatului există numeroase substanțe chimice (tetraclorură de carbon — CCl_4 , galactozamină, tioacetamidă, nitrozamine, alcool etilic) cu tropism hepatic evident.

CCl_4 este frecvent utilizată, deoarece intoxicația dă rezultate reproductibile și sigure la nivelul ficatului [1, 11]. CCl_4 este prezentă în mediul înconjurător al omului (în industrie ca solvent, în servicii ca agent de curățătorie, medicament pentru combaterea fasciozei, etc.). Intoxicația cu tetraclorură de carbon este folosită pe plan experimental și pentru cunoașterea mecanismelor patologice ale fibrozei și cirozei hepatice [4, 5, 12]. Prin metabolizarea CCl_4 de către citocromul P 450 2E1 [9] se formează radicalul liber — CCl_3 care atacă acizii grași ai lipidelor sau fosfolipidelor, modificând astfel proprietățile biologice ale membranelor celulare și ale organelor.

Cercetările noastre au urmărit desfășurarea în ontogenie a intoxicației cu CCl_4 în ficat, precum și procesul de refacere în mod natural sau mediat de unele produse medicamentoase de origine vegetală.

În ultimele decenii fitoterapia ca știință și practică se bucură de mult interes, inclusiv în medicația protectoare sau curativă a ficatului. În cadrul cercetărilor noastre am utilizat suc presat proaspăt din *Veronica officinalis*, care este o plantă ierboasă din familia *Scrophulariaceae*, cunoscută sub denumirea populară de „ventricică”. Din punct de vedere chimic, planta conține taninuri, flavone, saponine, glicozide, irodoide, etc. Recent, în planta proaspătă s-a semnalat o cantitate foarte mare de superoxid-dismutază. Planta este lipsită de toxicitate și a manifestat efecte remarcabile de protecție în ulcerul gastric indus prin Indometacin.

Material și metode. Sucul proaspăt presat din *Veronica officinalis* s-a obținut din fragmente de plantă mărunțită și presată, obținându-se un suc cu un randament de 52%. Am utilizat acest procedeu pentru a extrage în primul rând enzima responsabilă de efectul de detoxifiere și de a menaja celelalte substanțe din plantă.

Animale de experiență. Am utilizat șobolani adulți din rasa Wistar alb, în greutate medie de 200 g, crescuți în mod corespunzător. Substanțele s-au administrat prin gavaj, dimineața, animalele fiind „à jeun”. Sacrificarea s-a făcut prin secționarea cervicală, recoltându-se sânge pentru determinarea transaminazelor serice GPT și GOT și prelevându-se fragmente de ficat pentru studiul histologic, histoenzimologic și histochimic.

Desfășurarea experiențelor. Experiențele au durat 14 zile fiind structurate în 2 faze a câte 7 zile fiecare.

Faza I: S-a efectuat o intoxicație de 7 zile cu CCl_4 și un tratament concomitent cu extract din *Veronica officinalis*. S-au format următoarele loturi:

— *lotul martor*, notat cu M; fiecare șobolan din acest lot a primit câte 0,2 ml ulei de floarea soarelui/100 g greutate corporală, timp de 7 zile;

— *lotul intoxicat cu CCl₄*, notat cu C; fiecare șobolan din acest lot a primit câte 0,1 ml CCl₄ în 0,2 ml ulei de floarea soarelui/100 g corp, la o administrare, timp de 7 zile;

— *lotul intoxicat cu CCl₄ și tratat cu suc din Veronica officinalis*, notat cu CV; fiecare șobolan primind câte 0,1 ml CCl₄ în 0,2 ml ulei de floarea soarelui/100 g corp. După cca. 40 minute s-a administrat câte 1 ml extract proaspăt din *Veronica officinalis*/100 g corp, zilnic, timp de 7 zile. După 7 zile de tratament s-a efectuat prima sacrificare și recoltare de probe de sânge și ficat.

Faza a II-a. A durat 7 zile. S-a întrerupt intoxicarea cu CCl₄ și s-a administrat în continuare numai suc presat din *Veronica officinalis*, zilnic, timp de 7 zile în doze ca și mai sus. A urmat a doua sacrificare și recoltare de sânge și ficat.

Metode utilizate: metode biochimice, determinarea activității transaminazelor serice GPT și GOT cu metoda Reitman—Frankel; *metode histologice*: colorația cu hematoxilină-eozină; *metode histoenzimologice*: fragmentele de ficat congelate în azot lichid au fost sectionate la criotom și pe secțiunile obținute s-a determinat activitatea următoarelor enzime: lactatdehidrogenaza (LDH), succinatdehidrogenaza (SDH), citocromoxidaza (CyOx), adenozintrifosfataza Mg-dependentă (ATP-aza), fosfataza alcalină și fosfataza acidă (F.ac), folosind metode uzuale [8]; *metode histochimice*: conținutul de lipide totale a fost determinat cu ajutorul colorației cu Sudan negru.

Rezultate și discuții. Faza I. Șobolanii au fost sacrificați după o intoxicație de 7 zile cu CCl₄ și tratament simultan cu suc presat din *Veronica officinalis*. La necropsie se constată modificarea culorii ficatului care devine brun deschis-bej, iar suprafața brobonată.

Indici biochimici (transaminazele serice GPT și GOT). Activitatea GPT crește cu 450% la lotul C și cu 453% la lotul CV. Activitatea GOT crește cu 52% la ambele loturi, în comparație cu lotul martor (Tabel 1).

Indici histologici, histoenzimologici și histochimici. Colorația cu hematoxilină-eozină evidențiază la lotul martor imaginea normală a ficatului. Animalele din lotul C prezintă leziuni severe ale ficatului: aspecte de balonizare celulară cu numeroase celule umflate cu sau fără nucleu și conținut celular, izolate sau unite, care despart zone cu parenchim neafectat; imagini frecvente de distrofie clară și granulară;

Tabel 1

Faza I. Activitatea transaminazelor serice (GPT și GOT)

(Valorile sunt exprimate în μg acid piruvic/ml ser)

	GPT			GOT		
	M	C	CV	M	C	CV
X	118	650	653	360	547	550
n	7	7	7	7	7	7
ES _±	7,5	10,5	11,7	8,9	9,7	8,8
D %	100	550	553	100	152	153
t	—	41,2	38,5	—	14,2	16,0
p	—	<0,001	<0,001	—	<0,001	<0,001

multe celule sunt în necrobioză; imagini de steatoză. La lotul CV se remarcă aceleași tipuri de modificări patologice, în general, dar ele sunt mai reduse în comparație cu lotul M.

În ceea ce privește activitatea enzimatică, se remarcă reducerea acesteia la lotul C, la toate enzimele studiate cu excepția fosfatazei acide care este mai crescută. La lotul CV, intensitatea reacțiilor enzimice este mai puțin diminuată în comparație cu lotul C.

Colorația cu Sudan negru pentru lipide evidențiază la lotul C prezența unei steatoze de tip mixt, exprimată prin numeroase granule de diferite dimensiuni distribuite neuniform pe suprafața secțiunilor. Steatoza este mai redusă la lotul CV.

Faza a II-a. Timp de 7 zile s-a administrat numai suc presat din *Veronica officinalis*. După aceea, șobolanii au fost sacrificați. La examinarea necropsică, aspectul ficatului este aproape normal, în special la lotul CV.

Indici biochimici. Valoarea activității GPT la lotul C este la nivelul lotului martor, iar la lotul CV este cu 17% mai mare. Nici valoarea activității GOT nu se modifică semnificativ la cele două loturi (Tabel 2).

Indici histologici, histoenzimologici și histochimici. Colorația cu hematoxilină-eozină permite să se observe ameliorarea evidentă a structurii histologice a ficatului în comparație cu faza precedentă. Această ameliorare se evidențiază prin reducerea semnificativă a fenomenelor de necrobioză și balonizare celulară; steatoza hepatică este și ea mai redusă. Sunt prezente însă fenomene distrofice. La lotul CV, structura histologică este și mai apropiată de cea a lotului martor.

Activitatea enzimelor studiate, atât cele oxidoreducătoare (LDH, SDH, CyOx), cât și a celor hidrolitice (ATP-aza, F.ac.) este foarte apropiată de nivelul lotului M, în special la lotul CV.

Colorația cu Sudan negru arată că gradul de steatoză este mai redus la lotul C în comparație cu lotul din faza precedentă. La lotul CV, steatoza este și mai redusă.

Tabel 2

Faza a II-a. Activitatea transaminazelor serice (GPT și GOT)

(Valorile sunt exprimate în μg acid piruvic/ml ser)

	GPT			GOT		
	M	C	CV	M	C	CV
X	118	117	138	360	310	273
n	7	7	7	7	7	7
ES \pm	7,5	4,5	4,9	8,9	9,15	8,9
D %	100	99,2	117	100	86,6	76
t	---	0,12	2,25	---	3,9	2,9
p	---	NȘ	< 0,01	---	< 0,02	< 0,001

În faza I experimentală sunt caracteristice două elemente: creșterea activității transaminazelor serice și leziunile morfo-enzimatiche. Transaminazele serice cresc la lotul C în cazul GPT cu 450%, iar în cazul GOT cu 52%, dar numai GPT este mai caracteristic ficatului.

Aceste rezultate confirmă datele din literatură privitoare la semnificația transaminazelor în toxicoză [1, 11, 12]. În bună măsură creșterea activității transaminazelor reflectă procese de necrobioză. De altfel, structura histologică este lezată, fiind prezente fenomene de necrobioză și de balonizare celulară. Unele din celulele balonizate nu mai au conținut celular și nici nucleu. Tabloul enzimatic al ficatului este profund alterat: majoritatea enzimelor oxidoreducătoare și hidrolitice cercetate au activități mai scăzute la lotul C în comparație cu lotul martor. Numai fosfataza acidă, enzimă lizosomală ce caracterizează și ea aspectele de distrofie celulară, este mai crescută la lotul C. Creșterea fosfatazei acide se poate corela cu creșterea nivelului transaminazelor serice, în special al GPT. Reducerea activității enzimatiche are cauze multiple: distrucția organitelor celulare unde aceste enzime au situsurile, efectul inhibitor al metabolitului — CCl_3 prin denaturarea fosfolipidelor și a proteinelor de care se leagă etc. Aceste disfuncționalități metabolice sunt completate de steatoza hepatică. În ceea ce privește lotul intoxicat cu CCl_4 și tratat cu suc presat proaspăt din *Veronica officinalis*, rezultatele principale se referă la nivelul activității transaminazelor serice care rămân crescute ca și la lotul intoxicat, dar modificările histologice, histoenzimologice și histochimice sunt mai reduse în comparație cu lotul intoxicat.

În timpul fazei a II-a, se remarcă revenirea spre normal pe plan biochimic și morfologic, revenire care este favorizată de administrarea sucului presat din *Veronica officinalis*. Acest produs proaspăt are un conținut complex, inclusiv superoxid-dismutaza, flavone, iridoide, etc. Dar cum radicalul liber al CCl_4 nu este de acest tip, iar superoxid-dismutaza poate fi distrusă în stomac, presupunem că sunt alți factori (flavone) care pot favoriza acțiunea utilă a sucului presat din *Veronica officinalis*.

Concluzii. Administrarea de suc presat proaspăt din *Veronica officinalis* în intoxicația cu tetraclorură de carbon, la șobolani, reduce unele aspecte lezionale și favorizează refacerea ficatului.

BIBLIOGRAFIE

1. Bang, S., Myren, P., Linnesgård, P., *Effects of the prostaglandine E_2 analogue enprostil on the carbon tetrachloride induced necrosis of liver cells in mice*, „Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. (APMIS)”, 100, 1992, 963—965.
2. Bernuau, D., *La régénération hépatique*, „Gastroenterol. Clin. Biol.”, 17, 1993, 361—365.

3. Ciemedson, C., Romert, L., Odland, L., *Biotransformation of carbon tetrachloride in cultured neurons and astrocytes*, „Toxic. in vitro”, **8** (2), 1994, 145—152.
4. Delaney, B., Strom, C. S., Collins, S., Kaminski, E. N., *Carbon tetrachloride suppresses T-cell-dependent immune response by induction of transforming growth factor- β 1*, „Toxicol. Appl. Pharmacol.”, **126**, 1994, 98—107.
5. Belrat, P., Dupin, S., Galtier, P., *Assessment of hepatic insufficiency model in the rabbit using carbon tetrachloride intoxication*, „J. Pharmacol. Sci.”, **83**, 1994, 11—14.
6. Jungermann, K., *Zonal liver cell heterogeneity*, „Enzyme”, **46**, 1992, 5—7.
7. Le Blanc, G. A., *Hepatic vectorial transport of xenobiotics*, „Chem. Biol. Interact.”, **90**, 1994, 101—120.
8. Mureșan, E., Bogdan, A. T., Gaboreanu, M., Baba, A. I., *Tehnici de histochimie normală și patologică*, Ed. Ceres, București, 1975.
9. Raucy, J. L., Kräner, J. C., Laskar, J., *Bioactivation of halogenated hydrocarbons by cytochrome P450 2E1*, „Crit. Rev. Toxicol.”, **23** (1), 1993, 1—29.
10. Rosenbaum, J., Mavier, P., Dhumeaux, D., *Interactions cellulaires dans le foie*, „Med. Sci.”, **7**, 1991, 110—117.
11. Rusu, M. A., Bucur, N., Tămăș, M., *Effects of the Chrysanthemum balsamita hydroalcoholic extract upon the intoxicated liver*, „Fitoterapia”, **65** (3), 1994, 211—213.
12. Seifert, W. F., Bosma, A., Hendriks, M. F. J., *Beta-carotene (provitamin A) decreases the severity of CCl₄-induced hepatic inflammation and fibrosis in rats*, „Liver”, **15**, 1995, 1—8.

ASPECTE GENETICE ÎN DISTROFIA MUSCULARĂ SEVERĂ CU TRANSMITERE AUTOSOMAL RECESIVĂ

DINA COPREAN*, NICOLAE COMAN**, ARIANA PROTASE*,
MIHAI POPESCU*** și CRISTINA IIAȘ*

SUMMARY. — *Genetic Aspects in the Severe Autosomal Recessive Muscular Dystrophy.* The difference between the severe autosomal recessive muscular dystrophy and Duchenne muscular dystrophy consists of genetic heterogeneity (due to two recessive genes on 17q 12 and 13q 12), and evolution and prognosis. Establishing a correct diagnosis and the inheritance pattern are important for prophylaxis and genetic counselling.

Descrisă în 1980 sub numele de „miopatie magrebiană“, distrofia musculară severă cu transmitere autosomal recesivă se caracterizează printr-o simptomatologie similară distrofiei musculare progresive Duchenne. Adică, debutează în copilărie, primul simptom fiind deficitul de forță musculară, evoluția caracterizându-se prin degenerare progresivă a musculaturii membrelor și trunchiului. Din acest motiv, în literatura de specialitate este cunoscută sub numele de distrofie musculară progresivă Duchenne (DMD) forma autosomal recesivă [1, 2, 5—10, 12].

Distrofia musculară severă cu transmitere autosomal recesivă (SCARMD), spre deosebire de distrofia musculară progresivă Duchenne, afectează ambele sexe. Ceea ce diferențiază cele două forme de distrofie musculară progresivă cu fenotip asemănător este:

- vârsta de debut (3—5 ani în DMD și 8—10 ani în SCARMD);
- pierderea capacității de deplasare (înainte de 15 ani în DMD; în jur de 18—20 ani în SCARMD);
- evoluția (rapidă în DMD și moderată în SCARMD) [5, 12].

Fenotipul Duchenne determinat de mutația unei gene recesive, localizată pe brațul scurt al cromozomului X (gena distrofinei), îl întâlnim în 90% din cazuri, fiind afectați, în special, băieții.

Fenotipul Duchenne forma autosomal recesivă (SCARMD) este prezentă la 10% din cazuri, afectând în mod egal cele două sexe [1, 5, 12].

În această lucrare ne-am propus studiul aspectelor genetice ale distrofiei musculare severe cu transmitere autosomal recesivă (SCARMD), plecând de la premisa necesității unei diferențieri clare față de distrofia musculară Duchenne, pentru un diagnostic corect și o profilaxie eficientă.

* Universitatea de Medicină și Farmacie, Catedra de Biologie-Genetică, 3400 Cluj-Napoca, România;

** Universitatea Babeș-Bolyai, Catedra de Ecologie și Genetică, 3400 Cluj-Napoca, România

*** Centrul de Patologie Neuromusculară „Horia Radu“, 4017 Vâlcele, jud. Covasna, România

Material și metodă. Studiile noastre s-au axat pe investigarea unui număr de 15 cazuri de distrofie musculară severă cu transmitere autosomal recesivă la copii internați în Centrul de Patologie Neuromusculară „Horia Radu”, Vâlcele, jud. Covasna. Metodele utilizate au fost:

a) ancheta familială cu întocmirea fișei genetice și reconstituirea arborilor genealogici, care au permis stabilirea mecanismului de transmitere;

b) investigațiile paraclinice efectuate sunt: enzimograma serică, biopsia musculară și electromiograma (EMG).

Enzimograma serică a constatat în dozarea nivelului seric al creatinfosfatkinazei (CPK) prin metoda Foster, a aldolazei (ALD) prin metoda Bruns și a transaminazelor (GOT și GTP) prin metoda Reitman, metode descrise în [4].

Valoarea normală a activității serice (la 25°C) a CPK este de 50U/l; ALD = 5—3,1U/l; GOT și GTP de 12 U/l.

Pentru a stabili fondul miogen al bolii am apelat la studiul biopsiei musculare și al EMG.

Rezultate și discuții. Musculatura striată conține cantități importante de CPK, ALD și transaminaze. Aceste enzime acționează exclusiv intracelular. Nivelul lor seric crește atunci când se produce o alterare a sarcolemei permițând „scurgerea” lor în lichidul interstițial, limfă și plasmă. Aceste enzime sunt cunoscute și sub denumirea de enzime plasmatice de leziune [4, 5, 12].

Dozarea nivelului seric al acestor enzime și, în special, al CPK și ALD are valoare de diagnostic în distrofiile musculare.

Nivelul seric al CPK este crescut de câteva zeci de ori față de normal, în tot cursul evoluției bolii (Fig. 1). Aldolaza înregistrează, de asemenea, un nivel foarte crescut față de normal. Valorile serice ale GOT și GTP sunt normale.

Studiul la microscopul optic al preparatelor histologice ale biopsiei musculare evidențiază: fibre musculare rotunjite, inegale dimensional (unele hipertrofice, altele atrofile) cu nucleii interni și centrali, splitting-uri, zone de necroză, hiperplazia țesutului conjunctiv perimisial (Fig. 2).

Electromiograma (Fig. 3) indică un traseu interferențial miogen, diminuarea amplitudinii și duratei potențialelor de acțiune, consecință a reducerii numărului de fibre musculare ale unităților motorii.

Prezentăm în continuare cei mai caracteristici arbori genealogici ai cazurilor investigate (Fig. 4).

Studiul arborelui genealogic al familiei S. I. (Neamț) evidențiază, pe parcursul a patru generații, existența unui băiat (în F_3) și a unei fete (în F_4), bolnavi cu diagnostic de distrofie musculară progresivă Duchenne forma autosomal recesivă. Părinții probandei, indemni clinic, sunt veri de gradul II. Fratele și sora probandei sunt sănătoși. În ascendența probandei pe linie paternă, se constată prezența unei femei cu deficit motor (merge greu, cu cârje de la vârsta de 18—20 ani). În ascendența pe linie maternă, bunicul probandei se deplasează greu, iar în urma unei căderi nu se poate ridica fără ajutor. În cazul probandei, primul simptom — deficitul de forță musculară este remarcat la vârsta de 12 ani, iar evoluția bolii este lentă. Enzimograma serică a probandei indică: CPK = 1055U/l; ALD = 16,55U/l, iar GOT și GTP prezintă valori normale.

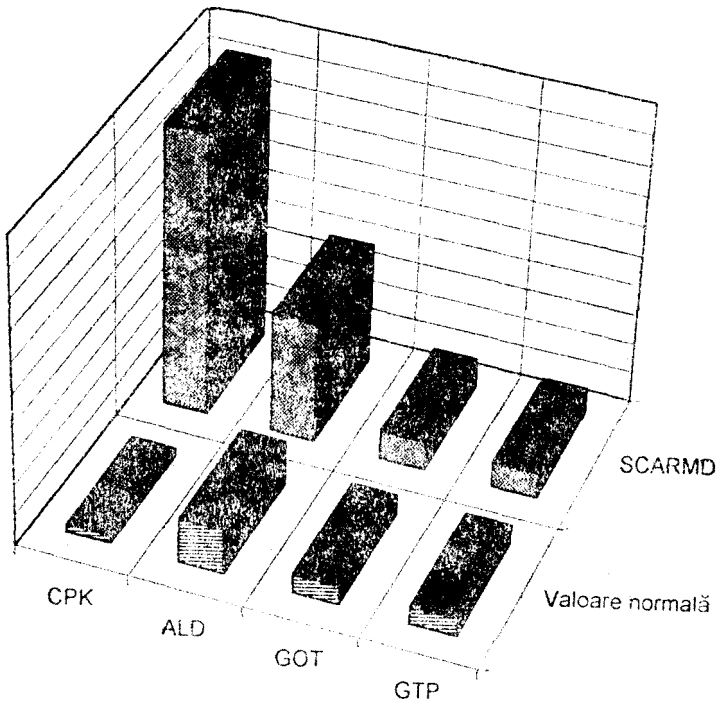


Fig. 1. Valori medii ale activității unor enzime serice în distrofia musculară severă cu transmitere autosomal recesivă (SCARM D).

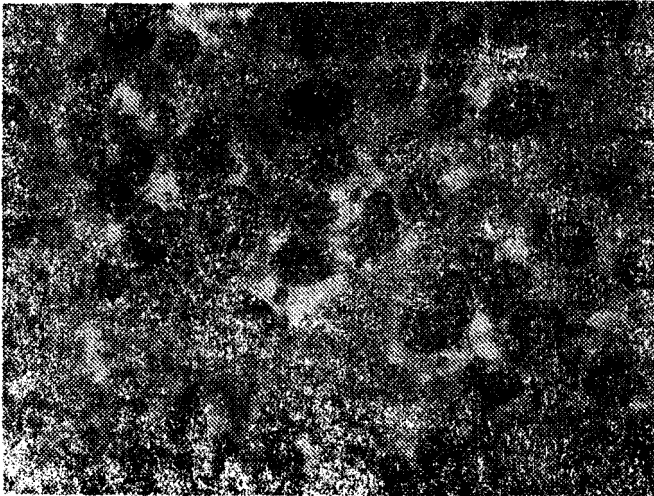


Fig. 2. Imaginea la microscopul optic a preparatului histologic al biopsiei musculare în SCARM D (Hematoxilina-cozină; oc. 10 x; ob. 20x).

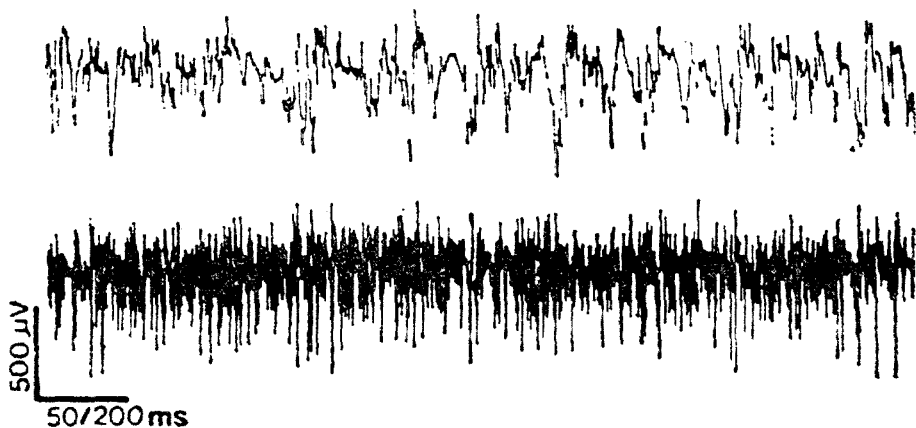


Fig. 3. *Electromiogramă în SCARMD. Se evidențiază un traseu interferențial micger*

În cazul familiei O. S. (Satu Mare) se constată existența a două persoane bolnave cu diagnostic de SCARMD și anume: probanda și un băiat (fiul unei verișoare primare a mamei probandei). Probanda are în ascendență, pe linie paternă, o mătușă cu mers legănat, digitigrad.

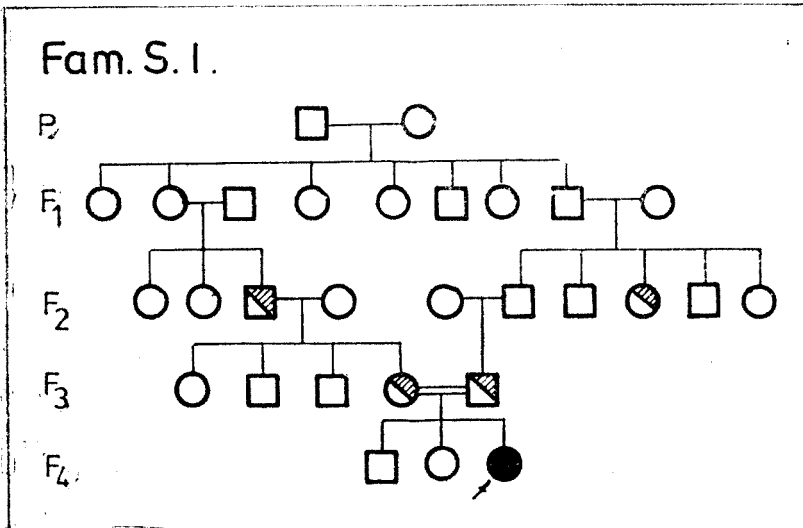
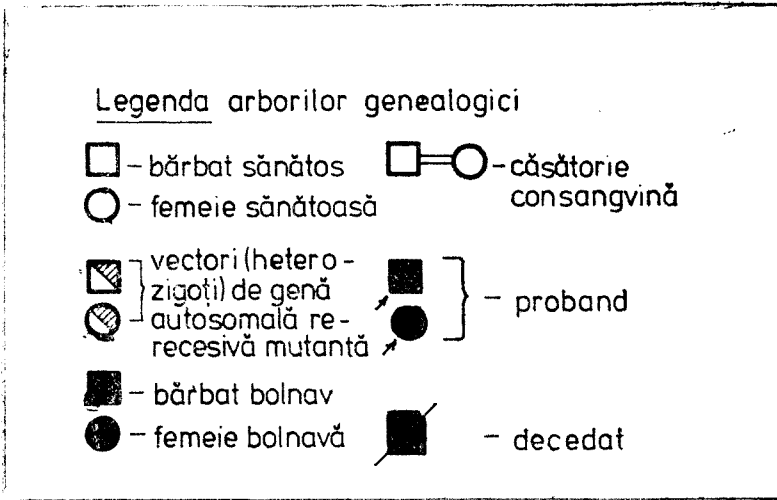
Valorile enzimogramei serice efectuate probandei indică următoarele valori pentru CPK = 995U/l; ALD = 24,45U/l; GOT și GTP au valori normale. Vârsta de debut a bolii la probandă este la 10 ani.

În familia D. C. (Olt) probandul și sora sa, ambii cu diagnostic de SCARMD, au părinți indemni sau asimptomatici clinic, dar bunicul matern prezintă deficit motor accentuat. Primele simptome ale bolii (mers digitigrad, deficit de forță musculară) sunt observate la probandă la vârsta de 9 ani. Nivelul seric al CPK = 1400U/l; ALD = 19,30U/l; GOT și GTP au valori normale.

Din studiul arborilor genealogici ai familiilor investigate, se constată modul de transmitere autosomal recesiv al SCARMD (distrofia musculară progresivă Duchenne, forma autosomal recesivă). Acest mod de transmitere este confirmat și de faptul că cuplul parental indemn clinic are descendenți afectați.

În unele din familiile investigate (S. I. și O. S.), în ascendența probanzilor este semnalată prezența unor persoane la care se manifestă doar unele simptome ale bolii. Acest fapt poate fi interpretat prin fenomenul de recesivitate relativă (gena recesivă mutantă se exprimă în fenotip alături de gena dominantă sănătoasă, boala având o formă ușoară).

Părinții probanzilor sunt asimptomatici, dar vectori (heterozigoți) pentru gena SCARMD. Genele autosomal recesive se exprimă în marea majoritate a cazurilor doar în stare homozigotă. Consangvinizarea crește frecvența manifestării fenotipice a genelor autosomal recesive. În cazurile investigate, consangvinizarea este negată, cu excepția familiei S. I.



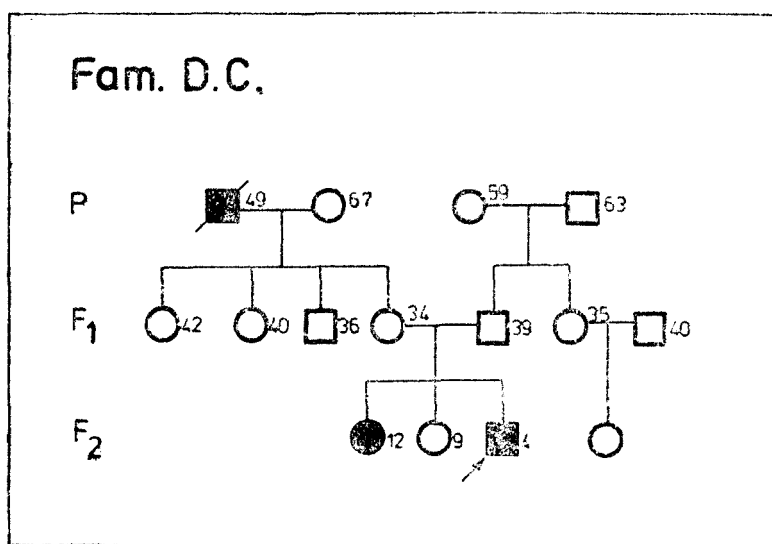
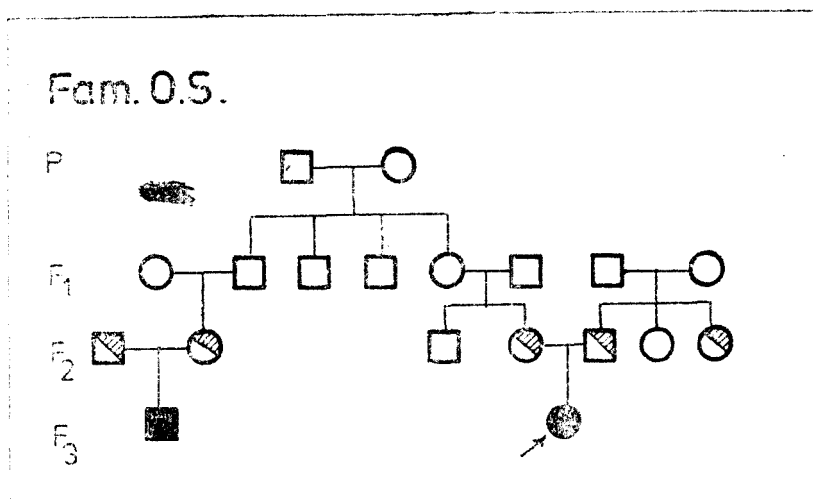


Fig. 4. Arborii genealogici ai familiilor S.I., O.S și D.C.

Distrofia musculară severă cu transmitere autosomal recesivă se caracterizează prin heterogenitate genetică. În literatură se cunosc două gene a căror mutație conduce la fenotipul SCARMD: una pe brațul lung al cromozomului 17, în 17_q12-17_q21 (controlează sinteza unei proteine musculare — adalina [1, 7—11, 13, 14], iar cealaltă genă este pe brațul lung al cromozomului 13, în 13_q12 (produsul genic nu a fost identificat) [2, 3].

SCARMD este frecventă în populațiile din nordul Africii (unde căsătoriile consangvine sunt frecvente) și rară în populația europeană.

Riscul recurenței acestei boli pentru un cuplu vector de genă recesivă pentru SCARMD este de 1:4 (adică 25% din descendență va fi afectată).

Reducerea frecvenței acestei boli se poate realiza prin depistarea stării de purtător (vector) și acordarea de sfat genetic. Sfatul genetic are eficiență doar dacă diagnosticul este corect și dacă s-a stabilit cu certitudine mecanismul de transmitere a bolii.

În distrofiile musculare nu există tratament eficace care să împiedice apariția simptomelor sau să stopeze evoluția bolii. Transplantul de mioblasti nu a dat rezultatele scontate. În țara noastră, acești bolnavi beneficiază de tratament recuperator ce constă în chirurgie ortopedică, fiziokinetoterapie și administrare de oligoelemente și vitamine.

Concluzii. 1. SCARMD, spre deosebire de DMD, se caracterizează prin heterogenitate genetică.

2. Genele pentru SCARMD se exprimă fenotipic (în marea majoritate a cazurilor), în stare homozigotă, afectând ambele sexe. Astfel, în unele cazuri, datorită fenomenului de recesivitate relativă, unii vectori de genă morbidă manifestă deficit motor mai mult sau mai puțin accentuat.

3. Studiul arborilor genealogici ai familiilor investigate confirmă modul de transmitere autosomal recesiv al acestei boli.

4. Riscul recurenței la SCARMD este de 1:4, adică de 25% din descendență va fi afectată.

5. Datele investigațiilor paraclinice (enzimogramă serică, biopsia musculară și electromiograma, efectuată probanzilor) confirmă fondul miogen al afecțiunii.

6. Diagnosticul corect, precum și stabilirea modului de transmitere al SCARMD, datorită aspectului fenotipic asemănător cu cel al distrofiei musculare Duchenne, este necesar pentru acordarea sfatului genetic competent.

7. Tratamentul actual al SCARMD, ca de altfel în toate distrofiile musculare, este doar recuperator. Nu există un tratament eficace care să împiedice apariția simptomelor și evoluția bolii.

BIBLIOGRAFIE

1. Allamand, V., Leturcq, F., Piccolo, F., Jeanpierre, M., Azibi, K., Roberts, S. L., Linn, L. E., Campbell, K. P., Beckmann, J. S., Kalpan, J. K., *Adhalin gene polymorphism*, „Hum. Mol. Genet.”, 3, 1994, 2269—2276.
2. Azibi, K., Bachner, L., Beckmann, J. S., Matsumura, K., Hamouda, E., Chaouch, M., Chaouch, A., Ait-Ourab, R., Vignal, A., Weissenbach, J., *Severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy with deficiency of the 50 kDa dystrophin-associated glycoprotein maps to chromosome 13q12*, „Hum. Mol. Genet.”, 2, 1993, 1423—1428.

3. Ben Othamane, K., Ben Hamida, M., Pericak-Vance, M. A., Ben Hamida, C., Blel, S., Carter, S. C., Bowcock, A. M., Petruhkin, K., Gilliam, T. C., Roses, A. D., *Linkage of Tunisian autosomal recessive Duchenne-like muscular dystrophy to the pericentrometric region of chromosome 13q*, „Nature Genet.”, 2, 1992, 315—317.
4. Cuculanu, M., Rus, H., Niculescu, D., Vonica, A., *Biochimic. Aplicații clinice*, Ed. Dacia, Cluj-Napoca, 1991.
5. Dubowitz, V., *The muscular dystrophies*, „Postgrad. Med. J.”, 68, 1992, 500—506.
6. Hamida, C. B., Soussi-Yanicostas, N., Bejaoui, K., Butler-Browne, G., Henati, F., Ben Hamida, M., *Expression of myosin isoforms and desmin, vimentin and titin in Tunisian Duchenne-like autosomal recessive muscular dystrophy*, „J. Neurol. Sci.”, 123, 1994, 114—121.
7. Kawai, H., Akaito, M., Endo, T., Adachi, K., Iumai, T., Mitsui, T., Campbell, K. P., *Adhalin gene mutations patients with autosomal recessive childhood onset muscular dystrophy with adhalin deficiency*, „J. Clin. Invest.”, 96, 1995, 1202—1207.
8. Kawai, H., Iumai, T., Mitsui, T., Campbell, K. P., Schmitzu, T., Akaito, M., Endo, T., *Complete deficiency of adhalin (50 kDa DAG) in skeletal muscle of malignant limb-girdle muscular dystrophy*, „Clin. Neurol.”, 35, 1995, 184—189.
9. McGuire, S. A., Fischbeck, K. H., *Autosomal recessive Duchenne-like muscular dystrophy, molecular and histochemical results*, „Muscle Nerve”, 14, 1991, 1209—1212.
10. McNally, E. M., Yoshida, M., Mizuno, Y., Ozawa, E., Kunkel, L., *Human adhalin is alternatively spliced and the gene is located on chromosome 17q21*, „Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.”, 91, 1994, 9690—9694.
11. Piccolo, F., Roberts, S. L., Jeanpierre, M., Leturcq, F., Azibi, K., Beldjord, C., Campbell, K. P., Kalpan, J. C., *Primary adhalinopathy a common cause of autosomal recessive muscular dystrophy of variable severity*, „Nature Genet.”, 10, 1995, 243—245.
12. Popescu, M., *Atlas de patologie eredo-degenerativă neuromusculară*, Ed. Med., București, 1989.
13. Roberts, S. L., Leturcq, F., Allamand, V., Piccolo, F., Jeanpierre, M., Anderson, R. D., Linn, L. E., Lee, J. C., Tome, F. M., Romero, N. B., *Missens mutation in the adhalin gene linked to autosomal recessive muscular dystrophy*, „Cell”, 78, 1994, 625—633.
14. Romero, N. B., Tome, F. M., Leturcq, F., Azibi, K., Bachner, I., Anderson, R. D., Roberts, S. L., Campbell, K. P., *Genetic heterogeneity of severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy with adhalin (50 kDa dystrophin-associated glycoprotein) deficiency*, „Scit. Vie”, 317, 1994, 170—176.

CERCETĂRI PRIVIND IMPACTUL TRANSFERULUI RADIONUCLIZILOR ÎN BIOTOPURILE ECOSISTEMULUI ACVATIC DIN BAZINUL SOMEȘULUI

LIVIU A. FLOCA*, ONUC COZAR**, MIHAI TRIFU***, LIVIU DARABAN**,
TRANDAFIR FIAT**, MARTA BAYER**** și LASZLO BERKESY*

SUMMARY. — *Researches Concerning the Impact of the Transfer of Radionuclides into the Biotopes of Aquatic Ecosystem of the Someș Basin.* The level of the global β -radioactivity of the water was measured in the Someșul Mic River (down of the city of Cluj-Napoca) and in the Șieu River (down of the city of Bistrița). The measured values were compared with level of the metabolism of the radionuclides in biota of the aquatic ecosystems of Transylvania, namely in green monocellular algae, thallophytes and fish bones.

Materiile radioactive, provenite din industria extractivă minieră și instalațiile de foraj, laboratoare, practica industrială, agricolă sau medicală ridică probleme legate de creșterea fondului radioactiv general, definind nivelul poluării radioactive antropice [5, 13, 16, 19], aceasta fără a fi luate în considerare accidentele nucleare, experiențele cu arme atomice și activitatea centralelor atomo-electrice.

Deși în apă ajung cantități relativ mici de materii radioactive și radionuclizi, acestea se concentrează în organismele acvatice, făcând ca radioactivitatea să devină periculoasă.

Efectele radioactivității depind atât de concentrația și natura radionuclizilor, cât și de locul de unde acționează aceștia asupra organismelor, sursele interne de radiații fiind cele mai periculoase pentru organismele vii. Efectele biologice ale radiațiilor nucleare sunt dependente de doza biologică absorbită într-un organism sau țesut dat, la care se adaugă radiosensibilitatea țesuturilor respective [4, 8]. Radionuclizii migrează prin biosferă pe calea aerului și mai ales a apelor, precum și pe calea lanțurilor trofice, de la producătorii primari sau plantele verzi la consumatorii de diferite ordine, ajungând astfel până în organismul uman [4, 8, 9, 12, 14—16, 18].

Contaminarea apei potabile poate fi evitată sau redusă prin procedeele obișnuite de tratare, filtrare, dedurizare și sedimentare aplicate în uzinele de apă și în stațiile de epurare. În albiile râurilor are loc un proces natural de decontaminare prin depunerea radionuclizilor în sedimentele bentonice, cât și prin acumularea lor în organismele vii, specifice ecosistemului acvatic. Metabolizarea ca și fixarea acestora,

* Universitatea Babeș-Bolyai, Stațiunea de Cercetări Arecalia, 3400 Cluj-Napoca, România

** Universitatea Babeș-Bolyai, Facultatea de Fizică, 3400 Cluj-Napoca, România

*** Universitatea Babeș-Bolyai, Facultatea de Biologie și Geologie, Catedra de biologie vegetală, 3400 Cluj-Napoca, România

**** Centrul Medical de Servicii de Sănătate și Conducere, 3400 Cluj-Napoca, România

atât în celulele plantelor acvatice, cât și în sistemul osos și mușchii vertebratelor acvatice, are loc în funcție de condițiile de echilibru ecologic specifice fiecărui bazin hidrografic [6, 7, 11, 12, 17, 19].

Cercetările noastre au vizat transferul radioelementelor din apă în organismul algelor unicelulare și al celor talofite, cât și în sistemul osos al peștilor răpitori din bazinul hidrografic al Someșului Mic și al Șieului, principalii afluenți ai Someșului Mare.

Material și metodă. Probele de apă de râu au fost prelevate din puncte situate în aval de localitățile Cluj-Napoca pentru Someșul Mic și Bistrița pentru Șieu. Din aceleași puncte a fost colectat și materialul biologic, alge unicelulare din ordinul *Chlorococcales*, alge talofite din ordinul *Charales*, cât și vertebrate acvatice, pești răpitori din specia clen (*Leuciscus cephalus*).

Radioactivitatea apei este dată de suma radioactivității nuclidilor dizolvați și a celor în suspensie. Probele de apă au fost evaporate la sec, iar reziduu uscat a fost trecut pe ținte.

Radioactivitatea β -globală este un indicator al radioactivității apelor, fiind singura componentă pentru care există fixată o limită maximă admisibilă, care în cazul apelor potabile nu trebuie să depășească 1,1 Bq/l.

Determinările radioactivității β -globale a apei au fost făcute utilizând un sistem de detecție montat în anti-coincidență, cuplat la un analizor NK-350, având limita de detecție de 0,3 Bq/probă [1, 3, 10].

Probele de țesut vegetal și animal au fost calcinate la 600°C, iar cenușa trecută pe ținte. Determinarea radioactivității β -globale în acest caz a fost realizată pe un sistem de contoare montate tot în anti-coincidență, cuplat la o sondă de mare eficiență Nz-305, conectat la un numărător nuclear de impulsuri, eficiența sistemului fiind de 10,65% [2].

Timpul de măsurare total probă fond a fost de 100 minute/probă, iar activitatea minimă decelabilă în astfel de condiții a fost de 0,03 Bq/probă.

De asemeni, a fost calculat și factorul de concentrare (F.C.) a radionuclizilor în organismele acvatice după următoarea relație:

$$F.C. = \frac{\text{Activitatea specifică în biomasă}}{\text{Activitatea specifică în apă}}$$

Rezultate și discuții. Rezultatele obținute sunt prezentate în Tabelul 1, valorile radioactivității β -globale fiind exprimate în Bq/g reziduu uscat pentru apă și Bq/g cenușă pentru organismele acvatice studiate, fiind calculat și factorul de concentrare a radionuclizilor în organism (F.C.), pentru fiecare probă de material biologic.

Factorii care influențează rata de acumulare a radionuclizilor în organismele specifice ecosistemului acvatic sunt multipli, importanți din punct de vedere biologic fiind temperatura apei, intensitatea și specificul metabolismului, ritmul de creștere și particularitățile de dezvoltare ontogenetică a organismului respectiv, cât și greutatea și vârsta acestuia [16, 19].

Analizând rezultatele constatăm că nivelul activității β -globale a apei prezintă valori mai ridicate în Someșul Mic comparativ cu Șieu (10,078 Bq/g reziduu uscat față de 6,917 Bq/g reziduu uscat), fapt ce dovedește că în zona municipiului Cluj-Napoca apele Someșului Mic sunt mai intens poluate radioactiv comparativ cu municipiul Bistrița, limita maximă admisă fiind ușor depășită cu 0,19 Bq/l.

Tabel 1

Radioactivitatea β -globală a apei și transferul acesteia în organismele ecosistemului acvatic

Bazinul hidrografic și localitatea	Proba analizată	Radioactivitatea β — globală*	Factorul de concentrare (F.C.)
Someșul Mic (Apahida)	Apă	10,078	—
	Alge verzi unicelulare	8,500	843,4
	Alge verzi talofite	6,500	645,9
	Oase de pești răpitori	0,750	74,4
Șieu (Arcafia)	Apă	6,917	—
	Alge verzi unicelulare	6,600	954,1
	Alge verzi talofite	6,150	889,1
	Oase de pești răpitori	0,500	72,2

* Se exprimă în Bq/g reziduu uscat pentru apă și în Bq/g cenușă pentru materialul biologic. Bq = becquerel (unitatea de măsură a activității). 1 Bq = 0 dezintegr./sec. 1 Ci = $3,7 \cdot 10^{10}$ Bq.

Intensitatea metabolizării și fixării radionuclizilor din apă în organismul plantelor acvatice este diferită în funcție de tipul de algă studiat. Astfel, algele verzi unicelulare fixează cel mai intens radionuclizii în structurile celulare, radioactivitatea β -globală atingând valori de 8,5 Bq/g cenușă pentru Someșul Mic și 6,6 Bq/g cenușă pentru Șieu. Comparativ, algele verzi talofite fixează o cantitate mai mică de radionuclizi, atât în bazinul Someșului Mic, cât și în cel al Șieului, valorile radioactivității β -globale fiind de 6,5 Bq/g cenușă în primul caz și 6,15 Bq/g cenușă pentru cel de al doilea. Aceste diferențe se pot explica prin deosebirile dintre cele două grupe de alge verzi, în timp ce algele unicelulare au o viață mai lungă, caracterizată prin diviziuni celulare intense, algele talofite apar la sfârșitul lunii iunie, când temperatura apei atinge pragul optim și dispar în octombrie, când temperatura apei scade, descompunându-se rapid, iar radionuclizii fixați se acumulează în mâlul sapropelic, de unde vor fi din nou reciclați [12, 13, 15].

De remarcat este faptul că acumularea radionuclizilor în algele verzi are loc prin absorbția directă a acestora din apă, iar prin consumul algelor în cadrul lanțurilor trofice are loc reconcentrarea radionuclizilor în organismele nivelului trofic următor (ex. zooplancton și pești fitofagi care sunt consumați de răpitori) [5, 9, 16].

Determinările efectuate asupra oaselor de pești răpitori au scos în evidență o activitate β -globală extrem de scăzută: 0,75 Bq/g cenușă pentru Someșul Mic și 0,50 Bq/g cenușă pentru Șieu. Aceste valori mici, comparativ cu cele obținute în cazul algelor verzi, pot fi explicate prin faptul că în sistemul osos al peștilor se fixează selectiv numai anumiți radionuclizi care în apă prezintă concentrații reduse. Literatură de specialitate atestă faptul că radionuclizii ce se află în apă

sub formă solubilă au o analogie chimică cu elementele minerale esențiale sistemului osos, fiind fixați de organismele acvatice prin aceleași mecanisme ca și analogii lor. De exemplu, ^{137}Cs și ^{40}K vor urma drumul metabolic al potasiului, iar ^{90}Sr , ^{226}Ra și ^{45}Ca se vor comporta ca și calciul [11, 15, 16].

Cantitatea și natura radionuclizilor acumulați în organismele vii acvatice influențează intensitatea impactului dozelor mici de radiații care, acționând din interiorul structurilor celulare, produc o serie de procese fizico-chimice primare, care la rândul lor declanșează asupra materiei organice vii un lanț de reacții secundare, ducând la alterări metabolice cu repercusiuni asupra ecosistemului acvatic [7, 16].

Concluzii. 1. Radioactivitatea β -globală a apei prezintă valori ce se înscriu în limitele normalului pentru Șieu (1,01 Bq/l), fiind ușor mai ridicată în bazinul Someșului Mic (1,29 Bq/l), față de maximul admis (1,1 Bq/l) pentru țara noastră.

2. Procesele de transfer al radionuclizilor în diferite compartimente ale ecosistemului acvatic pun în evidență faptul că rata de acumulare în algele verzi este mai ridicată în cazul algelor unicelulare, în timp ce pentru talofite valorile sunt mai mici, atât în bazinul Someșului Mic cât și în Șieu.

3. Acumularea radionuclizilor în sistemul osos al peștilor răpitori evidențiază o activitate β -globală extrem de scăzută, explicabilă prin selectivitatea fixării de către sistemul osos a unor anumiți radionuclizi.

4. Valorile radioactivității β -globale a apei și a unor organisme specifice ecosistemului acvatic, în special din bazinul Someșului Mic, reflectă rezultatul activităților antropice cu implicații privind poluarea radioactivă, fapt ce justifică continuarea și aprofundarea cercetărilor întreprinse.

BIBLIOGRAFIE

1. Bayer, M., Bardos, L., Dărăban, L., Rusu, M., *Aplicarea detectorilor de urme pentru completarea informațiilor despre radioactivitatea aerului atmosferic*, „Rez., Ses. Științ. Anu. Centr. Med. Serv. Sănătate și Conducere (Cluj-Napoca, 1995)”, 1995, 43.
2. Bayer, M., Fiat, T., Dărăban, L., *Contribution of ^{40}K to the radioactivity of water for public consume*, „Balkan Phys. Lett.”, 2, 1994, 1358—1361.
3. Bayer, M., Fiat, T., Dărăban, L., Matei, M., *Influența traficului rutier asupra radioactivității aerului în Cluj-Napoca*, „Rez., A VI-a Conf. Ecol. (Arad, 1995)”, 1995, 231.
4. Cogole, J. E., *Biological Effects of Radiation*. p. 11—38, Springer. Berlin, 1971.
5. Davis, J., Foster, R. F., *Bioaccumulation of radioisotopes through aquatic food chains*, „Ecology”, 39, 1958, 530—535.
6. Dudea, M., Todor, S., Ignat, A., *Toxicologie acvatică*, p. 28, Ed. Dacia, Cluj-Napoca, 1986.
7. Durham, R. W., Joshi, S. R., *Investigation of Lake Ontario water quality near Port Granby radioactive waste management site*, „Water, Air Soil Pollut.”, 13, 1980, 17—26.

8. Gheorghe, N., Vlădescu, C., Apetroaie, M., *Radiațiile ionizante și viața*, p. 32—47, Ed. Acad. Rom., București, 1984.
9. Gheorghiuță, I. G., *Radioecologie vegetală*, Ed. Acad. Rom., București, 1987.
10. Hötzl, H., Winkler, R., *Rapid determination of radon daughters and of artificial radionuclides in air by online gamma-ray spectrometry*, „Radiat. Environ. Biophys.„ 32, 1993, 129—135.
11. Joshi, S. R., ^{137}Cs , ^{226}Ra and total U in fish from Lakes Ontario, Erie, Huron and Superior during 1976—1982, „Water Pollut. Res. J. Canada“, 19, 1982, 110—119.
12. Justin, J., Stanek, Z., *Accumulation of natural radionuclides in the bottom sediments by aquatic organisms of streams*, „Int. Rev. Ges. Hydrobiol.“, 59, 1974, 593—609.
13. Mahon, D. C., *Uptake and translocations of naturally-occurring radionuclides of the uranium series*, „Bull. Environ. Contam. Toxicol.“, 29, 1982, 697—703.
14. Onicescu, M., *Radioactivitatea naturală în România*, p. 17—36, Soc. Rom. Radioprotect., București, 1994.
15. Onicescu, M., *Radioactivitatea artificială în România*, p. 1—26, Soc. Rom. Radioprotect., București, 1994.
16. Parker, G. H., Tudorancea, G., Baweja, A., *Radiobiological Impact of Uranium Tailings on the Environment: A Literature Review with Particular Reference to the Aquatic Ecosystem*, p. 9—27, Environment Canada, Ontario, 1986.
17. Preston, M. E., *Proposed Criteria for Water Quality*, U.S. Environ. Protect. Agency, Washington, D.C., 1973.
18. Stugren, B., *Ecologie teoretică*, Ed. Eramis, Cluj-Napoca, 1994.
19. Whicker, F. W., Schultz, V., *Radioecology. Nuclear Energy and the Environment*, Vol. 1, p. 212, CRC Press, Boca Raton, Florida, 1982.

USE OF HEPTADECYLHYDROXYCOUMARIN FLUORESCENCE TO MONITOR pH CHANGES IN THE ALKALOPHILIC BACTERIUM *BACILLUS FIRMUS* OF4

CORNELIU TARBA* and PETER HINKLE**

SUMMARY. — The change in fluorescence of the membrane-anchored probe 4-heptadecyl-7-hydroxycoumarin has been used to monitor pH changes associated with aerobic-anaerobic transitions in the facultative alkalophile *Bacillus firmus* OF4. The pK of the membrane-bound dye was determined as being around pH 10, the fluorescence increasing in a sigmoidal manner between pH 7 and 12.5. The use of the impermeant fluorescence quencher p-xylene-bispyridinium bromide, in the absence and presence of a combination of valinomycin and nigericin, with bacteria suspended at pH 10.8 and low buffering power allowed us to estimate the fraction of the accessible (quenchable) fluorophore as close to 0.25. Since the expected distribution of the dye between the inner and outer surface of the membrane is around 0.5, we interpret the results as indicating the possible existence of a third compartment, inaccessible or at least much less accessible in the absence of the two ionophores, which are supposed to equilibrate the pH throughout the system. The initiation of respiration at moderate or high buffering power over a large pH region (6—11.5) is always associated with a decrease in fluorescence, indicating the pumping of protons into this third compartment. This interpretation is favoured by our preliminary measures regarding the inactivation of the possible Na⁺/H⁺ antiport by a prolonged preincubation (starvation) of bacteria in a medium devoid of Na⁺ and substrates. The use of amiloride (a specific inhibitor of the Na⁺/H⁺ antiporter) produced only a small decrease of the signal and this could be accounted for by the inhibitory effect of this drug on respiration, as determined by us with a Clark oxygen electrode. We consider that our results support the functioning of a special localised or semilocalised chemiosmotic mechanism in energy conservation by this alkalophilic bacterium.

Energy conservation in alkalophilic bacteria is an unresolved problem. Unlike the microorganisms that grow at a neutral pH, the alkalophilic bacteria can not generate a ΔpH negative inside by conventional chemiosmotic mechanisms, i.e. they can not develop a delocalised pH gradient as a consequence of respiration-coupled proton extrusion. On the contrary, the bacteria that live at rather high pH values (9—11.5) preserve their cytoplasm at a pH varying between 7.5 and 9.5, ΔpH thus being 1.5—2 units positive inside (see, for ex. [1, 3, 9]). As concluded in [4], since such bacteria are also able to establish a Δψ in excess of 200 mV (negative inside) and thus a total electrochemical potential difference (Δp = Δψ — ZΔpH) of at least —100 mV (Z = 60 mV, at 30°C), they could still synthesise ATP by conventional

* Babeș-Bolyai University, Department of Animal Physiology, 3409 Cktj-Napoca, Romania

** Cornell University, Department of Biochemistry, Ithaca, N.Y. 14853, U.S.A.

chemiosmosis, provided the stoichiometry of proton utilisation (H^+ /ATP) was greater than 3 (the one usually admitted). In fact, for an efficient ATP synthesis, at $\Delta p = -100$ mV, this stoichiometry should be close to 5. However, such high stoichiometries have not been observed. Certain bacteria are able to establish a Na^+ electrochemical gradient (in exchange for protons) and use this gradient to drive the synthesis of ATP by a Na^+ -dependent ATP synthase [3, 15]. This is not the case, however, with the species studied in the present work. Krulwich [9] has proposed that ATP synthesis in this type of bacteria takes place by conventional chemiosmosis at pH below 8–9, but by a membrane-localised proton gradient at higher pH values. The shift between the two mechanisms is proposed to occur by the opening of a pH-regulated gate, as the pH reaches a certain threshold. As observed by Dimroth [2], if this were the case, the membrane potential should drop when the gate opens and the protons are short-circuited through the internal membrane pathway, a fact which has not been observed. Moreover, the ATP synthesis should not be significantly affected at high pH values by channel formers, such as gramicidin, but the reality does not confirm this supposition.

The use of a new type of pH probes, such as the membrane-bound heptadecylhydroxycoumarin (HDHC), to estimate pH gradients in cytochrome oxidase vesicles by Nicolls' group (see, for ex. [16]) incited us to employ it for kinetic observations of pH gradients associated with the respiration of the facultative alkalophile *Bacillus firmus* OF4 (hereby referred to as B.f. OF4), in order to clarify some of the above-mentioned problems. The present paper reports on the fluorescence properties of HDHC bound to bacterial membranes and the utilisation of this dye to monitor respiration-dependent pH changes in B.f. OF4 grown, preincubated and suspended in different media, at pHs varying from 6 to 11.5.

Material and methods. Growth conditions. B.f. OF4 was grown either at pH 7.5, on phosphate medium, or at pH 10.5, on carbonate medium. Occasionally, it was also grown at pH 9 on an equal mixture of the two media. The media were prepared as follows: 13.4 g Na_2HPO_4 , 0.8 g KH_2PO_4 and 0.1 ml of 1 M $MgSO_4$ (for phosphate medium) or 9.54 g Na_2CO_3 , 0.84 g $NaHCO_3$, 1 ml 1 M KPi and 0.1 ml 1 M $MgSO_4$ (for carbonate medium) were dissolved to a final volume of 1 l with distilled water and the pH was adjusted to 7.7–7.8, in the first case, or to 10.8–10.9, in the second (with KOH). To these, in each case, the following additions were made (from separate sterile solutions): 0.1% yeast extract, 1% (v/v) trace salts solution (STS) and sodium malate to a final concentration of 50 mM. One l of STS contains 20 g nitrilotriacetic acid (NTA), 6.7 g $CaCl_2$ (dihydrate), 0.02 g ammonium molybdate, 0.2 g $FeSO_4$ (hydrous) and 100 ml of a special solution of trace metals (STM). STM consists of 2.5 g EDTA (free acid), 10.95 g $ZnSO_4$, 5 g $FeSO_4$, 1.54 g $MnSO_4$, 0.39 g $CuSO_4$, 0.25 g $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ and 0.18 g $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ to 1 l of solution. STS was prepared by dissolving first NTA with the aid of KOH (cca 14.5 g) as a neutralising agent and the addition of the rest of the compounds in the order presented above.

Approximately 10 ml of an older suspension of bacteria were added to 100 ml of growth medium and incubated in a flask at 30°C, with shaking, for 14–15 hrs, until the culture reached the midlog phase ($A_{880} = 1.2$ – 1.4). The suspension resulted was then placed in 50- and/or 15-ml plastic tubes and centrifuged in a swinging rotor for 15 min, at 2300 g (International Centrifuge,

Model PR-2). The sediment from a 50-ml tube was resuspended in several 15-ml tubes in the presence of a so-called starvation medium and recentrifuged to get rid of the residual growth medium.

Starvation and preincubation with fluorescent dye. The final pellet was suspended in a starvation medium and incubated for ca. 3 hrs (occasionally, 15 hrs) in the presence of 4-heptadecyl-7-hydroxycoumarin (HDHC), under conditions similar to the growing ones, in small flasks (20-50 ml), at a bacterial concentration usually double as compared to the one attained in the midlog phase. According to [12], a bacterial suspension with an $\Lambda_{850} = 2.25$ corresponds to 1 mg/ml dry weight bacteria (d.w.b.) or 0.66 mg/ml protein, a figure that was used to calculate bacterial protein throughout this work. After starvation, the suspension was centrifuged and usually resuspended in one of the starvation media to await the assay. The density of this suspension was so adjusted as to obtain a biomass of about 0.5 mg/ml d.w.b. in the 2-ml assay cuvette, after the injection of 50-100 μ l bacterial suspension.

The following starvation media were generally used: 1) 100 mM KPi + 10 mM MgSO₄, pH 7.5, referred to as the KPi medium; 2) 50 mM KCl + 50 mM NaCl + 5 mM MgSO₄ + 25 mM Tris-HCl, pH 7.5 or 9, referred to as the Tris medium; 3) 90 mM Na₂CO₃ + 10 mM NaHCO₃ + 1 mM KPi + 1 mM MgSO₄, pH 10.8, referred to as the carbonate mineral medium. When Na⁺ depletion was required, Na⁺ was replaced with K⁺ in the second and third medium. Occasionally, the bacteria were starved in a low buffer medium consisting of 100 mM NaCl (or KCl) + 5 mM MgSO₄ + 1 mM KPi.

HDHC was solved in ethanol and preserved as a 1-1.5 mM stock solution. An appropriate volume of this solution was added in each small flask containing bacteria submitted to starvation so as to result in a calculated concentration of 0.5-2 μ M dye in the assay cuvette or 1-4 nmoles dye/mg d.w.b. (assuming that all the dye added to the starvation medium was bound to bacteria and transferred to the assay cuvette). However, the dye also binds to the flask walls, and after washing with ethanol such a used flask we were able to recover about 1/2 to 3/4 of the dye, depending on the concentration of the bacterial suspension incubated and the surface of the wall in contact with that suspension. For simplicity, however, we shall use the nominal (i.e., uncorrected) dye concentration in our report.

Respiration measurements were performed with a Clark oxygen electrode and recorded on charts. The conditions used for these measurements were practically identical to those employed in fluorescence measurements in the so-called active experiments (see the next subsection), having in fact a role of control. The most important controls were those on the effect of Na⁺ on malate-dependent respiration, the effect of amiloride (an inhibitor of the Na⁺/H⁺ antiporter) and of the fluorescence quenching agent DPX (*p*-xylene-bis-pyridinium bromide).

Fluorescence measurements were performed with an Aminco-Bowman spectrophotofluorometer by exciting around 370 nm and detecting around 450 nm. Fifty to 100 μ l of the bacterial suspension incubated with HDHC as described above were added to a final volume of 2 ml suspending medium (see the composition and the exact conditions in the legends to tables and figures) and 5 mM malate was provided from a stock solution of 0.5 M. Ascorbate + TMPD (tetramethyl-*p*-phenylenediamine) or glucose were also used occasionally as respiratory substrates. Fluorescence changes were recorded on charts and special attention was given to the changes associated with the aerobic-anaerobic transition, which was repeated several times by stirring the suspension quickly with a rod.

DPX was used as an impermeant quenching agent to determine the fraction of the accessible (quenchable) fluorescence, as described below. A concentrated stock solution of DPX (1 M) was obtained by dissolving the drug in distilled water or in a slightly buffered solution (1 mM KPi, pH 7.5).

Valinomycin, nigericin and gramicidin were prepared as ethanolic solutions of an appropriate concentration so that the addition of these ionophores did not change the volume of the suspension by more than 0.5%.

Two main types of experiments were performed: passive (no substrate present) and active (make or another substrate present). In one variant of passive experiments we determined the pH dependence of the fluorescence changes of membrane-bound HDHC and established thus a titration curve (F vs. pH). Another variant of passive experiments was performed at high pH (10.8), in the absence or presence of valinomycin and nigericin, together with a DPX titration, for establishing the accessible fraction of the dye, as described in the next subsection. In active experiments we monitored the effect of different suspending media and substrates, pH changes, DPX, ionophores and other specific agents on the magnitude of the fluorescence changes associated with aerobic-anaerobic transitions.

Rationale for the use of DPX to determine the distribution of HDHC. It has been established by Lehrer [11] that in the case of the heterogeneous systems (such as our bacterial suspension), where the fluorophore distributes between different compartments, if one of them contains a substantial population of inaccessible fluorophore, the following equation applies to the fluorescence changes (ΔF) in relation to the concentration of an impermeant quencher ($[Q]$):

$$F_0/\Delta F = (1/K_{eff}[Q]) + 1/f \quad (1)$$

where F_0 is the fluorescence in the absence of the quencher, $\Delta F = F_0 - F$ (F being the fluorescence recorded in the presence of the quencher), K_{eff} is the so-called effective quenching constant for the accessible fluorophore and f is the fraction of the accessible (quenchable) fluorescence. This equation is similar to that of Michaelis—Menten and a graphic representation of $F_0/\Delta F$ vs. $1/[Q]$ gives a straight line with a slope of $1/K_{eff}$ and an intercept of $1/f$. Thus, from such a representation, one can easily establish the fraction of the accessible fluorescence. If the fluorophore has the same specific fluorescence in all compartments, then this fraction is also equal to the fraction of the accessible fluorophore. Using a mixture of valinomycin and nigericin, i.e. a combination of ionophores which collapses the cation electrochemical potential difference between two (or more) compartments separated by biological membranes, the pH becomes equal throughout the system. Thus, we secure the same specific fluorescence in all compartments and establish the fraction of the accessible fluorophore. In the above presentation we have ignored pH gradients due to a possible Donnan distribution of anions (such as Cl^-), assuming that the long preincubation in the starvation medium removed or, at least, diminished such factors.

Results and discussion. *Determination of the pK of the bound dye.* The results of a pH titration of the dye bound to bacterial membranes are presented in Fig. 1.

As can be seen from this figure, the sigmoidal curve resulted has an inflexion point around pH 10, which gives the pK of the bound form of the dye. This result compares well with the results reported for similar types of membranes [14]. HDHC is too lipophilic to dissolve in water, but it can be dissolved in detergent micelles. We also determined the pK of the dye bound to such micelles (0.5% Tween—20 in 100 mM KCl + 1 mM NaPi) and found a value of 8.7, which is also very close to the one reported in the literature [14].

The significance of Na^+ involvement in active experiments. Using HDHC-treated bacteria, as described in the experimental section, we were able to record fluorescence changes associated with respiration. An anaerobic transition is always accompanied by an increase of the fluorescence (hence, of the pH) and the reintroduction of oxygen (by stirring) is associated with the decrease of the fluorescence of a certain "hidden" compartment, because these extensive and relatively rapid changes

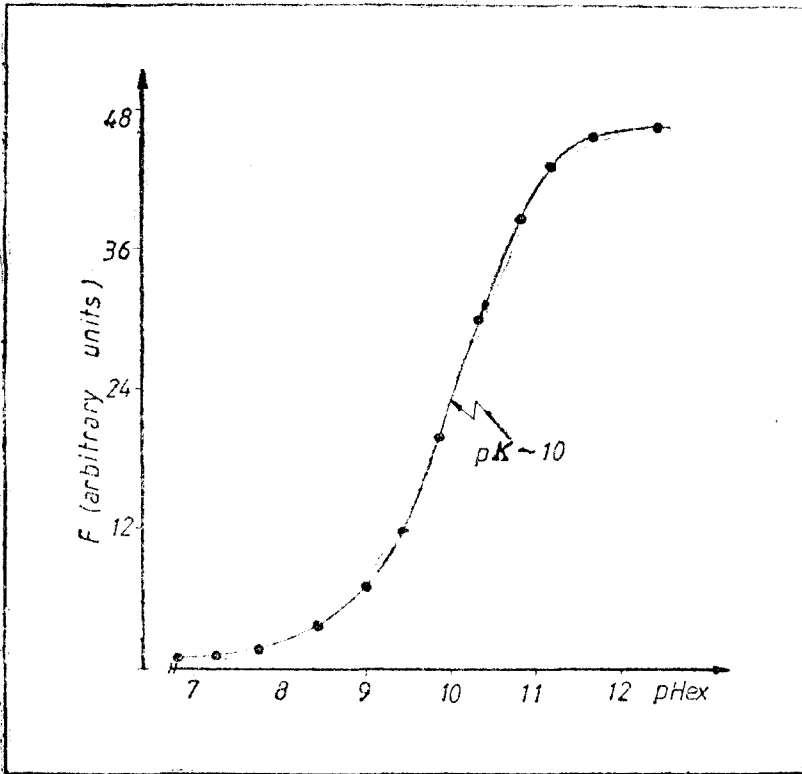


Fig. 1. Determination of the pK of HDHC in bacterial suspensions. 0.4 mg d.w.b./ml were suspended in 100 mM KCl + 1 mM NaP_i and pH was changed by the addition of small aliquots of 2.5 M KOH and/or HCl. Bacteria were preincubated for 3 hrs with HDHC in the same medium and the concentration of dye was calculated to be 3.75 nmoles/mg d.w. b.

could not be recorded by an external pH electrode even when the external medium was very slightly buffered. However, there are two possibilities: either this hidden compartment is the cytoplasmic space and the decrease in fluorescence upon initiation of respiration reflects the acidification of the cytoplasm; probably as a consequence of a rapid reentry of protons in exchange for Na⁺ (on the Na⁺/H⁺ antiporter), as mentioned in the introductory section (see also [6]), or the phenomenon reflects indeed the acidification of an external restricted compartment, which equilibrates only slowly with the cytoplasm and the external bulk volume. To test this alternative we took the precautionary measures to make the antiporter inoperative, by long periods (2.5–15 hrs) of starvation in the absence of any substrate and Na⁺, and thus to deplete the cells of their energy and Na⁺ reserves. The response did not change or diminish. Nevertheless,

the use of amiloride at high concentrations ($> 10 \mu\text{M}$) began to decrease the fluorescence changes. However, a control performed with the oxygen electrode indicated that the respiration was inhibited in a similar manner. Thus, the decreases are due not to the inhibition of the antiporter but of the respiration itself.

A more-bothering problem was the observation that malate was apparently a poor substrate in the absence of Na^+ , *i.e.* the anaerobic transition took place only after a prolonged incubation of bacteria in the assay cuvette (close to 1 hr). Again, a control performed with the oxygen electrode indicated that, in the absence of Na^+ , malate did not stimulate the respiration until after a long period of incubation. If Na^+ was added (1–5 mM), the respiration was stimulated 4–5 times. This stimulation was gradual, increasing over a period of a few minutes, after an initial lag of about 30 sec. We interpret this as a Na^+ dependence of malate uptake. In fact, the Na^+ —dependent uptake of amino acids by different alkalophilic species of the genus *Bacillus* is well documented in the literature (see, for ex. [7, 10]). Nevertheless, this apparently constant involvement of Na^+ in the fluorescence changes monitored by us was rather worrying. Therefore, we tried some other substrates to see whether they show the same Na^+ dependence. To our relieve, ascorbate + TMPD or glucose did not require Na^+ to produce such changes. One recording with ascorbate + TMPD is shown in Fig. 2, and similar recordings could be obtained with glucose (not shown), but glucose was not such a good substrate as malate + Na^+ . Due to this fact and to the possible additional complications with ascorbate, which liberates H^+ in the medium when it donates electrons to TMPD, we performed most of the experiments with sodium malate (5 mM).

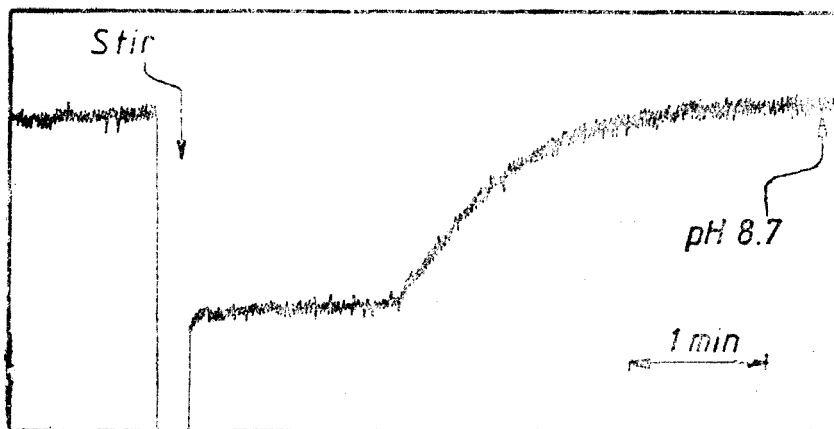


Fig. 2. Effect of an anaerobic-aerobic transition on HDHC fluorescence in bacteria respiring on ascorbate + TMPD. 0.5 mg d.w.b./ml were suspended in 100 mM KPi + 10 mM MgSO_4 (pH 9) and 20 mM potassium ascorbate + 0.1 mM TMPD were added as respiratory substrates. Bacteria were preincubated with HDHC for 3 hrs in the suspending medium and the dye was calculated to be 1.87 nmoles/mg d.w.b.

Determination of the dye distribution between different compartments. The pK of HDHC bound to bacterial membranes (around pH 10) allows accurate measurements of pH changes between 7.5 and 11.5, if an appropriate titration standard curve is obtained. The problem in the heterogeneous systems, however, is to determine the fraction of the dye which is responsible for the fluorescence change observed, otherwise the result is usually underestimated. For example, in a clear two-compartment system, such as cytochrome oxidase vesicles prepared in a medium of low buffering power and suspended in a strongly buffered environment, the fluorescence changes elicited by respiration reflect only the pH changes associated with the dye bound internally. If the fluorophores were equally distributed between the external and internal face of the membrane, then we could use directly a corresponding standard curve to determine the pH changes. In fact (see [16]), the distribution of the dye between the outer and inner face of the cytochrome oxidase vesicle membrane is 2:1 (i.e., the fraction of the dye outside is 0.66 as compared to 0.33 inside), which leads to an underestimation of the true pH changes by a factor of two.

The problem is even more complicated with bacteria. Their internal buffering power is strong, especially in alkalophilic species or strains which must be able to maintain a relative neutrality of the cytoplasm, at external pH values that are in many cases larger than 10.5. Therefore, a change in the cytoplasmic pH should be both difficult to monitor and irrelevant for the true magnitude of the Δ pH supposed to be created by respiration, according to the chemiosmotic theory of Mitchell [13]. Anyway, if the cytoplasm is not so strongly buffered and the fluorescence decrease observed by us is due to proton reentry in the cytoplasm, we should also be able to see the initial fluorescence increase that is expected to accompany the proton extrusion when the respiration is initiated, a fact which we never observed. On the other hand, a rapid and extensive pH change, such as the one observed in the present experiments, can not occur in the external medium, which is at least moderately buffered and immensely larger in comparison with the cytoplasmic space of the bacteria. Such changes could be detected only if there existed a restricted space in which the protons are pumped and which does not equilibrate easily with the rest of the external volume. If the fluorescence decrease observed in the present work represents neither an acidification of the cytoplasm nor a pH decrease of the external medium (new evidence and arguments will be brought on these points later), then it should be due to the presence of a third compartment. However, this third (totally or partly) inaccessible compartment complicates the determination of the fluorophore distribution between different compartments. Nevertheless, we applied the method of the impermeant quencher [11] and the results obtained support the existence of a special inaccessible compartment.

Table 1 presents the numerical data of fluorescence changes recorded in the absence and presence of valinomycin + nigericin, at different quencher (DPX) concentrations. The same results are presented in terms of eq. (1) in Fig. 3 (i.e., $F_0/\Delta F$ vs. $1/[\text{DPX}]$).

As can be seen, the line obtained in the presence of the two ionophores (A) is characterised by a much higher slope and intercept than the one resulted in the absence of the ionophores (B). Thus, in the first case, the intercept read from the graphic is around 4, which gives the fraction of the accessible fluorophore as $1/4 = 0.25$. In fact, the application of the least-square method for A gives a regression line with a slope of 39.588 mM, leading to $K_{\text{off}} = 1/39.588 = 0.0253 \text{ mM}^{-1}$, and an intercept of 3.966 (i.e., $f = 1/3.966 = 0.2521$, or 25.21%), whereas for B the slope is 6.462 mM ($K_{\text{off}} = 0.155 \text{ mM}^{-1}$) and the intercept is 1.41 ($f = 0.7092$, i.e., close to 71%).

Since, as argued in our experimental section, in the presence of the two ionophores the pH is very likely identical throughout the system, the value of f in this case represents the fraction of the accessible fluorophore. The presence of only about 25% of the fluorophore in the external (accessible) space leaves approximately 75% of the dye in some inaccessible compartment(s). If there are only two compartments, such a distribution is very unlikely. As mentioned before, in the case of the cytochrome oxidase vesicles this distribution is 67% outside and 33% inside (inaccessible). For a bacterial cell, which is much larger and for which the physical asymmetry between the outer and inner leaflet of the bilayer is very small, the distribution expected is close to 50%, if there are only two compartments. The fact that in the present study the inaccessible fluorophore is close to 75% means that approximately 25%

Table 1

Numerical data of fluorescence quenching by DPX

The conditions are identical to those in Fig. 3. F_0 is the fluorescence recorded before the addition of the quencher, while F is the fluorescence at different quencher (DPX) concentrations.

[DPX] (mM)	$1/[\text{DPX}]$ (mM^{-1})	F (arbitrary units)	$\Delta F =$ $F_0 - F$	$F_0/\Delta F$	F (arbitrary units)	$\Delta F =$ $F_0 - F$	$F_0/\Delta F$
NO IONOPHORE					7.5 μM Val + 3.75 μM Nig		
		$F_0 = 52.7$	---	---	$F_0 = 97.8$	---	---
1.0	1.000	46.0	6.7	7.8657	95.5	2.3	42.5217
3.0	0.333	38.0	14.7	3.5850	93.0	4.8	20.3750
7.0	0.143	30.0	22.7	2.3216	88.0	9.8	9.7796
14.5	0.069	24.5	28.2	1.7895	82.0	15.8	6.1898
29.0	0.034	20.0	32.7	1.6116	75.0	22.8	4.2875
48.0	0.021	—	—	—	72.0	25.8	3.7917

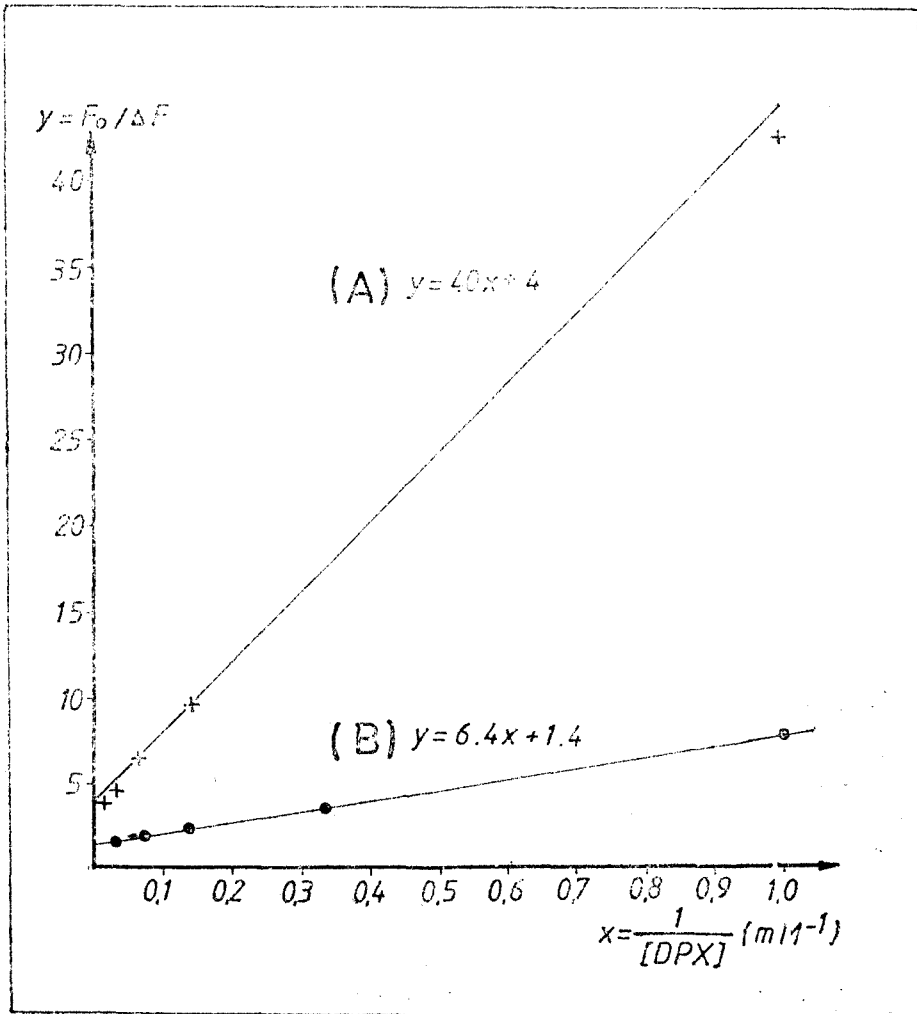


Fig. 3. Fluorescence quenching of membrane-bound HDHC by DPX. The conditions were similar to those in Fig. 1, except that the pH was kept constant at 10.8 and DPX was varied as shown. In A, 7.5 μM valinomycin and 3.75 μM nigericin were also present.

of the dye is neither in the internal compartment nor in the external one, but still inaccessible (i.e., in a third compartment),

The much larger value of f (70.92%) obtained in the absence of the ionophores can be easily explained. Since the pH of the suspending medium is much higher (10.8) than that of the inaccessible compartments (probably below 9), the fluorescence decrease associated with the quenching of the 25% of the dye (found in the true external space,

where the pH is higher than in the inaccessible spaces) represents cca 71% of the entire signal. We expect that by lowering the pH of the suspending medium the contribution of the external dye should decrease. The results presented in Table 2, obtained at pH 9, tend to confirm this supposition. Here we get $f = 65.87\%$ for the anaerobic state (a state similar to the situation described above). During the active (aerobic) state, however, the relative quenching is higher (84.67%). In our view, this is so because during respiration the decrease of the fluorescence inside the special compartment (due to the increase of the proton concentration) makes the apparent contribution of the external fluorophore larger. At pH 8.8 (Table 3) f is 58.8% for the anaerobic state and 75.58% for the aerobic state. We should mention, however, that these last results were obtained in Tris medium, where the fluorescence changes associated with the aerobic-anaerobic transition are somewhat smaller than in KPi medium, as we shall see in the next subsection. It is also worth mentioning that the small number of experimental data in Tables 2 and 3 are partially explained by the necessity of eliminating the data obtained at high DPX concentration (> 40 mM), where we observed inhibitory effects of this drug on respiration.

A synthesis of the results obtained for [DPX] titration, including the correlation coefficient r and its statistical significance is presented in Table 4. It can be seen that the correlation is in all cases statistically significant.

Estimation of the pH gradients created by respiration. If there existed only one inaccessible compartment (i.e., the cytoplasm), where the protons were pumped, the values of f obtained under anaerobic conditions should have been much smaller. In fact, as the pH of the medium decreased and approached the cytoplasmic pH this fraction should have decreased towards 0.25 (the fraction of the accessible

Table 2

Fluorescence quenching by DPX in phosphate medium

Bacteria (0.5 mg d.w./ml) were suspended in 100 mM KPi + 10 mM MgSO₄, pH 9.0, with 5 mM sodium malate as respiratory substrate. They were preincubated with HDH (1.85 μ moles/mg d.w.b.) in the same medium (no substrate) for 3 hrs at 30°C (with shaking). The subscript R stands for „respiration” and AN for „anaerobiosis”. The significance of the symbols is identical to that in Table 1.

[DPX] (mM)	1/[DPX] (mM ⁻¹)	F (arbitrary units)	ΔF	$F_0/\Delta F$	f_{AN}	F (arbitrary units)	ΔF	$F_0/\Delta F$	f_R
$F_0 = 80.5$: Anaerobiosis					$F_0 = 54.0$: Respiration				
4.0	0.250	71.0	9.5	8.4737		47.0	7.0	7.7143	
12.0	0.083	59.0	21.5	3.7472	0.6587	37.0	17.0	3.1765	0.8467
33.0	0.030	47.0	33.5	2.4029		28.0	26.0	2.0769	

Table 3

Fluorescence quenching by DPX in Tris medium

The conditions are identical to those in Table 2, except that the bacteria were assayed in Tris medium (50 mM KCl + 50 mM NaCl + 25 mM Tris-HCl + 5 mM MgSO₄), pH 8.8.

[DPX] (mM)	1/[DPX] (mM ⁻¹)	F (arbitrary units)	ΔF (arbitrary units)	F ₀ /ΔF	f _{LN}	F (arbitrary units)	ΔF (arbitrary units)	F ₀ /ΔF	f _R
F ₀ = 54.0: Anaerobiosis					F ₀ = 28.1: Respiration				
4.00	0.250	49.0	5.0	11.889		26.0	2.1	13.3809	
11.65	0.085	43.0	11.0	4.909	0.5880	23.0	5.1	5.5098	0.7563
26.30	0.038	36.0	18.0	3.067		19.0	9.1	3.0879	

fluorophore). From our results, it is apparent that this fraction approaches 0.5, meaning that the fluorophore distributes about equally between the two active compartments (0.25 externally and 0.25 in the special compartment). This conclusion makes easier the calculation of the true pH change produced in the aerobic transition, because there is no need for a correction factor due to the dye distribution. However, as we shall see, there are other factors that have to be taken into consideration for a correct ApH evaluation.

Fig. 4 presents a series of fluorescence changes following an anaerobic-aerobic transition, at 3 different pH values.

From the study of such recordings we can make some interesting observations. In trace A, besides the large fluorescence changes associated with the anaerobic-aerobic transitions, one can also observe a slight but constant increase in the fluorescence of some inaccessible compartment. It is not the external (accessible) compartment because the suspending medium is strongly buffered (100 mM KPi, pH 7.5). Moreover, measurements of the external pH show that this stays practically constant. In fact, during half an hour of respiration, the pH

Table 4

Synthesis of the regression parameters from Tables 1-3

Conditions	Slope (mM)	K _{eff} (1/slope)	Intercept (1/intercept)	f	r	N	p
As in Table 1							
No addition	6.462	0.1547	1.410	0.7092	0.9939	5	<0.001
Val + Nig	39.588	0.0253	3.963	0.2521	0.9933	6	<0.001
As in Table 2							
Anaerobiosis	27.730	0.0361	1.518	0.6537	0.9990	3	<0.05
Respiration	25.962	0.0385	1.181	0.8467	0.9934	3	<0.05
As in Table 3							
Anaerobiosis	36.486	0.0274	1.701	0.5880	0.9994	3	<0.05
Respiration	48.310	0.0207	1.321	0.7570	0.9997	3	<0.02

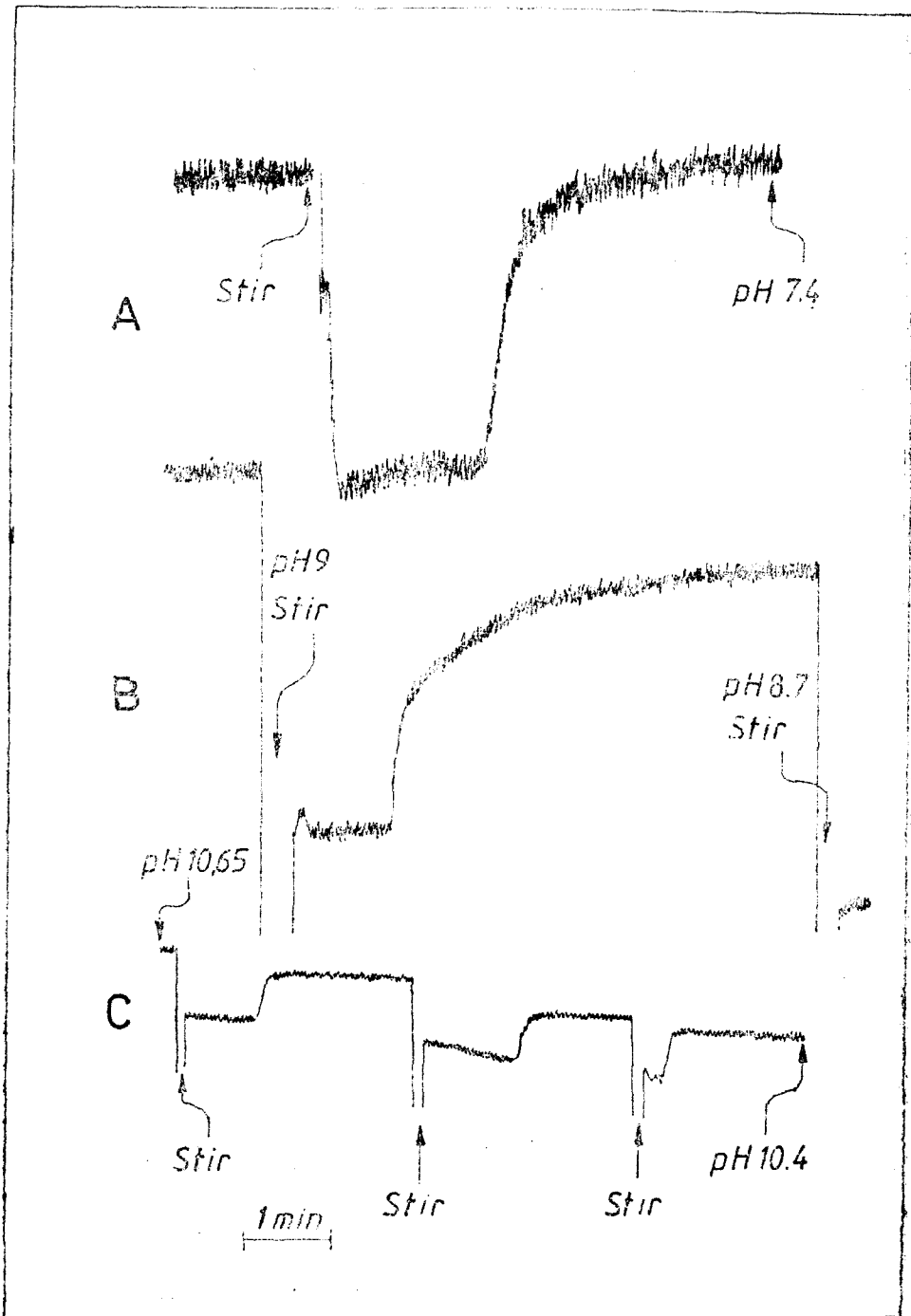


Fig. 4. Fluorescence changes associated with anaerobic-aerobic transitions at 3 different pH values. 0.5 mg d.w.b./ml were preincubated (starved) in the presence of HDIC under conditions similar to those in Fig. 2. Bacteria were suspended in the assay cuvette as described in text, with 5 mM sodium malate as respiratory substrate. The appropriate pH was obtained by the use of small aliquots of concentrated KOH or HCl.

slightly decreased (to 7.4, as measured with a pH electrode). Very likely, the small but constant increase in fluorescence reflects the loss of protons from the special compartment, which should be more acidic than the cytoplasm.

The results of a slightly different approach are presented in trace B of Fig. 4. Here, the bacteria are suspended in Tris medium (25 mM) and several pulses of HCl (and/or KOH) are added, which produce changes of about 0.3 pH units in the external medium (as measured with the pH electrode). Along with the addition of HCl on the anaerobic state, an aerobic transition also occurs. From this, one can appreciate that the pH change associated with a respiratory transition is much larger than 0.3 pH units (we shall return to a more exact discussion on this point later).

For trace C of Fig. 4, the bacteria are suspended in KPi medium, at an initial pH of 10.95. In about 15 min of alternating transitions, the pH of the medium decreased to 10.40. This is reasonable, since phosphate does not buffer at this high pH. In fact, we observed that even in the growth medium, buffered with carbonate at pH 10.85, the pH of the medium decreased to 9.84 during the growing period (14–15 hrs). Trace C represents in fact only about half of the 15-min recording mentioned above. In about 7 min, the pH decreased from 10.65 to 10.40, mostly during the aerobic state, as can be seen from the figure. The much smaller decrease during the anaerobic phase may reflect the passive proton diffusion into the medium, due to the large pH gradient that probably still exists. This is supported by the observation that at a pH lower than 9 such a decrease is not observed, even at a low buffering power.

Recordings similar to those presented in Fig. 4B were made at pHs varying between 6 and 11.5. Since the absolute magnitude of the fluorescence changes is very much pH-dependent, we calculated the relative fluorescence change $\Delta F/F$ as a measure of the pH change associated with the respiration, where ΔF is the difference between F in the anaerobic and F in the aerobic state. It can be seen from Fig. 5A that the relative fluorescence change has a maximum between pH 7 and 7.5. Then, it decreases to an approximate steady state between pH 8 and 9, after which it continues to diminish with an increasing slope, tending to zero above pH 11. As mentioned before, the relative changes obtained in Tris medium (Fig. 5B) are generally smaller than in phosphate medium (Fig. 5A). This is probably due to the fact that Tris may act as a semipermeant base, leading to partial dissipation of the pH gradient.

The next problem is whether we can estimate the pH gradients generated through respiration by comparing them with pH changes that take place in the external medium (i.e., sensed by the accessible fluorophore). Since we have accepted that the fraction of the external dye and the one found in the special compartment are nearly equal, the procedure seems warranted. However, because of the strong non-

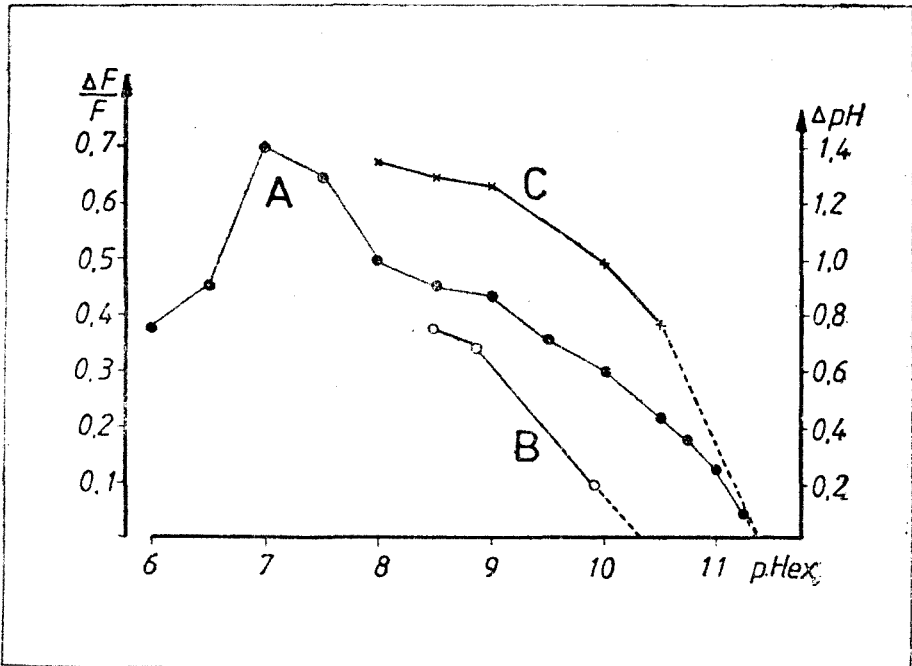


Fig. 5. Relative fluorescence changes and the estimation of ΔpH associated with respiration at different pH values. The starvation (preincubation) and suspending conditions were similar to those in Fig. 4 (see also explanations in text). A and B refer to $\Delta F/F$, whereas C refers to ΔpH .

linear dependence of ΔF on pH this is so only when pH of the special compartment varies relatively little right around the value of the external pH. We can assume that under resting (anaerobic) conditions the pH of the special compartment is very similar to that of the cytoplasmic space. Extrapolating the results of Kitada *et al.* [6] and also taking into account other literature data (for ex. [3, 8]), we can assume that the pH of this compartment rises more or less linearly between 7.5 and 9.5 when the external pH varies between 6 and 11.5. Theoretically, the pH of the two compartments should match around pH 8—8.5, where a direct comparison is thus possible. Under these conditions, the ΔpH generated during an aerobic transition was found to be 1.30—1.35 units. Such direct comparisons at pH 9, 10 and 10.5 lead to much smaller values (0.72, 0.22 and 0.16 pH units, respectively). However, if the titration curve in Fig. 1 is used for adequate corrections (*i.e.*, each of the above numbers is multiplied by the ratio of F read at a certain external pH and F corresponding to the probable pH of the special compartment), the results obtained are 1.26, 0.99 and 0.76, respectively. If these results are plotted against pH, one gets the trace C in Fig. 5, which parallels reasonably well the other two curves in the

figure. By linear extrapolation to the pH where $\Delta F/F$ is zero, one can see that even at an external pH of 11 there is still a ΔpH of approximately 0.3—0.35 units. We want to stress that we are aware of the relativity of these calculations. They may be overestimated due to different assumptions that we made with regard to the dye distribution. They could equally well be underestimated if we consider that the matching pH is lower. In fact, according to Koyama and Nosh [8], this is the case for a facultative alkalophile of the genus *Bacillus*. The important thing is that our results are consistent with the presence of a special compartment, involved in maintaining a normal ΔpH with respect to the cytoplasm and that this ΔpH is rather significant.

Final discussion. Although our results are very interesting, they do not answer the question of the possible origin and conformation of the special compartment that was postulated by us. We do not want to speculate on this problem but to remind that B.f. is a Gram-positive bacterium which possesses a thicker and more elaborated cell wall than the Gram-negative bacteria. Even though the composition of this wall is generally known, its exact structure and composition may still reserve certain surprises. As discussed by Horikoshi [5], there are certain differences between bacteria grown at neutral and high pH with regard to the composition and electric charge of the cell wall. In addition, protoplasts of the alkalophilic *Bacillus* strains lose their stability against alkalophilic environments, which clearly points to the importance of this wall for the accommodation to high pH.

If our results and our interpretation can be confirmed by other methods or by extension to simpler systems, such as right-side-out bacterial vesicles, then the possible functioning of a localised or semilocalised chemiosmotic mechanism of energy conservation should be seriously taken into consideration, at least in some alkalophilic bacteria. What is most peculiar about this mechanism is that while $\Delta \psi$ may still be a delocalised thermodynamic force, ΔpH should be strictly localised. We predict that if this were the case the delocalised $\Delta \psi$ could be generated only by respiration and not by the reverse activity of the bacterial ATP synthase, which should also be localised. However, it may be possible that such bacteria possess two populations of more or less identical ATP synthases, one of them being active only at moderate external pHs (6—9) while the localised population preserves its synthetic activity up to pH 11 or even higher. This may explain the difficulty of demonstrating the presence of such a semilocalised mechanism, since it does not necessarily require a pH-dependent drop in $\Delta \psi$.

Conclusions. Our results point to the possible existence of a special compartment in the alkalophilic bacterium *Bacillus firmus* OF4, where protons are sequestered during respiration. Thus, a normal ΔpH can be established and ATP synthesis can occur by a chemiosmotic mechanism, with the usual stoichiometry of $3H^+/ATP$. Although such a mechanism should be of a localised or semilocalised type, in the sense explained

in our final discussion, it should not be confused with the one proposed by Krulwich [9], which implies an intramembrane proton pathway opening at high pH by a proton-gated mechanism.

REFERENCES

1. Booth, I. R., *Regulation of cytoplasmic pH in bacteria*, „Microbiol. Rev.“, **4**, 1985, 359—378.
2. Dimroth, P., *The ATPases of Propionigenium modestum and Bacillus alkalophilus. Strategies for ATP synthesis under low energy conditions*, „Biochim. Biophys. Acta“, **1101**, 1992, 236—239.
3. Guffanti, A. A., Blanco, R., Benenson, R. A., Krulwich, T. A., *Bioenergetic properties of alkaline-tolerant and alkalophilic strains of Bacillus firmus*, „J. Gen. Microbiol.“, **119**, 1980, 79—86.
4. Hoffman, A., Dimroth, P., *The electrochemical proton potential of Bacillus alkalophilus*, „Eur. J. Biochem.“, **201**, 1991, 467—473.
5. Horikoshi, K., *Microorganisms in Alkaline Environment*, Kodausha Ltd., Tokyo, 1991.
6. Kitada, M., Onda, K., Horikoshi, K., *The sodium/proton antiport system in a newly isolated alkalophilic Bacillus sp.*, „J. Bacteriol.“, **171**, 1989, 1873—1884.
7. Koyama, M., Kiyomiya, A., Nosoh, Y., *Na⁺-dependent uptake of amino acids by an alkalophilic Bacillus*, „FEBS Lett.“, **72**, 1976, 77—78.
8. Koyama, N., Nosoh, Y., *The role of potassium and sodium ions on the cytoplasmic pH of an alkalophilic Bacillus*, „Biochim. Biophys. Acta“, **812**, 1985, 206—212.
9. Krulwich, T. A., *Bioenergetics of alkalophilic bacteria*, „J. Membrane Biol.“, **89**, 1986, 113—125.
10. Krulwich, T. A., Guffanti, A. A., Bornstein, R. F., Hoffstein, J., *A sodium requirement for growth, solute transport and pH homeostasis in Bacillus firmus RAB*, „J. Biol. Chem.“, **257**, 1981, 1885—1889.
11. Lehrer, S. S., *Solute perturbation of protein fluorescence. The quenching of tryptophyl fluorescence of model compounds and of lysozyme iodide ion*, „Biochemistry“, **10**, 1971, 3254—3263.
12. McLaggan, D., Selwyn, M. J., Dawson, A. P., *Dependence on Na⁺ control of cytoplasmic pH in a facultative alkalophile*, „FEBS Lett.“, **165**, 1984, 254—257.
13. Mitchell, P., *Chemiosmotic Coupling and Energy Transduction*, Glynn Res. Ltd., Bodmin, England, 1968.
14. Pal, R., Petri, W. A., Barenholz, Y., Wagner, R. R., *Lipid and protein contribution to the membrane surface potential of vesicular stomatitis virus probed by a fluorescence pH indicator, 4-heptadecyl-7-hydroxycoumarin*, „Biochim. Biophys. Acta“, **729**, 1983, 185—192.
15. Skulachev, V. P., *The laws of cell energetics*, „Eur. J. Biochem.“, **208**, 1992, 203—209.
16. Tarba, C., Tattrie, B., Nicholls, P., *Use of fluorescent probes for a new evaluation of $\Delta\psi$ and ΔpH in cytochrome oxidase vesicles*, „Stud. Univ. Babeş-Bolyai, Biol.“, **38** (1—2), 1993, 81—92.

IZOLARI DE MICROORGANISME PRODUCĂTOARE DE ANTIBIOTICE

ANCA LIVIA BUTIUC* și MIHAIL DRAGAN-BULARDA**

SUMMARY. — **Isolation of Microorganisms Producing Antibiotics.** The antibiotics has a great importance, taking into account the large number of microorganisms present in certain microhabitats and their great ability of multiplication. We have tested the antimicrobial activity of 28 strains of actinomycetes and 31 strains of micromycetes isolated from different types of soils, and a compost, against different Gram-positive and Gram-negative bacteria. From these, 12 strains of actinomycetes have antimicrobial activity against Gram-positive bacteria (*S. aureus*, *B. subtilis*) and Gram-negative bacteria (*E. coli*, *Ps. aeruginosa*), and 12 strains of micromycetes have antimicrobial activity only against Gram-positive bacteria (*S. aureus*, *B. subtilis*).

Antibioza este fenomenul determinat de acțiunea unor compuși chimici specifici produși de diferite organisme, care în concentrații mici au un efect inhibitor sau letal asupra unor microorganisme [5].

Este probabil că în sol, cel mai adesea, microorganismele antagoniste se găsesc în stare latentă (spori sau alte forme de rezistență). Creșterea lor vegetativă și producerea de antibiotice sunt limitate la scurte perioade când condițiile de mediu sunt corespunzătoare. De aceea, în sol biogeneza antibioticelor are loc în microhabitate și este discontinuă în timp și spațiu. După formare, antibioticele sunt fie secrete, fie eliberate după moartea și autoliza celulelor producătoare [3].

Există puține probe concrete privind producerea antibioticelor în mediile naturale și nu se poate afirma categoric că antibioticele ar avea un anumit rol în ecologia microorganismelor din sol. Aceasta mai ales pentru faptul că datele referitoare la producerea antibioticelor *in vitro* nu pot fi extrapolate la condițiile din sol [9]. În condiții de laborator, producerea de antibiotice are loc în faza logaritmică de creștere sau în faza staționară de creștere (idiofaza) [2].

Deși, în general, din acest punct de vedere, aproape toate tipurile de sol au fost avute în vedere, solurile nisipoase, nisipoase deșertice sau limitrof deșertice au fost mai puțin cercetate. Din acest motiv, am inițiat cercetări pentru izolări de microorganisme din probele unor soluri nisipoase din Delta Dunării și studiarea activității antibiotice a tulpinilor izolate. Am analizat și alte probe de sol, precum și un compost. Am izolat și am studiat tulpini de actinomicete și micromicete.

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

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

Material și metode. Tulpini de actinomicete au fost izolate din 6 probe de sol, din care 4 au provenit din soluri nisipoase ale Deltei Dunării, iar câte o probă dintr-un sol brun de grădină și un cernoziom levigat cultivat cu grâu. Micromicetele au fost izolate din 3 probe de sol (sol brun de grădină, cernoziom levigat cultivat cu grâu și sol aluvial cultivat cu lucernă) și dintr-o probă de compost de la Grădina Botanică a Universității noastre.

Probele de sol și proba de compost au fost prelevate în condiții aseptice. Din ele s-au preparat diluții zecimale. Pentru izolarea actinomicetelor, câte 1 ml din diluția 10^{-7} , iar pentru izolarea micromicetelor câte 1 ml din diluția 10^{-8} s-au inoculat pe medii solide [4].

Pentru izolarea actinomicetelor s-au utilizat 3 medii de cultură, specificate mai jos.

1. Mediul electiv pentru izolarea streptomicetelor [1], având următoarea compoziție: glicerol 1,0 g, acid caseinic 0,03 g, KNO_3 0,2 g, NaCl 0,2 g, K_2HPO_4 0,2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5,0 mg, CaCO_3 2,0 mg, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,0 mg, agar-agar 1,8 g, apă distilată 100 ml. Se corectează pH-ul mediului la 7,0—7,2. Mediul se sterilizează prin autoclavare la 115°C , 30 min.

2. Mediul cu asparagină și glucoză, după Waksman [1], cu următoarea compoziție: glucoză 1,0 g, asparagină 0,05 g, K_2HPO_4 0,2 g, agar-agar 1,5 g, apă distilată 100 ml. pH-ul mediului se aduce la 6,8. Mediul se sterilizează prin autoclavare la 115°C , 30 min.

3. Mediul cu glucoză-extract de drojdie-agar [1], cu următoarea compoziție: glucoză 1,0 g, extract de drojdie 1,0 g, agar-agar 2,5 g, apă distilată 100 ml. pH-ul mediului se stabilește la 6,8. Mediul se sterilizează prin autoclavare la 115°C , 30 min.

Mediul de cultură utilizat pentru izolarea micromicetelor a fost mediul Czapek-Dox [4], având un pH de 5,5—6,0 pentru împiedicarea dezvoltării bacteriilor. Compoziția mediului este: NaNO_3 3,0 g, KH_2PO_4 1,0 g, KCl 0,5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01 g, glucoză 40 g, agar-agar 18 g, apă distilată 1000 ml. Mediul de cultură s-a sterilizat în autoclav, la 120°C , 30 min.

Incubarea s-a făcut la 30°C timp de 6 zile pentru actinomicete și 5 zile pentru micromicete. Din coloniile rezultate s-au făcut froțiuni, care s-au colorat după metoda Gram [4] și s-au studiat la microscop pentru evidențierea actinomicetelor și a micromicetelor.

Criteriile, pe baza cărora s-a făcut diferențierea tulpinilor de actinomicete și micromicete din sol, au fost: forma și aspectul coloniilor, dimensiunea hifelor, pigmentația (s-a urmărit pigmentul miceliului aerian, pigmentul miceliului de substrat și pigmentul difuzibil în mediu) [6—8].

Pentru testarea activității antibiotice a tulpinilor izolate s-a folosit metoda difuzimetrică [4]. Drept bacterii test s-au folosit tulpini standard (culturi de 18—20 h în bulion de carne) de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 și o tulpină nestandardizată de *Bacillus subtilis*. Turbiditatea inoculului a fost ajustată, folosindu-se un standard nefelometric [4].

Pentru producerea antibioticelor de către actinomicete s-a folosit mediul 1 utilizat și pentru izolarea tulpinilor, iar pentru producerea antibioticelor de către micromicete s-a folosit mediul Czapek-Dox la care s-a adăugat extract de porumb (2%).

Testarea activității antibiotice s-a făcut pe geloză simplă, sterilizată prin autoclavare la 120°C , 30 min. Citirea rezultatelor s-a făcut după 24 h de incubare la 37°C , măsurându-se diametrul zonelor de inhibiție.

Rezultate și discuții. Rezultatele obținute la izolarea tulpinilor de actinomicete sunt prezentate în Tabelul 1. În ceea ce privește distribuția actinomicetelor în cele 6 probe de sol studiate, se poate observa că numărul unităților formatoare de colonii (u.f.c.) evidențiat din probele solurilor nisipoase din Delta Dunării este comparabil cu cel evidențiat din solul brun de grădină și cernoziomul levigat cultivat cu

Tabel 1

Numărul total al actinomicetelor și al tulpinilor de actinomicete izolate din probe de sol

Proveniența probelor analizate	Mediul 1		Mediul 2		Mediul 3	
	u.f.c./g sol $\times 10^7$	Tulpini	u.f.c./g sol $\times 10^7$	Tulpini	u.f.c./g sol $\times 10^7$	Tulpini
Sol nisipos P ₁	3	2	3	1	2	1
Sol nisipos P ₂	9	1	6	1	4	1
Sol nisipos P ₂ cu vegetație stepică	10	3	8	2	5	2
Sol nisipos P ₃	5	3	4	1	3	1
Sol brun de grădină	3	1	4	1	2	1
Cernoziom levigat cultivat cu grâu	9	3	7	2	3	1

grâu. Din acest tabel se mai poate observa că cele mai bune rezultate s-au obținut pe mediul 1 și cele mai slabe pe mediul 3. Cel mai mare număr de actinomicete s-a evidențiat din solul nisipos P₂ cu vegetație stepică ($10 \cdot 10^7$ u.f.c./g sol), ceea ce confirmă influența pe care o are vegetația asupra numărului actinomicetelor în soluri.

Tabelul 2 arată că cel mai mare număr de micromicete s-a înregistrat în proba solului brun de grădină ($10 \cdot 10^5$ u.f.c./g sol), ceea ce poate fi atribuit faptului că acest sol a fost tratat cu îngrășăminte. Numărul de micromicete este influențat și de vegetație; așa se explică valoarea ridicată ($18 \cdot 10^5$ u.f.c./g sol) evidențiată din proba cernoziomului levigat cultivat cu grâu. Numărul cel mai mic de micromicete s-a înregistrat în proba solului aluvial cultivat cu lucernă. Compostul favorizează dezvoltarea unui număr mare de micromicete care participă la procesele de descompunere a materiilor vegetale.

În Tabelul 3 sunt prezentate rezultatele privind activitatea antibiotică a tulpinilor de actinomicete. Activitatea antibiotică este variată, în sensul că s-au izolat tulpini active față de toate cele 4 bacterii

Tabel 2

Numărul total al micromicetelor și al tulpinilor de micromicete izolate din probe de sol și compost

Proveniența probelor analizate	u.f.c./g sol sau compost $\times 10^5$	Tulpini
Sol brun de grădină	19	10
Cernoziom levigat cultivat cu grâu	18	9
Sol aluvial cultivat cu lucernă	12	5
Compost	14	7

test utilizate. Se observă că din totalul de 28 tulpini de actinomicete izolate (100%), 12 tulpini (42,85%) au activitate antibiotică față de diferite bacterii test: 3 tulpini (10,71%) sunt active față de *S. aureus*, 3 tulpini (10,71%) sunt active față de *E. coli*, 8 tulpini (28,57%) sunt active față de *B. subtilis* și 3 tulpini (10,71%) sunt active față de *Ps. aeruginosa*. Se mai poate remarca faptul că 5 tulpini (17,85%) sunt active față de două bacterii test, și anume: tulpina A₁ este activă față de *S. aureus* și *B. subtilis*; tulpinile C₆ și G₆ sunt active față de *B. subtilis* și *E. coli*; tulpina C₉ este activă față de *S. aureus* și *E. coli*, iar tulpina G₉ este activă față de *B. subtilis* și *Ps. aeruginosa*.

Este posibil ca actinomicetele care au activitate antibiotică atât asupra bacteriilor Gram-pozitive, cât și asupra celor Gram-negative, să sintetizeze fie un antibiotic cu spectru larg de acțiune, fie două antibiotice distincte cu acțiune diferită asupra celor două categorii bacteriene.

Tabel 3

Activitatea antibiotică a tulpinilor de actinomicete

Tulpina	Bacteria test			
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>Ps. aeruginosa</i>
A ₁	+*	--	+	--
A ₂	--	--	--	+
A ₃	--	--	--	--
B ₁	--	--	--	--
B ₄	--	--	+	--
B ₅	--	--	+	--
C ₆	--	+	+	--
C ₇	--	--	--	+
C ₉	+	+	--	--
G ₁	+	--	--	--
G ₆	--	+	+	--
G ₉	--	--	+	+

* Inhibarea creșterii bacteriei test.

În Tabelul 4 sunt specificate tulpinile de micromicete care prezintă activitate antibiotică față de bacteriile test utilizate. Din cele 31 tulpini de micromicete izolate (100%), 12 tulpini (38,7%) prezintă activitate antibiotică: 9 tulpini (29,03%) sunt active față de *S. aureus*, 7 tulpini (22,58%) sunt active față de *B. subtilis*, iar 4 tulpini (12,9%) sunt active atât față de *S. aureus* cât și față de *B. subtilis*. Nici o tulpină nu este activă față de *E. coli* și *Ps. aeruginosa*. Se poate concluziona că tulpinile care prezintă activitate antibiotică față de *S. aureus* și *B. subtilis* sintetizează fie un singur antibiotic activ față de aceste bacterii, fie două antibiotice diferite care acționează separat asupra celor două bacterii test.

Pe baza observațiilor efectuate în laborator și a datelor existente în literatura de specialitate [8], tulpinile T₉, T₂₂ și T₂₃ au fost

Tabel 4

Activitatea antibiotică a tulpinilor de micromicete

Tulpina	Bacteria test			
	S. aureus	E. coli	B. subtilis	Ps. aeruginosa
T ₄	++*	--	--	--
T ₅	--	--	+	--
T ₁₀	++	--	+	--
T ₁₂	++	--	--	--
T ₁₆	+	--	+	--
T ₁₉	+	--	--	--
T ₂₃	--	--	+++	--
T ₂₃	+++	--	+++	--
T ₂₄	+	--	+	--
T ₂₇	--	--	++	--
T ₂₈	+	--	+	--
T ₃₁	+++	--	+++	--

* Inhibarea creșterii bacteriei test.

identificate ca aparținând genului *Penicillium*, iar tulpina T₁₆ genului *Trichoderma*.

În Fig. 1 sunt prezentate zonele de inhibiție (mm) ale tulpinilor de micromicete active față de *S. aureus*. Se poate observa că activitatea antibiotică față de *S. aureus* este relativ uniformă, valorile fiind situate în jur de 10—12 mm. Cea mai activă tulpină este T₃₁ (19,8 mm),

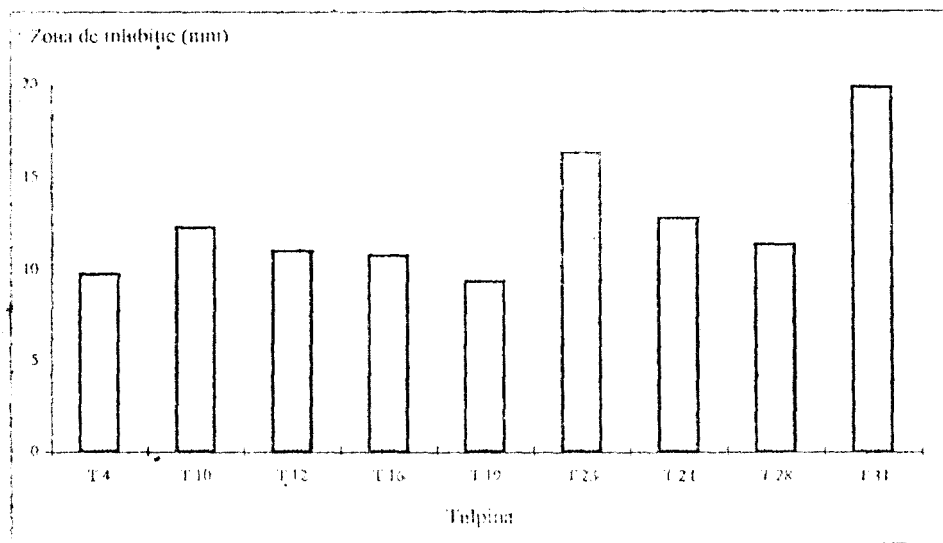


Fig. 1. Activitatea antibiotică a tulpinilor de micromicete față de *S. aureus*.

urmată de T_{23} (16,25 mm) și T_{24} (14,5 mm). Cea mai slabă activitate o are tulpina T_{19} (9,35 mm), însă nici această valoare nu este prea îndepărtată de valoarea medie (12,58 mm).

În Fig. 2 sunt prezentate zonele de inhibiție (mm) ale tulpinilor de micromicete active față de *B. subtilis*. Se constată că tulpina T_{22} este cea mai activă (20,1 mm), urmată de tulpina T_{31} (18,77 mm). Celelalte tulpini au diametrele zonelor de inhibiție în jurul valorii medii (15,9 mm), cu excepția tulpinii T_{10} care prezintă o zonă de inhibiție doar de 7,5 mm. Din Tabelul 4 și Fig. 1 și 2 se poate observa că tulpinile T_{10} , T_{16} , T_{23} și T_{31} sunt active atât față de *S. aureus*, cât și față de *B. subtilis*, cea mai activă fiind tulpina T_{31} .

Concluzii. 1. Din 8 probe de sol s-au izolat 28 tulpini de actinomicete, iar din 3 probe de sol și o probă de compost s-au izolat 31 tulpini de micromicete. Solurile nisipoase din Delta Dunării sunt bogate în actinomicete.

2. Din totalul de 28 tulpini de actinomicete izolate, 12 tulpini au activitate antibiotică față de una sau două din cele 4 bacterii test utilizate (*S. aureus*, *E. coli*, *B. subtilis* și *Ps. aeruginosa*). Prezintă importanță mai ales tulpina A_2 activă față de *Ps. aeruginosa* și tulpina G_9 activă față de *B. subtilis* și *Ps. aeruginosa*.

3. Din totalul de 31 tulpini de micromicete izolate, 12 tulpini prezintă activitate antibiotică: 9 tulpini față de *S. aureus*, 7 tulpini față de *B. subtilis*, iar 4 tulpini sunt active atât față de *S. aureus* cât și față de *B. subtilis*. Nici o tulpină nu a manifestat activitate antibiotică față de bacteriile test Gram-negative *E. coli* și *Ps. aeruginosa*.

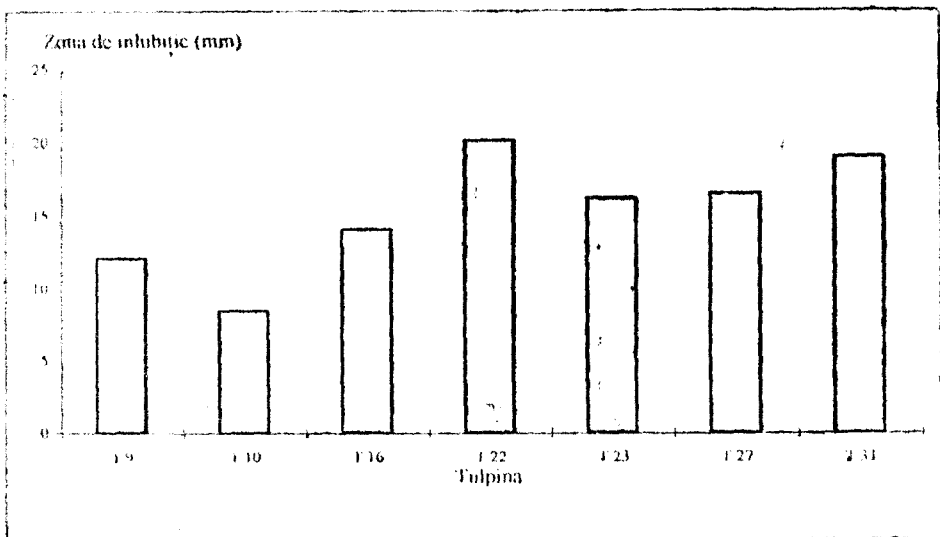


Fig. 2. Activitatea antibiotică a tulpinilor de micromicete față de *B. subtilis*.

BIBLIOGRAFIE

1. Aaronson, S., *Experimental Microbial Ecology*, p. 135—146, Acad. Press, New York, 1970.
2. Bolton, B., Breton, A., Fevre, M., Guy, P., Larpent, I. P., Veau, P., *Moississures utiles et nuisibles. Importance industrielle*, p. 298, Masson, Paris, 1985.
3. Brian, P. W., *The ecological significance of antibiotics production*, „Symp. Soc. Gen. Microbiol.”, 7, 1957, 168—187 (cit. in [9]).
4. Drăgan-Bularda, M., *Lucrări practice de microbiologie generală*, p. 60—63, 103—104, Univ. Babeş-Bolyai, Cluj-Napoca, 1983.
5. Drăgan-Bularda, M., Kiss, S., *Microbiologia solului*, p. 177, Univ. Babeş-Bolyai, Cluj-Napoca, 1986.
6. Embley, T. M., Stackebrandt, E., *Molecular phylogeny and systematics of the actinomycetes*, „Annu. Rev. Microbiol.”, 48, 1994, 257—289.
7. Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Stanley, J. T., Williams, S. T., *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, p. 668, Williams and Wilkins, Baltimore, 1994.
8. Samson, R. A., Van Reenen-Hoeckstra, E. S., *Introduction to Food-Borne Fungi*, Inst. Royal Nederlands Acad. Arts Sci., Delft, 1988.
9. Zarnea, G., *Tratat de Microbiologie generală*, Vol. 5, p. 270—274. Ed. Acad., Bucureşti, 1994.

CAPACITĂȚI ALCOOLOGENE ȘI DE MULTIPLICARE ALE UNOR
TULPINI DE DROJDII INDUSTRIALE

LETIȚIA OPREAN*

SUMMARY. — **Alcohologenic and Multiplication Capacities of Some Industrial Yeast Strains.** Eleven industrial yeast strains belonging to the genus *Saccharomyces* were studied. Six of them are brewer's yeast strains (*S. uvarum* A, B, 66, T₁₅, Tanc₁₁ and 15), two are baker's yeast strains (*S. cerevisiae* CA and CP), one is a spirit yeast strain (*S. cerevisiae* CF) and two are wine yeasts (*S. oviformis* and *S. ellipsoideus*). Their alcohologenic and multiplication capacities were determined by using standard methods.

High alcohologenic capacity was exhibited by *S. uvarum* A, *S. cerevisiae* CF, *S. ellipsoideus* and *S. oviformis*, and high multiplication (biomass-forming) capacity was found with *S. uvarum* Tanc₁₁, *S. cerevisiae* CF, *S. cerevisiae* CP and *S. uvarum* 15.

Capacitățile alcoologene și de multiplicare sunt însușiri importante ale drojdiilor utilizate în diferite ramuri industriale. Aceste capacități sunt strâns legate de intensitatea metabolismului și de starea fiziologică a celulelor de drojdii, și sunt influențate de o serie de factori fizici și chimici: temperatura și pH-ul mediului, cantitatea de O₂, CO₂, alcool etilic, substanțe inhibitoare etc. (de ex. [1—7, 9, 10]).

În lucrarea de față descriem cercetări comparative privind capacitățile alcoologene și de multiplicare (formare de biomasă) ale unor tulpini de drojdii industriale aparținătoare genului *Saccharomyces*.

Materiale și metode. Am studiat 11 tulpini de drojdii industriale, dintre care 6 sunt tulpini de drojdii de bere provenite de la fabricile de bere din țară, iar 5 tulpini de drojdii (două de panificație, una de spirt și două de vin) au fost obținute sub formă de culturi pure în cadrul Laboratorului de microbiologie al Catedrei de tehnologia produselor alimentare, Universitatea Lucian Blaga, Sibiu. Cele 6 tulpini de drojdii de bere (*S. uvarum*) sunt notate prin A, B, 66, T₁₅, Tanc₁₁ și 15. Cele două tulpini de drojdii de panificație aparțin speciei *S. cerevisiae* și sunt notate prin CA și CP. Drojdia de spirt aparține tot speciei *S. cerevisiae*; notarea tulpinii: CF. Cele două tulpini de drojdii de vin sunt tulpini de *S. oviformis*, respectiv *S. ellipsoideus*.

Pentru cultivarea tulpinilor de drojdii a servit, drept mediu nutritiv, mustul de bere industrial preparat din malt, sterilizat în prealabil, neameiat și cu un extract real de 13,31%. Mustul de bere a fost distribuit în cantități de 200 ml în baloane cu fund plat de 250 ml, sterilizate și închise cu ventile de fermentație cu acid sulfuric concentrat. Pentru inocularea mustului de bere, din culturile stoc s-au preparat culturi tot pe mustul de bere sterilizat. Fermentația mustului de bere a fost condusă la temperatura camerei (20°C) timp de 9 zile (192 ore).

În cursul fermentației am urmărit dinamica formării alcoolului etilic în mustul de bere, prin determinarea zilnică a concentrației alcoolice a mustului, exprimată în ‰ masice (g alcool etilic/100 g must), și dinamica formării biomaselor de drojdii în mustul de bere, prin determinarea zilnică a cantității de biomasă

* Universitatea Lucian Blaga, Catedra de tehnologia produselor alimentare, 2400 Sibiu, România

acumulată, exprimată în % masice (g biomasă/100 g must). În acest scop, am determinat zilnic, cu metodele de analiză curente, în conformitate cu STAS-ul în vigoare [8], concentrația alcoolică și cantitatea de biomasă de drojdie acumulată în mustul de bere în fermentație.

Pentru determinarea concentrației alcoolice a mustului de bere în fermentație, se folosește o probă decarbonată reprezentată de filtratul obținut în urma centrifugării mustului în fermentație, în cantitate de 100 g. Cu ajutorul aparatului de distilare se efectuează distilarea probei de analizat (filtrat obținut în urma centrifugării mustului de bere în fermentație). Se determină cifra de apă a picnometrului, după care picnometrul este folosit pentru determinarea densității relative a distilatului obținut. În final, se stabilește concentrația alcoolică a distilatului, respectiv a mustului de bere în fermentație, exprimată în % masice, cu ajutorul unor tabele [4, 9].

Cantitatea de biomasă de drojdie acumulată în mustul de bere în fermentație se determină prin cântărirea zilnică a probelor, înainte și după centrifugarea lor.

Rezultate. Rezultatele obținute în studierea dinamicii formării alcoolului etilic în mustul de bere sunt trecute în Tabelul 1. Capacitatea alcooligenă — după cum se poate constata din acest tabel — a variat atât între tulpini utilizate într-un anumit domeniu industrial, cât și între tulpini cu utilizări diferite. La toate tulpinile de drojdie, alcoolul etilic s-a putut evidenția după 24 ore de fermentație, cantitatea acestuia crescând mai ales între 48 și 144 ore de fermentație. După 24 ore de fermentație, tulpinile de drojdie au produs cantități în general apropiate de alcool etilic, excepție făcând drojdia de bere *S. uvarum* T₁₈ și drojdia de spirt *S. cerevisiae* CF, care au produs în primele 24 ore o cantitate mai mare de alcool etilic, ce a crescut treptat între 48 și 144 ore de fermentație, după care s-au obținut cantități mai mici de alcool etilic, apropiate ca valoare.

La sfârșitul fermentației mustului de bere, cea mai bună capacitate alcooligenă a fost manifestată de drojdia de bere *S. uvarum* A, con-

Tabel 1

Dinamica formării alcoolului etilic în mustul de bere sub acțiunea celor 11 tulpini de drojdie industriale studiate

Tulpini de drojdie (<i>Saccharomyces</i>)	Cantitatea alcoolului etilic format (% masice)							
	Durata de fermentație (ore)							
	24	48	72	96	120	144	168	192
<i>S. uvarum</i> A (bere)	0,565	1,235	2,280	3,090	3,205	3,490	3,910	4,380
<i>S. uvarum</i> B (bere)	0,425	1,675	1,950	2,170	2,460	2,550	2,675	2,775
<i>S. uvarum</i> 66 (bere)	0,540	1,805	2,505	2,660	2,710	2,860	2,980	3,030
<i>S. uvarum</i> T ₁₈ (bere)	1,280	2,450	2,600	2,760	2,775	2,785	2,975	3,040
<i>S. uvarum</i> Tanc ₁₁ (bere)	0,335	1,235	1,840	2,005	2,105	2,200	2,225	2,335
<i>S. uvarum</i> 15 (bere)	0,380	1,455	1,840	1,885	2,060	2,090	2,120	2,225
<i>S. cerevisiae</i> CA (panificație)	1,005	2,060	2,120	2,450	2,720	2,910	3,090	3,090
<i>S. cerevisiae</i> CP (panificație)	0,805	1,345	2,120	2,390	2,675	2,880	2,930	3,010
<i>S. cerevisiae</i> CF (spirt)	1,015	2,620	3,030	3,150	3,255	3,265	3,370	3,690
<i>S. oviformis</i> (vin)	0,700	1,620	1,835	2,120	2,910	3,310	3,320	3,520
<i>S. ellipsoideus</i> (vin)	0,885	1,510	1,580	2,060	2,790	3,100	3,405	3,580

concentrația alcoolică fiind cu 96,8% mai mare decât la *S. uvarum* 15, drojdia cu cea mai redusă capacitate alcooligenă dintre tulpinile studiate. De menționat este că drojdia de bere *S. uvarum* A provine din aceeași fabrică de bere din care a fost procurat mustul de bere. Această tulpină este urmată de drojdia de spirt *S. cerevisiae* CF, la care concentrația alcoolică a fost cu 65,8% mai mare decât la drojdia de bere *S. uvarum* 15. Se remarcă și drojdiile de vin *S. ellipsoideus* și *S. oviformis*, prezentând în ordinea enumerată o concentrația alcoolică cu 60,9% și respectiv 58,2% mai mare decât cea obținută cu drojdia de bere *S. uvarum* 15.

Rezultatele obținute în studierea dinamicii formării de biomasă de drojdie în mustul de bere sunt redată în Tabelul 2. Se poate vedea din acest tabel că în primele 24 ore de fermentație biomasă de drojdie a crescut la fiecare tulpină, ceea ce dovedește că în această etapă a avut loc o multiplicare foarte activă a drojdiilor. Valoarea maximă de biomasă acumulată în această etapă a fost înregistrată la drojdia de panificație *S. cerevisiae* CP. Această valoare este cu 78,1% mai mare decât cea obținută la drojdie de bere *S. uvarum* B, caracterizată prin cea mai mică biomasă formată.

La sfârșitul fermentației, tulpinile de drojdii studiate se pot diferenția în funcție de capacitatea lor de multiplicare. Cantitatea maximă de biomasă s-a format la drojdia de bere *S. uvarum* Tanc₁₁, fiind cu 34,7% mai mare decât a drojdiei de bere *S. uvarum* B care se diferențiază de celelalte tulpini prin valoarea cea mai mică a biomasei formate. Cantitatea de biomasă a fost ridicată și la drojdia de spirt *S. cerevisiae* CF, biomasă acestea fiind cu 33,3% mai mare decât a drojdiei de bere *S. uvarum* B. S-au remarcat și drojdia de panificație *S. cerevisiae* CP și

Tabel 2

Dinamica formării biomasei de drojdie în mustul de bere sub acțiunea celor 11 tulpini de drojdii industriale studiate

Tulpini de drojdii (Saccharomyces)	Cantitatea biomasei de drojdie (% masice)							
	Durata de fermentație (ore)							
	24	48	72	96	120	144	168	192
<i>S. uvarum</i> A (bere)	2,35	2,75	3,15	3,60	4,00	4,20	4,30	4,30
<i>S. uvarum</i> B (bere)	1,60	2,90	3,15	3,40	3,45	3,45	3,50	3,60
<i>S. uvarum</i> 66 (bere)	2,45	2,85	3,15	3,20	3,20	3,30	3,35	3,85
<i>S. uvarum</i> T ₁₈ (bere)	1,90	2,65	2,95	3,30	3,50	3,55	3,80	4,00
<i>S. uvarum</i> Tanc ₁₁ (bere)	1,90	2,25	2,50	3,40	3,50	3,70	4,10	4,85
<i>S. uvarum</i> 15 (bere)	2,10	2,40	2,65	3,20	3,35	3,40	3,55	4,40
<i>S. cerevisiae</i> CA (panificație)	2,10	2,65	2,85	2,95	3,20	3,30	3,40	3,80
<i>S. cerevisiae</i> CP (panificație)	2,85	3,70	4,00	4,10	4,15	4,20	3,35	4,40
<i>S. cerevisiae</i> CF (spirt)	1,90	2,40	3,00	3,40	4,20	4,60	4,75	4,80
<i>S. oviformis</i> (vin)	2,40	2,75	2,85	3,10	3,35	3,70	3,75	3,80
<i>S. ellipsoideus</i> (vin)	2,55	2,75	2,95	3,20	3,60	3,80	3,85	3,90

drojdia de bere *S. uvarum* 15, a căror cantitate de biomasă a fost cu 22,20% mai mare decât a drojdiei de bere *S. uvarum* B.

Concluzii. 1. Capacitățile alcoologene și de multiplicare ale celor 11 tulpini de drojdii industriale studiate sunt variate atât între tulpini utilizate într-un anumit domeniu industrial, cât și între tulpini cu utilizări diferite.

2. La toate tulpinile de drojdii studiate, alcoolul etilic începe să se formeze în cursul primelor 24 ore de fermentație, după care cantitatea acestuia crește mai ales între 48 și 144 ore, iar spre sfârșitul fermentației are loc o încetinire a creșterii cantității de alcool etilic.

3. Capacități alcoologene ridicate sunt manifestate de drojdia de bere *S. uvarum* A, drojdia de spirt *S. cerevisiae* CF și drojdiile de vin *S. ellipsoideus* și *S. oviformis*.

4. Multiplicarea foarte activă a tulpinilor de drojdii studiate are loc în primele 24 ore de fermentație, etapă în care se constată o creștere mai accentuată a biomaselor de drojdii. Spre sfârșitul fermentației, cantitatea de biomasă este aproximativ constantă, ceea ce demonstrează că este încetinită capacitatea de multiplicare a drojdiilor.

5. Se remarcă prin cantități ridicate de biomasă drojdia de bere *S. uvarum* Tanc₁₁, drojdia de spirt *S. cerevisiae* CF, drojdia de panificație *S. cerevisiae* CP și drojdia de bere *S. uvarum* 15.

BIBLIOGRAFIE

1. Anghel, I., Herlea, V., Voica, C., Cojocaru, I., *Biologia și tehnologia drojdiilor*, Vol. II, p. 20—65, Ed. Tehn., București, 1987.
2. Berzescu, P., Dumitrescu, M., Hopulele, T., Katherin, I., Stoicescu, A., *Tehnologia berii și a malțului*, p. 161—239, Ed. Ceres, București, 1981.
3. Bulton, C. A., *Physiological conditions of yeast and achievements in fermentation*, „Bios”, No. 4, 1991, 60—75.
4. Hopulele, T., *Tehnologia fabricării malțului și berii*, p. 89—100, Univ., Galați, 1980.
5. Hough, J. S., Briggs, D. E., Stevens, R., Young, T. W., *Brewery Fermentation, Malting and Brewing Science*, Vol. II, p. 236—320, Chapman and Hall, London, 1990.
6. Quain, D. E., Duffield, M. L., *Metabolical function for alcohol production with yeast*, „Bios”, No. 5, 1985, 6—10.
7. Rose, A. H., Harrison, J. S., *The Yeasts*, Vol. III, p. 224—242, Acad. Press, London, 1989.
8. *Standard de Stat*, Oficiul de Stat pentru Standarde (București), 1981, 146—159.
9. Stoicescu, A., Hopulele, T., *Indrumar de laborator pentru industria fermentativă*, p. 114—132, Univ. Galați, 1982.
10. Zarnea, G., *Tratat de Microbiologie generală*, Vol. II, p. 390—423, Ed. Acad. Rom., București, 1984.

REDUCEREA MICROBIANĂ A CROMULUI HEXAVALENT ÎN NAMOLUL ACTIVAT

VIORICA COȘIER* și MITZURA DIȚĂ**

SUMMARY. — **Microbial Reduction of Hexavalent Chromium in Activated Sludge.** Three methods for reduction of the very toxic Cr(VI) to the less toxic Cr(III) were compared. It has been found that the *chemical* method using ferrous sulphate for reduction of Cr(VI) is less efficient and more expensive than the *microbial* method in which microorganisms in the activated sludge are the Cr(VI)-reducers. The third, *thermal* method has — in comparison to the chemical and microbial methods — the disadvantage of being much more energy-consuming and, thus, much more expensive, and the advantage of producing the least amount of final residues. In conclusion, the microbial method is preferentially recommended for reduction of Cr(VI) to Cr(III) and, consequently, for its removal from industrial waste waters.

Cromul este un metal larg utilizat în procesul de producție în argășitorii și în alte ramuri industriale. Nămolurile rezultate în urma purificării cel puțin parțiale a apelor reziduale din aceste industrii se formează în cantități ridicate (de ex., 437 t/an la întreprinderea S. C. Ciujana S.A.) și, în consecință, ridică probleme grave de poluare a apei freatică, a solului și sedimentelor, a florei și faunei acvatice și terestre.

Cromul din sedimente este asociat materiei organice aproape în totalitate, fiind prezent în cantități mult mai mici legat de oxizi și hidroxizi. Frațiunea de materie organică, de care se leagă cromul, este reprezentată de celulele bacteriene și materialul polizaharidic extracelular al acestora care asigură grupări de legătură ionilor de crom. În stare legată de biota, pătrunderea cromului în lanțul trofic este favorizată [1, 6].

Cromul sub forma sa chimică de Cr(VI) este foarte solubil, toxic, mutagen și cancerigen. În același timp, Cr(III) formează oxizi și hidroxizi insolubili și este mai puțin toxic [12, 13]. Reducerea Cr(VI) la Cr(III) înseamnă reducerea efectului mutagen și cancerigen de 1000 de ori [15].

Problema reducerii Cr(VI) la Cr(III) prin metode tradiționale (reducere chimică, tratare termică, tratare electrochimică, sisteme cu schimbători de ioni, recuperare prin evaporare sau centrifugare) a fost îndelung discutată din cauza eficienței lor scăzute la valori ale Cr(VI) cuprinse între 10 și 100 g/m³ și a costului ridicat.

* Agenția de Protecția Mediului, Str. Dorobanților 90, 3400 Cluj-Napoca, România

** Institutul de Chimie „Raluca Ripan”, 3400 Cluj-Napoca, România

Numeroase microorganisme pot reduce Cr(VI) la Cr(III) pe cale enzimatică. Unele dintre ele manifestă această capacitate a) atât în condiții anaerobe cât și aerobe, iar altele b) numai în condiții anaerobe sau c) numai în condiții aerobe. Majoritatea lor sunt bacterii Gram-negative (vezi lucrarea de sinteză a lui Lovley [7]). Reducerea microbiană a Cr(VI) prezintă mult interes pentru epurarea apelor reziduale industriale [8, 11].

În reducerea microbiană a Cr(VI) la Cr(III) pot servi ca donatori de electroni substanțe exogene (compuși organici: glucoză, acetat, aminoacizi etc. sau H_2) sau substanțe endogene [7, 9]. Bacteriile reducătoare de Cr(VI) pot fi rezistente sau sensibile față de Cr. Astfel, Horitsu și colab. [4] au constatat că mutantele de *Pseudomonas ambigua* sensibile la cromat au redus Cr(VI) mult mai lent decât tipul sălbatic rezistent la cromat. Losi și Frankenberg [5] au testat toleranța la Cr(VI) a bacteriilor izolate din nămoluri poluate cu Cr, observând că aceste bacterii au fost mult mai rezistente la Cr(VI) decât bacteriile izolate dintr-un loc adiacent nepoluat cu Cr; izolatele din nămoluri au tolerat cantități mari, de 500—1000 mg Cr/l. În schimb, studiile efectuate de Bopp și Ehrlich [2] au indicat că tulpinile de *Pseudomonas fluorescens* rezistente și cele sensibile la cromat au capacități similare de a reduce Cr(VI). După Summers și Jacoby [14], în *Pseudomonas aeruginosa* rezistența la compușii cu crom (și la cei cu bor) este determinată plasmidial.

Lucrarea de față analizează comparativ eficiența reducerii chimice, microbiene și termice a Cr(VI).

1. S-a studiat eficiența reducerii chimice a Cr(VI) prin determinarea concentrației de Cr total în apele reziduale tratate, la evacuarea lor din stația de tratare a apelor cromice de la întreprinderea S. C. Clujana S.A., pe o perioadă de 15 luni (Fig. 1).

2. În paralel, s-a urmărit reținerea Cr(III) în nămolul activat din stația de epurare a municipiului Cluj-Napoca. Această stație este o stație biologică, la care Cr(VI) este redus numai pe cale microbiană, deoarece la apele influente nu se adaugă substanțe chimice reducătoare. S-a determinat concentrația Cr(III) influent și a Cr(III) efluent. Diferența dintre aceste două valori de Cr(III) reprezintă Cr(III) reținut în nămol și exprimă eficiența epurării biologice (Fig. 2).

Într-un experiment de laborator, am modelat reducerea microbiană a Cr(VI), folosind nămolul activat drept inocul pe un mediu de cultură cu adaos de cromat. S-a determinat cantitatea de cromat redusă de către microorganisme și s-a exprimat procentual eficiența reducerii microbiene a cromatului.

3. Pentru comparare, s-a luat în studiu și metoda de reducere termică a Cr(VI).

Material și metode. 1. *Reducerea chimică.* Pentru reducerea Cr(VI) din apele reziduale de la S.C. Clujana S.A. se folosește sulfatul ferros. Din procesul de neutralizare a apelor cromice cu oxid de calciu și de reducere a Cr(VI) cu

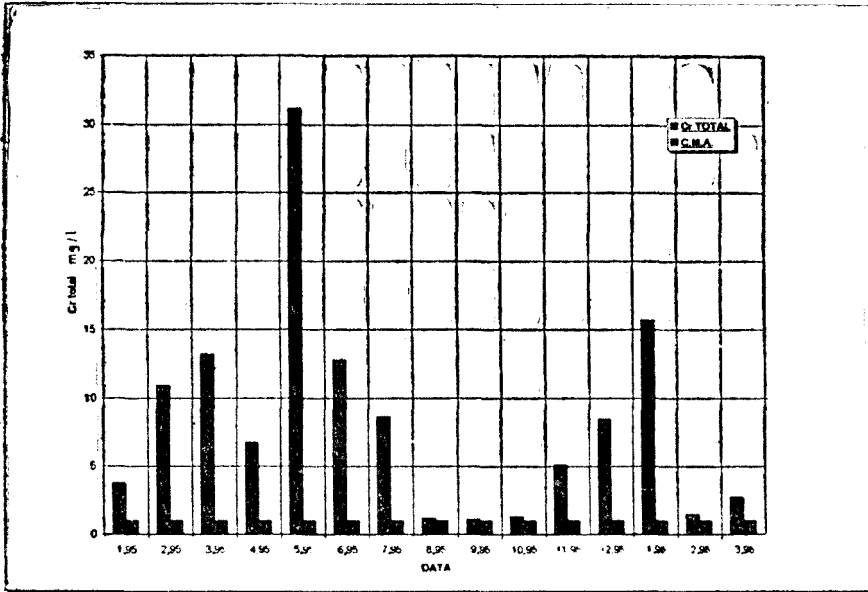


Fig. 1. Evoluția valorilor lunare medii ale cromului total în apele reziduale industriale de la S.C. Clujana S.A., în perioada ianuarie 1995–martie 1996.
C.M.A. — Concentrația maximă admisă de standard (1 mg Cr/l).

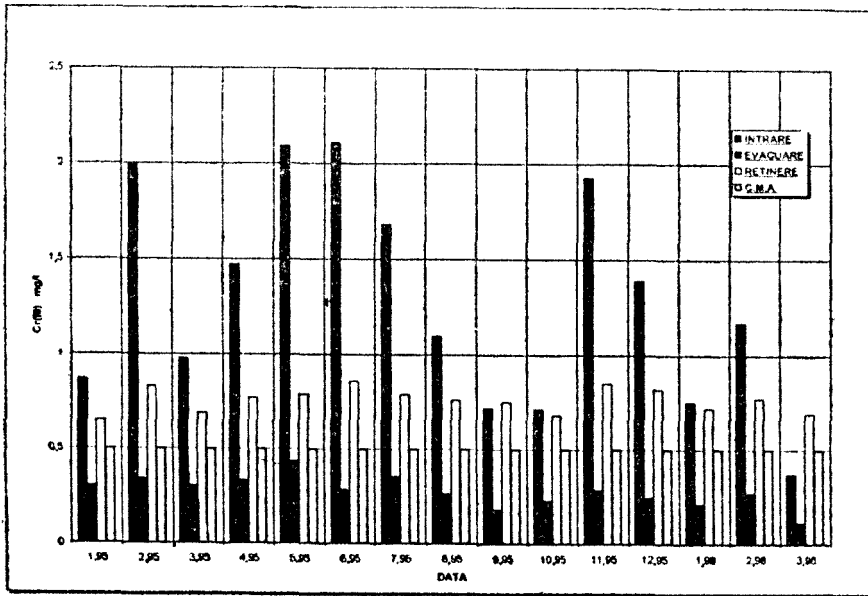


Fig. 2. Evoluția valorilor lunare medii ale cromului trivalent în apele reziduale din stația de epurare a municipiului Cluj-Napoca, în perioada ianuarie 1995–martie 1996.
C.M.A. — Concentrația maximă admisă de standard (0,5 mg Cr/l).

sulfat feros rezultă depuneri sub formă de nămoluri care conțin o cantitate mare de apă și Cr(III).

Pentru determinarea concentrației de Cr(III) și Cr(VI) în probele de ape reziduale industriale conținând peste 100 mg ioni de fier/l și substanțe organice, se procedează, întâi, la îndepărtarea acestora cu acid fosforic și, respectiv, prin mineralizare. Mineralizarea se realizează prin următoarele operații: tratare cu acid sulfuric în prezența unui indicator (metiloranj), concentrarea soluției pe baia de apă, răcire și oxidare cu apă oxigenată. Pentru îndepărtarea acidului sulfuric, se adaugă, la fierbere, în proporție de 1:1, acid azotic și se continuă fierberea până la apariția vaporilor de anhidridă sulfurică. După răcire, proba se diluează cu apă bidistilată în scopul dizolvării sărurilor greu solubile și, dacă este cazul, se filtrează. Din probele de ape reziduate astfel tratate se măsoară cwantioane de volum constant care sunt supuse analizei chimice.

Determinarea cromului prin metoda fotocolorimetrică constă în oxidarea Cr(III) la Cr(VI) și tratarea cu 1,5-difenilcarbazidă în mediu acid (H_2SO_4), formându-se un complex de culoare roz-violetă, a cărui intensitate este proporțională cu concentrația cromului. După etalonare, se citește extincția (la 545 nm) în compensație față de proba maror, apoi se raportează la curba de etalonare. Măsurătorile au fost efectuate pe un fotocolorimetru model FEK-M (1963). Metoda fotocolorimetrică aplicată are o sensibilitate scăzută, însă nu necesită reactivi deosebiți și are o exactitate comparabilă cu cea a unei bune metode gravimetrice.

Concentrația de Cr(III) se stabilește prin calcul, făcându-se diferența dintre concentrația de Cr total și cea de Cr(VI).

Reamintim că pentru analize apele reziduale de la S.C. Clujana S.A. au fost colectate la evacuarea lor din stația de tratare, iar probele au fost analizate pentru Cr total.

2. *Reducerea microbiană.* În stația de epurare a municipiului, apele brute, amestecate cu nămolul activ recirculant, cedază o parte din conținutul lor în Cr(VI) particulelor de nămol (Cr(VI) fiind reținut de bacterii și de polizaharidele lor extracelulare). Cr(VI) nereținut ca și cel reținut este redus pe cale microbiană în aerotanc.

Reamintim că s-a determinat concentrația Cr(III) influent (la intrarea apelor în aerotanc) și a Cr(III) efluent (la evacuarea apelor în emisar), diferența reprezentând Cr(III) reținut în nămol și exprimând eficiența epurării biologice.

În experimentul de laborator, drept mediu de cultură a servit mediul KSC [9—11], având următoarea compoziție (în g/l apă distilată): NH_4Cl 0,03, K_2HPO_4 0,05, KH_2PO_4 0,05, $NaCl$ 0,01, CH_3COONa 2, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,01, $CaCO_3$ 0,005, $FeCl_2 \cdot 7H_2O$ 0,005 și glucoză 0,2. Mediul a fost sterilizat prin autoclavare ($120^\circ C/30$ minute). Este de menționat că suspensia apoasă de $CaCO_3$ și soluțiile de $FeCl_2 \cdot 7H_2O$ și glucoză au fost sterilizate separat și adăugate, după răcire, la restul mediului. pH-ul mediului a fost de 7. Mediul a fost inoculat cu nămol activat proaspăt colectat (9 ml mediu + 10 ml nămol), apoi supus incubării în condiții anaerobe la $30^\circ C$, timp de 10 zile. Cultura microbiană obținută a fost folosită pentru inocularea mediului, la care în prealabil s-a adăugat cromat (2 sau 4 mg de K_2CrO_4/l mediu). Raportul dintre mediul cu Cr și cultura microbiană a fost de 9 ml la 1 ml. Incubarea s-a efectuat, și în acest caz, la $30^\circ C$. În cursul incubării, s-a putut observa schimbarea culorii galbene a mediului în alb opalescent, ceea ce indică reducerea cromatului. La 4, 6, 10 și 12 ore de la începerea incubării, s-a extras câte 1 ml din cultură în vederea determinării concentrației Cr(VI) redus pe cale microbiană. Cromul a fost determinat după reoxidarea cantitativă a Cr(III) la Cr(VI) și colorare cu 1,5-difenilcarbazidă în mediu acid (H_2SO_4). Intensitatea colorației a fost citită pe un spectrofotometru, la 540 nm.

3. *Reducerea termică.* În urma studierii datelor existente în literatură [3] despre reacțiile care au loc în faza solidă s-a constatat că creșterea temperaturii are o mare influență asupra formării cromiților anorganici. Reacția care are loc poate fi scrisă astfel: $2 K_2Cr_2O_7 + 2 MCl_2 = 4 KCl + 2 MCr_2O_4 + 3 O_2$. Această reacție a fost stabilită în urma studiilor efectuate pe amestecuri stoichiometrice (unde

M = Fe, Zn, Mg, Ni, Co, Ca), care au fost supuse apoi analizei termogravimetrice și termodiferențiale. Încălzirea a fost efectuată liniar cu o rată de 300°C pe oră până la 1000—1050°C.

S-a constatat că amestecurile de cromiți anorganici formați conform reacției de mai sus se descompun, în funcție de temperatură, după cum urmează: la 330°C începe descompunerea Cr(VI) la Cr(III); în jurul temperaturii de 400°C se formează, după presupuneri, $H_2Cr_2O_4$ ($Cr_2O_3 \cdot H_2O$); între 400 și 700°C $H_2Cr_2O_4$ pierde apa de constituție; la temperaturi mai mari de 700°C cristalizează Cr_2O_3 . Pierderile în greutate au fost stabilite luându-se în considerație rezidul format în urma tratamentului termic, în funcție de metalul M și au valori cuprinse între 82,3% (Zn) și 34,7% (Ca).

În acest sens au fost analizate în laborator amestecuri de $K_2Cr_2O_7 + CrCl_3$ în diferite raporturi. S-a stabilit că descompunerea termică se desfășoară după aceeași reguli ca în studiul teoretic [3] și că, pentru formula acidului presupus apărut la ~ 400°C, este mai adecvată expresia $Cr_2(Cr_2O_4)_n$, cu alte cuvinte: $4Cr_2O_3$.

Rezultatele au fost confirmate și de analiza de difracție de raze X efectuată cu un difractometru Philips PW 1500. Măsurătorile au fost făcute pe probe calcinate la 400°C și, respectiv, la 700°C, timp de două ore, iar valorile distanțelor interplanare au fost calculate considerându-se $1(CoK\alpha_1, \lambda) = 1,7865$ (Fig. 3). Acestea au arătat, la proba calcinată la 400°C, existența unei forme amorfe cu slabe încercări de cristalizare în sensul formării oxidului de Cr(III) hidratat presupus, iar la proba calcinată la 700°C, liniile obținute sunt corespunzătoare structurii acestui oxid.

În urma studiilor teoretice s-a stabilit că este posibilă reducerea totală a Cr(VI) la Cr(III) prin tratamente termice la temperaturi mai mari de 400°C.

În sensul celor de mai sus au fost studiate probe de nămol industrial de la S.C. Clujana S.A. și de nămol activat de la stația de epurare a municipiului Cluj-Napoca. Probele de nămol au fost prelucrate, îndepărtându-se fierul și substanțele organice, care ar putea interfera cu cromul, prin tratare cu acid fosforic și, respectiv, prin mineralizare. Probele astfel tratate s-au uscat în etuvă la 100°C, după care s-au omogenizat prin mojarare și s-au supus analizei termogravimetrice și termodiferențiale (Fig. 4).

Rezultate. 1. Reducerea chimică. Fig. 1 arată că în toate cele 15 luni monitorizate, valorile lunare medii ale Cr total în apele reziduale tratate, la evacuarea acestora din stația de tratare a apelor cromice de la S.C. Clujana S.A. depășesc C.M.A. (1 mg Cr/l), uneori chiar de peste

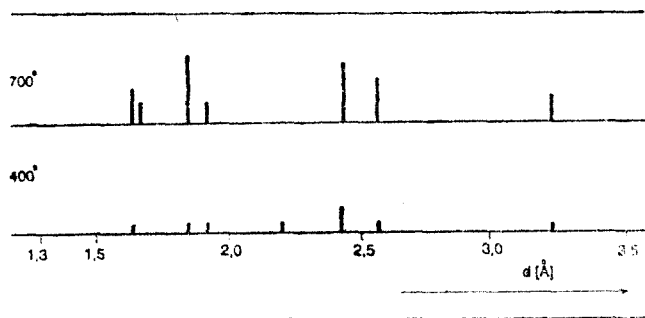


Fig. 3. Valorile distanțelor interplanare pentru Cr_2O_3 calcinat la 400°C și, respectiv, la 700°C, timp de 2 ore.

Tabel 1

**Cantitatea cromului hexavalent redus de microorganismele
nămolului activat, în cursul incubării**

K ₂ CrO ₄ adăugat (mg/l)	Durata de incu- bare (ore)	K ₂ CrO ₄ redus	
		(mg/l)	(%)
2	4	0,43	21
2	6	0,82	41
2	10	1,30	65
2	12	1,62	81
4	4	0,88	22
4	6	1,56	39
4	10	2,13	53
4	12	1,30	77

30 de ori, ceea ce înseamnă că metoda de reducere chimică cu sulfat feros, aplicată la această stație, a fost ineficientă.

2. *Reducerea microbiană.* Rezultatele obținute în determinarea Cr (III) în apele intrate și evacuate ale stației de epurare a municipiului Cluj-Napoca sunt prezentate în Fig. 2. Se poate constata din această figură că în toate cele 15 luni urmărite valorile lunare medii ale Cr(III) în apele evacuate nu depășesc C.M.A. (0,5 mg Cr(III)/l), ceea ce dovedește eficiența sporită a reducerii microbiene a Cr(VI) față de metoda chimică de reducere.

Cantitatea de Cr(III), obținută prin diferența Cr total-Cr(VI), stoichiometric ne arată și cantitatea de Cr(VI) influent în stația de epurare a municipiului.

Rezultatele înregistrate în experimentul de laborator, prin care am modelat reducerea microbiană a Cr(VI), sunt redată în Tabelul 1. Ele arată că reducerea Cr(VI) de către cultura microbiană, obținută în urma inoculării mediului KSC cu nămol activat, este evidentă deja după 4 ore de incubare, iar după 12 ore de incubare cantitatea inițială de 2 mg de K₂CrO₄/l s-a redus în proporție de 81 %, iar cantitatea inițială de 4 mg K₂CrO₄/l în proporție 77%. Cu alte cuvinte, și experimentul de laborator confirmă eficiența ridicată a reducerii microbiene a Cr(VI).

3. *Reducerea termică.* Analiza termogravimetrică (TG) și termodiferențială (DTA) a nămolului industrial (Fig. 4b) indică pe curba DTA că apar efecte endoterme slabe la temperaturi de 120—125°C, corelate pe curba TG din aceeași figură cu pierderea apei de cristalizare. Efectul exotermic obținut la 350°C este atribuit descompunerii oxidului CrO₃·xH₂O (x=3 sau 4). Efectul exotermic puternic observat la 410°C corelat cu pierderea în greutate calculată pe curba TG, indică reducerea Cr(VI) la Cr(III) prin formarea H₂Cr₂O₄. Această pierdere de apă de constituție (efect endotermic la 480°C) și, în jurul temperaturii de 540°C, cristalizarea Cr₂O₃ sunt procese aproape complete, pierderea în greutate între 550 și 800°C fiind nesemnificativă. Reziduul format în

urma analizei a arătat o pierdere în greutate de 61,06% (Fig. 4b), față de cea calculată teoretic de 60,7% (Fig. 4a). Deci, se confirmă prezența Cr(VI) în nămolul industrial.

Comportarea termică a nămolului activat (Fig. 4c) este, în linii generale, similară cu cea a nămolului industrial, însă fără efectul exotermic de la 350°C, ceea ce dovedește că în nămolul activat nu există Cr(VI). Mai exact, se poate spune că flora microbiană bogată din nămolul activat a redus Cr(VI) la Cr(III), iar Cr(III) în mare parte este reținut de particulele de nămol activat (de bacterii și de polizaharidele lor extracelulare).

Concluzii. 1. Reducerea chimică a Cr(VI) nu a fost eficientă în cazul apelor reziduale industriale de la S.C. Clujana S.A. Au loc depășiri ale valorilor lunare medii ale Cr total, după reducerea chimică, uneori chiar de peste 30 de ori față de C.M.A.

2. Reducerea Cr(VI) s-a dovedit a fi eficientă în prezența microorganismelor din nămolul activat. Totodată, reducerea microbiană a Cr(VI) este mai puțin costisitoare decât cea chimică; nu implică consum de reactivi reducători (sulfat feros).

Concluzii. 1. Reducerea chimică a Cr(VI) nu a fost eficientă în punctul de vedere al consumului de energie, deoarece reducerea Cr(VI)

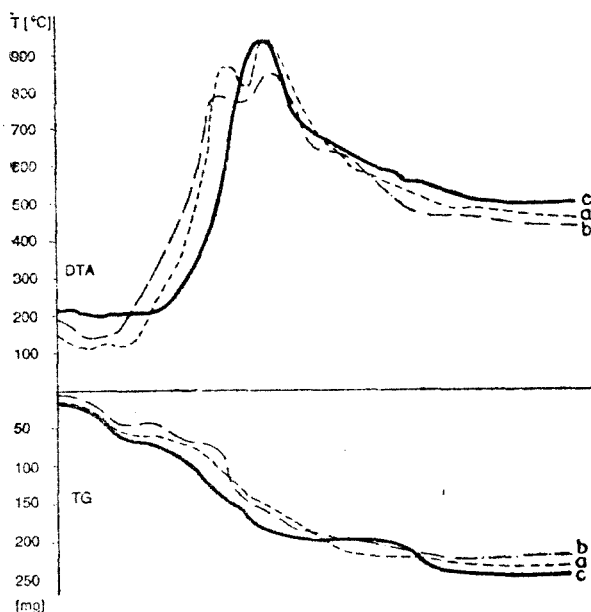


Fig. 4. Curbele de descompunere termică.

a -- Amestecul $K_2Cr_2O_7 + CrCl_3$. b -- Nămolul industrial.
c -- Nămolul activat.

la Cr(III) se realizează la temperaturi mai mari de 400°C. Această metodă ar produce, însă, cantitatea cea mai mică de deșeuri.

4. În mod preferențial se recomandă metoda microbiană pentru reducerea Cr(VI) la Cr(III) și, în consecință, pentru îndepărtarea acestui metal greu foarte toxic din apele reziduale industriale.

BIBLIOGRAFIE

1. Aislable, J., Loutit, M. W., *Accumulation of Cr(III) by bacteria isolated from polluted sediment*, „Mar. Environ. Res.”, **29**, 1986, 221—232.
2. Bopp, L. H., Ehrlich, H. I., *Chromate resistance and reduction in Pseudomonas fluorescens strain LB 300*, „Arch. Microbiol.”, **150**, 1988, 426—431.
3. Duval, C., *Inorganic Thermogravimetric Analysis*, Elsevier, Amsterdam, 1963.
4. Horitsu, H., Futo, S., Miyazawa, Y., Ogai, S., Kawai, K., *Enzymatic reduction of hexavalent chromium by hexavalent chromium tolerant Pseudomonas ambigua G-1*, „Agric. Biol. Chem.”, **51**, 1987, 2417—2420.
5. Losi, M. E., Frankenberger, W. T. jr., *Chromium-resistant microorganisms isolated from evaporation ponds of a metal processing plant*, „Water, Air Soil Pollut.”, **74**, 1994, 405—413.
6. Loutit, M. W., Aislable, J., Bremer, P., Pillidge, C., *Bacteria and chromium in marine sediments*, „Adv. Microb. Ecol.”, **10**, 1988, 415—437.
7. Lovley, D. R., *Microbial reduction of iron, manganese, and other metals*, „Adv. Agron.”, **54**, 1995, 175—231.
8. Nourbakhsh, M., Sag, Y., Özer, D., Akzu, Z., Kutsal, T., Caglar, A., *A comparative study of various biosorbents for removal of chromium (VI) ions from industrial waste waters*, „Process Biochem.”, **29**, 1994, 1—5.
9. Ohtake, H., Fujii, E., Toda, K., *A survey of effective electron donors for reduction of toxic hexavalent chromium by Enterobacter cloacae (strain HO1)*, „J. Gen. Appl. Microbiol.”, **36**, 1990, 203—208.
10. Ohtake, H., Fuji, E., Toda, K., *Bacterial reduction of hexavalent chromium: Kinetic aspects of chromate reduction by Enterobacter cloacae HO1*, „Biocatalysis”, **4**, 1990, 227—235.
11. Ohtake, H., Fujii, E., Toda, K., *Reduction of toxic chromate in an industrial effluent by use of a chromate-reducing strain of Enterobacter cloacae*, „Environ. Technol.”, **11**, 1990, 663—668.
12. Petrilli, F. L., Flora, S. D., *Toxicity and mutagenicity of hexavalent chromium on Salmonella typhimurium*, „Appl. Environ. Microbiol.”, **33**, 1977, 305—309.
13. Richard, F. C., Bourg, C. M., *Aqueous geochemistry of chromium: A review*, „Water Res.”, **25**, 1991, 807—816.
14. Summers, A. O., Jacoby, G. A., *Plasmid-determined resistance to boron and chromium compounds in Pseudomonas aeruginosa*, „Antimicrob. Agents Chemother.”, **13**, 1978, 637—640.
15. Williams, J. M., Silver, S., *Bacterial resistance and detoxification of heavy metals*, „Enzyme Microb. Technol.”, **6**, 1984, 530—537.

EFFECTS OF COMPACTION ON SOIL STRUCTURE, MICROBIAL POPULATIONS AND ENZYME ACTIVITIES

NADA MILOŠEVIĆ*, MITAR GOVEDARICA**, MIRJANA JARAK**, VLADIMIR HADŽIĆ** and MILIVOJE BELIĆ**

SUMMARY. — Two soils (humogley and chernozem) under sugar beet in the Voivodina Province, Serbia, Yugoslavia were studied. Soil compaction due to passing of heavy farm machinery caused, in the 0—10-cm layer, an approximately 2% diminution of the stability of structural aggregates in both soils. Decreases also occurred in counts of most of the microbial groups studied (aerobic heterotrophic, ammonifying and ureolytic bacteria, azotobacter, actinomyceetes) and increases in counts of denitrifying bacteria in both soils. Counts of micromycetes increased in humogley and decreased in chernozem. Each of the three enzyme activities measured (dehydrogenase, protease and urease) decreased in humogley, whereas dehydrogenase activity decreased and the other two activities increased in chernozem. All these effects of soil compaction were more pronounced in humogley (characterised by a bad water-air regime) than in chernozem.

The use of heavy farm machinery for tillage and transport in modern agricultural production causes soil compaction. The pressure of machines results in degradation of soil structure, diminution of the stability of structural aggregates, which affect negatively the water, air and temperature regime, microbial activities and, consequently, fertility of soil (e.g. [6]).

Bacteria and micromycetes play an important role in stabilisation of soil structural aggregates (for example [9, 11]). Bacteria are considered to be significant for stabilisation of smaller structural aggregates (< 500 µm), whereas micromycetes participate in stabilisation of larger aggregates (> 1 mm) [20]. The soils with higher moisture and lower organic matter contents are more exposed to compaction [8].

The objective of the investigations described in the present paper was to study the effects of soil compaction in a humogley and a chernozem under sugar beet in the Voivodina Province, Serbia, Yugoslavia on some soil properties, especially stability of structural aggregates, counts of microorganisms belonging to different groups and enzyme (dehydrogenase, protease and urease) activities in the 0—10-cm soil layer. Both bulk soil and separated structural aggregates from the 0—10-cm layer were used for determination of enzyme activities.

Materials and methods. The two soils studied, a calcareous humogley (location Donji Itebej) and a chernozem (location Donji Petrovo) under sugar beet were compacted due to passing of heavy farm machinery, their volume mass

* Institute of Field and Vegetable Crops, 21000 Novi Sad, Voivodina, Serbia, Yugoslavia

** Faculty of Agriculture, 21000 Novi Sad, Voivodina, Serbia, Yugoslavia

becoming 1.3–1.4 g/cm³. Plots not affected by compaction served for comparison. Soil was sampled for analyses from the 0–10-cm layer in June 1994.

Some physicochemical properties, determined by using methods described in [2] and presented in Table 1, show that the two soils studied have similar texture and pH, but the humogley is poorer in CaCO₃ and richer in organic C and total N contents than the chernozem. Analysis of structural aggregates was made according to the method of Savvinov as described in [21].

Microbial populations in soil were estimated by dilution plate counts. Aerobic heterotrophic bacteria growing on soil extract agar and ammonifying bacteria were counted by using techniques from [15]. Christensen's medium as slightly modified by Collins and Lyne [4] served for counting ureolytic bacteria. The count of denitrifying bacteria was estimated based on recommendations in [2]. Azotobacter was counted with the method of „fertile droplets“ [1] on Fedorov's [5] medium. Colony-forming units of actinomycetes and micromycetes were determined on Waksman-Carey and Czapek-Dox synthetic media, respectively.

Dehydrogenase activity was assayed with Thalmann's [19] method; the activity is expressed in µg triphenylformazan/g oven-dry soil/24 hours. Romeiko's [16] method was applied for determination of protease activity, which is given as number of gelatin units/g oven-dry soil/40 hours. Urease activity, determined according to the method of Tabatabai and Bremner [18], is expressed in µg NH₄-N/g oven-dry soil/hour.

Results and discussion. One can deduce from Table 1 that the physicochemical properties in the 0–10-cm layer of both soils suffered only little changes due to compaction. But Table 2 shows that soil compaction visibly affected percentage distribution of structural aggregates. Thus, compaction of humogley reduced the proportion of larger aggregates (>10–3 mm) and increased that of the smaller ones (3–<0.25 mm). The chernozem presented a rather different pattern: compaction of this soil did not reduce but, contrarily, increased the proportion of the largest aggregates (>10–7 mm); proportion of the 7–2-mm aggregates decreased, while that of the smaller ones (2–<0.25 mm) increased. As a final result of soil compaction, a 1.5% diminution (humogley) or a 3% diminution (chernozem), i.e. an approximately 2% diminution occurred in the stability of structural aggregates.

The microbial populations were strongly affected by soil compaction (Table 3). In the humogley, compaction caused decreases in counts of aerobic heterotrophic, ammonifying and ureolytic bacteria, azoto-

Table 1

Some physicochemical properties of uncompacted and compacted soils

Soil type	Variant	Sand (%)	Silt (%)	Clay (%)	pH in H ₂ O	pH in 1 N KCl	CaCO ₃ (%)	Organic C (%)	Total N (%)
Humogley	Uncompacted	27.88	31.40	40.72	7.18	8.01	1.66	2.52	0.29
	Compacted	29.48	29.53	40.96	7.03	7.92	1.25	2.73	0.31
Chernozem	Uncompacted	32.00	31.88	36.12	7.33	8.06	8.30	1.52	0.17
	Compacted	33.48	30.40	36.12	7.31	8.10	7.88	1.52	0.17

Table 2

Distribution of structural aggregates in uncompacted and compacted soils (%)

Soil type	Variant	Aggregate size (mm)									Stability of aggregates (%)
		>10	10-7	7-5	5-3	3-2	2-1	1-0.5	0.5-0.25	<0.25	
Humogley	Uncompacted	25.57	6.09	15.97	12.93	6.92	15.09	11.44	4.25	1.73	93.02
	Compacted	7.55	3.52	9.81	10.94	7.86	21.56	24.13	10.67	3.95	91.50
Chernozem	Uncompacted	13.98	6.74	17.37	15.63	16.78	15.45	9.40	3.74	0.95	92.84
	Compacted	16.48	7.71	16.44	14.19	8.09	15.89	12.61	5.71	2.79	89.80

bacter and actinomycetes, and increases in counts of denitrifying bacteria and micromycetes. In the chernozem, compaction also resulted in decreases in counts of microbial groups, the only exception being the count of denitrifying bacteria which increased. The most pronounced decrease occurred in the count of azotobacter in the humogley (from 1160 cells in uncompacted soil to 308 cells in compacted soil). Our previous studies showed that the count of azotobacter was a good indicator of the changes in soil [7, 12].

Our results are in good agreement with those of Govedarica *et al.* [6] who found that disturbance of soil structure and increasing of volume mass brought about decreases in the number of aerobic microorganisms and the magnitude of this effect depended on the degree of soil compaction.

Enzyme activities are influenced by soil properties, climatic conditions, applied agromeliorative measures, aggregate state [3, 10, 13, 14, 17]. In concordance with these findings, determination of enzyme activities in bulk soil (0-10-cm layer) showed (Table 4) that soil compaction caused decreases in dehydrogenase, protease and urease activities of humogley, and a decrease in dehydrogenase activity and slight

Table 3

Microbial populations in uncompacted and compacted soils

Soil type	Variant	Aerobic heterotrophic bacteria $\times 10^6$	Ammonifying bacteria $\times 10^3$	Ureolytic bacteria $\times 10^3$	Denitrifying bacteria $\times 10^4$	Azotobacter $\times 10^2$	Actinomycetes $\times 10^4$	Micromycetes $\times 10^4$
Humogley	Uncompacted	405.81	311.79	39.69	68.87	11.60	30.50	22.50
	Compacted	186.38	173.70	21.42	93.82	3.08	16.48	36.17
Chernozem	Uncompacted	819.00	21.04	9.32	50.00	12.67	11.51	21.86
	Compacted	464.00	190.78	5.04	64.00	5.69	4.92	20.00

increases in protease and urease activities of chernozem. In other words, the negative effect of soil compaction on enzyme activities was stronger in the humogley than in the chernozem.

Enzyme activities, as shown in Table 5, varied depending on the size of the aggregates separated from the 0—10-cm layers of the two soils. Dehydrogenase activity increased with decreasing aggregate size. Thus, this activity was highest in the smallest aggregates (<0.25 mm) and lowest in the largest (>10—5-mm) aggregates. Contrarily, protease and urease activities peaked in the medium-size aggregates (protease in the 3—2- and 1—0.5-mm aggregates of humogley and in the 2—1-mm aggregates of chernozem; urease activity in the 3—2-mm aggregates of both soils), then decreased in both smaller and larger aggregates. However, both protease and urease activities gave higher values in the smallest (<0.25-mm) than in the largest (>10-mm) aggregates.

Table 4

Enzyme activities in uncompacted and compacted soils

Soil type	Variant	Dehydrogenase activity	Protease activity	Urease activity
Humogley	Uncompacted	237.00	14.38	12.30
	Compacted	109.52	8.13	10.40
Chernozem	Uncompacted	194.44	9.94	17.15
	Compacted	156.22	10.55	19.11

Table 5

Enzyme activities in structural aggregates of different size separated from uncompacted and compacted soils

Soil type	Enzyme activity	Aggregate size (mm)									
		>10	10—7	7—5	5—3	3—2	2—1	1—0.5	0.5—0.25	<0.25	
Humogley	Dehydrogenase	80	90	90	190	135	136	158	145	235	
	Protease	6.28	6.25	6.00	9.80	10.00	8.25	10.00	7.00	8.13	
	Urease	6.65	10.15	11.20	13.65	20.65	19.25	15.75	19.65	11.9	
Chernozem	Dehydrogenase	95	105	100	117	125	140	146	203	258	
	Protease	6.00	6.25	7.00	6.25	11.00	16.75	6.50	8.40	8.33	
	Urease	6.12	6.47	4.72	6.80	9.80	8.05	5.95	6.12	6.47	

Conclusions. Soil compaction due to passing of heavy farm machinery negatively affects stability of structural aggregates, development of most of microbial groups and enzyme activities. All these effects of soil compaction were more pronounced in humogley (characterised by a bad water-air regime) than in chernozem.

REFERENCES

- 1 Anderson, G. R., *Ecology of Azotobacter in soils of the pampa region. I. Occurrence*, „Soil Sci.“, **86**, 1958, 57—65.
- 2 Black, C. A., Evans, D. D., White, J. L., Ensminger, L. E., Clark, F. E. (Eds.), *Methods of Soil Analysis*, Am. Soc. Agron., Madison, WI, 1965.
- 3 Burns, R. G., *Enzyme activity in soil: some theoretical and practical considerations*, in Burns, R. G. (Ed.), *Soil Enzymes*, pp. 295—340, Acad. Press, London, 1978.
- 4 Collins, C. H., Lyne, P. M., *Microbiological Methods*, Butterworth, London, 1970.
- 5 Fedorov, M. V., *Rukovodstvo k prakticheskim zanyatiyam po mikrobiologii*, Izd. SPSKokhoz. Lit., Moskva, 1951.
- 6 Govedarica, M., Milošević, N., Jarak, M., *Sabijenost zemljišta i mikroorganizmi*, in *Uticaj sabijanja zemljišta na prinos poljoprivrednih kultura*, pp. 17—27, Poljoprivr. Fak., Novi Sad, 1993.
- 7 Govedarica, M., Milošević, N., Jarak, M., Bogdanović, D., Vojvodić-Vuković, M., *Mikrobiološka aktivnost u zemljištima Vojvodine*, „Zb. Rad. Inst. Ratarstvo i Povrtarstvo“ (Novi Sad), **21**, 1993, 75—91.
- 8 Hadžić, V., Nikolić, R., Marinković, B., Djukić, D., *Sabijanje zemljišta — uzroci i posledice*, in *Uticaj sabijanja zemljišta na prinos poljoprivrednih kultura*, pp. 5—16, Poljoprivr. Fak., Novi Sad, 1993.
- 9 Kinsbursky, R. S., Levanon, D., Yaron, B., *Role of fungi in stabilizing aggregates of sewage sludge-amended soils*, „Soil Sci. Soc. Am. J.“, **53**, 1989, 1086—1091.
- 10 Kiss, S., Drăgan-Bularda, M., Rădulescu, D., *Soil polysaccharidases: activity and agricultural importance*, in Burns, R. G. (Ed.), *Soil Enzymes*, pp. 117—147, Acad. Press, London, 1978.
- 11 Lynch, J. M., *Soil Biotechnology: Microbial Factors in Crop Productivity*, Blackwell, Oxford, 1983.
- 12 Milošević, N., Govedarica, M., Jarak, M., *Dehidrogenaza i azotobacter — indikatori biogenosti različitih tipova zemljišta pod kukuruzom*, „Savr. Poljoprivr.“ (Novi Sad), **41** (6), 1993, 293—294.
- 13 Milošević, N., Jarak, M., Govedarica, M., *Dinamika ukupnog broja mikroorganizama i dehidrogenazna aktivnost u rizosferi šećerne repe u zavisnosti od NPK đubriva*, „Agron. Glasn.“, No. 4—5, 1989, 3—11.
- 14 Milošević, N., Jarak, M., Govedarica, M., Hadžić, V., Sekulić, P., *Correlation between enzyme activities and meliorative practices applied to solonetz soil*, „Zemljište Biljka“, **43**, 1994, 25—37.
- 15 Pochon, J., Tardieux, P., *Techniques d'analyse en microbiologie du sol*, Ed. de la Tourelle, St. Maudé, Seine, 1962.
- 16 Romeiko, I. N., *Proteolitičeskaya aktivnost' dersono-podzolistoi pochvy pri raznykh sposobakh vspashki*, „Pochvovedenie“, No. 10, 1969, 87—90.
- 17 Skujinš, J., *History of abiotic soil enzyme research*, in Burns, R. G. (Ed.), *Soil Enzymes*, pp. 1—19, Acad. Press, London, 1978.
- 18 Tabatabai, M. A., Bremner, J. M., *Assay of urease activity in soils*, „Soil Biol. Biochem.“, **4**, 1972, 479—487.
- 19 Thalmann, A., *Zur Methodik der Bestimmung der Dehydrogenaseaktivität im Boden mittels Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC)*, „Landw. Forsch.“, **21**, 1968, 249—258.
- 20 Tisdall, J. M., Oades, J. M., *Organic matter and water-stable aggregates in soils*, „J. Soil Sci.“, **33**, 1982, 141—163.
- 21 Vučić, N., *Struktura zemljišta*, in Putanov, P. (Ed.), *Vodni, vazdušni i toplotni režim zemljišta*, pp. 80—134, Vojvodj. Akad. Nauka i Umetnosti, Novi Sad, 1987.

POTENȚIALUL ENZIMATIC AL UNUI SOL TEHNOGEN SUPUS
REVEGETĂRII CU CATINA ALBĂ (*HIPPOPHAË RHAMNOIDES* L.)

DANIELA PAȘCA*, VASILE CRISTEA**, RADU CRIȘAN*, VASILE MUNTEAN*,
ȘTEFAN KISS** și MIHAIL DRĂGAN-BULARDA**

SUMMARY. — *Enzymatic Potential of a Technogenic Soil Submitted to Revegetation with Sea-buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.).* Two areas (one having south-western aspect and the other south-eastern aspect) on the 4-year-old terrace VIII of the spoil dump at the lead and zinc mine in Rodna, Bistrița-Năsăud district, Romania were planted to sea-buckthorn in 1989. In the next years, the sea-buckthorn shrubs showed continuously a luxuriant development. In the springs, summers and autumns of 1994 and 1995, spoil was sampled from the root zone of the shrubs for enzymological analyses. Spoil samples taken from unplanted areas in the vicinity of the planted ones on terrace VIII as well as samples from a native soil at the foot of spoil dump served for comparison. Sampling depths were 0—10, 10—20 and 20—30 cm. Six enzymatic activities: invertase (in buffered and nonbuffered reaction mixtures), phosphatase, catalase, actual and potential dehydrogenase and the nonenzymatic H₂O₂-splitting capacity were determined in each sample, and then, based on the analytical data, the enzymatic indicator of spoil (soil) quality was calculated. The results have shown that the enzymatic potential was higher in the sea-buckthorn-planted than in the unplanted spoil, but lower than in the native soil. The activities also showed seasonal and depth-dependent variations. Thus, in the planted spoil the enzymatic indicator had higher values in spring and autumn than in summer, and in the 0—10- and 10—20-cm layers than in the 20—30-cm one. The planted spoil was a little more enzyme-active on the area with south-western aspect than on that with south-eastern aspect. The conclusion was drawn that plantation of sea-buckthorn is a recommendable method for efficient revegetation of lead and zinc mine spoils.

În cadrul experimentului de bioremediere a solului iazului de decantare de la mina de plumb și zinc Rodna, jud. Bistrița-Năsăud, în perioada 1987—1988 s-au instalat 14 parcele experimentale mici de recultivare (7 m²) și două parcele experimentale mari de recultivare (50 m²). Evoluția potențialului enzimatic în orizontul superior (0—10 cm) al parcelelor experimentale a fost urmărită din 1987 (1988) până în 1994, iar rezultatele obținute au fost prezentate sintetic [5, 7].

Din anul 1992 s-au efectuat analize enzimologice în profunzimea solului din parcelele experimentale (0—30 cm). Indicatorii enzimatici de calitate au arătat că valorile cele mai ridicate s-au evidențiat în parcelele experimentale copertate cu sol [4, 5].

Tratamentul complex, materializat prin copertarea cu sol, fertilizarea organică și minerală, precum și însămânțarea au avut drept re-

* Institutul de Cercetări Biologice, 3400 Cluj, România

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

zultat și creșterea abundenței, diversității și a indicelui de maturitate a nematodelor [8, 9].

În această lucrare prezentăm rezultatele obținute în urma analizelor enzimologice efectuate în zona radiculară a arbustului *Hippophaë rhamnoides* L., care a fost pus la înrădăcinat sub formă de butași în anul 1989 pe terasa VIII, veche de 4 ani. În anii următori, acest arbust a avut o dezvoltare luxuriantă, invadând atât parcelele experimentale situate pe terasa VIII cât și taluzurile acestei terase.

Material și metodă. Vegetația ierboasă care s-a dezvoltat pe parcelele experimentale a realizat o bună acoperire a acestora, împiedicând deflatarea și eroziunea superficială. Pentru o fixare mai bună a haldei de steril s-a apelat la soluția plantării pe versanții sud-vestic și sud-estic a câte 10—12 puieți aparținând la 10—12 specii de arbori și arbuști. Tot pe terasele cu parcele experimentale s-au pus la înrădăcinat câte 20 de butași de răchită roșie (*Salix purpurea* L.), în alternanță cu cătina albă (*Hippophaë rhamnoides* L.), spre a se urmări posibilitatea înlocuirii puieților prin butași. Dintre toate speciile de arbori și arbuști plantate, dezvoltarea a fost cea mai viguroasă la *H. rhamnoides*.

În vederea analizelor enzimologice s-au prelevat 6 serii de probe de sol, în sezonul de primăvară, vară și toamnă, în perioada mai 1991 — septembrie 1995. Datele prelevării probelor de sol sunt următoarele: 11.05.1994, 1.08.1994, 12.10.1994, 4.05.1995, 4.07.1995 și 13.09.1995.

Probele de sol au fost colectate din zona radiculară a arbustului *H. rhamnoides*, situat pe terasa VIII. Adâncimile de la care s-au prelevat probele de sol au fost următoarele: 0—10, 10—20 și 20—30 cm. În anul 1994 s-au colectat probe de sol de pe terasa VIII, având expoziție sud-vestică. Drept martori s-au prelevat și probe de sol situat în vecinătatea zonei plantate cu *H. rhamnoides*, sol neinfluențat de zona cultivată cu acest arbust, precum și probe de sol nativ, de la baza haldei de steril.

În anul 1995 s-au prelevat probe de sol din zona radiculară a arbustului *H. rhamnoides*, situat pe terasa VIII, având expoziție sud-vestică și sud-estică. S-au analizat probe de sol martor de pe aceeași terasă, cu expozițiile sud-vestică și respectiv sud-estică, precum și sol nativ, de la baza haldei de steril.

Pentru analizele enzimologice s-au folosit probe de sol activ (netratat termic) și probe de sol inactivate termic. Inactivarea s-a realizat la 120°C/h, în trei zile consecutive.

S-a determinat conținutul în substanță uscată.

S-au efectuat următoarele analize enzimologice: activitatea invertazică în amestecuri de reacție fără adaos de soluție tampon acetat 3M, pH 5,6, activitatea invertazică în amestecuri de reacție cu adaos de soluție tampon acetat, activitatea fosfatazică, activitatea catalitică enzimatică (catalazică), activitatea catalitică neenzimatică, activitatea dehidrogenazică actuală și activitatea dehidrogenazică potențială.

Pentru determinarea conținutului în substanță uscată, o parte din fiecare probă de sol a fost supusă uscării în etuvă, la 105°C, timp de 72 ore.

Activitatea invertazică a fost determinată cu ajutorul metodei polarimetrice [3]. Compoziția amestecurilor de reacție a fost următoarea: 10 g sol neinactivat + 2,5 ml toluen + 10 ml soluție tampon acetat sau 10 ml apă distilată + 5 ml soluție de zaharoză 20%.

Pentru analiza **activității fosfatazice** cu metoda Krámer și Erdősi [6], amestecurile de reacție au constat din 2,5 g sol + 2 ml toluen + 10 ml soluție de ferilfosfat disodic 0,5%.

O tehnică bazată pe metoda lui Kappen [2] a fost utilizată pentru analiza **activității catalitice enzimatică (catalazică) și neenzimatică**. Amestecurile de reacție au constat din 1,5 g sol + 10 ml apă distilată + 2 ml soluție de H₂O₂ 3%. Activitatea catalitică neenzimatică s-a determinat ca și cea enzimatică, dar s-a folosit sol inactivat prin autoclavare.

Metoda lui C a s i d a și colab. [1] a fost aplicată pentru determinarea *activității dehidrogenazice* (reducerea TTC), în amestecuri de reacție cu 3 g sol + 0,5 ml soluție de TTC 3%, la care se adaugă 1 ml apă distilată în vederea determinării activității dehidrogenazice actuale, sau 1 ml soluție de glucoză 3% pentru determinarea activității dehidrogenazice potențiale.

S-au analizat, de asemenea, amestecuri de sol la care nu s-a adăugat soluție de substrat și amestecuri fără sol, numai cu soluție de substrat.

Exprimarea activităților enzimaticе. Activitatea invertazică se exprimă în diferență de rotație optică $\Delta\alpha \sim 10$ g sol (substanță uscată)/24 h/37°C; activitatea fosfatazică se exprimă în mg fenol/2,5 g sol (substanță uscată)/24 h/37°C; activitatea catalitică enzimatică și cea neenzimatică se exprimă în mg H₂O₂/1,5 g sol (substanță uscată)/h/20°C; activitatea dehidrogenazică (reducerea TTC) se exprimă în mg trifenilformazan/3 g sol (substanță uscată)/24 h/37°C.

Luând drept 100% valoarea maximă a fiecărei activități, se obțin activitățile relative procentuale, a căror însumare furnizează indicatorul enzimatic sezonier al calității solului. S-au calculat și indicatorii enzimatici de variabilitate sezonieri. Pe toată perioada cercetată s-au calculat și indicatorii enzimatici ai calității solului prelevat de la cele trei adâncimi.

Rezultate și discuții. Rezultatele obținute în urma analizelor enzimologice sunt prezentate în Tabelele 1 și 2.

Datele incluse în aceste tabele arată că 4 activități enzimaticе (activitatea invertazică fără adaos de soluție tampon acetat, activitatea invertazică cu adaos de soluție tampon acetat, activitatea fosfatazică, activitatea catalazică) și activitatea catalitică neenzimatică au putut fi puse în evidență în toate probele de sol. Activitatea dehidrogenazică actuală și cea potențială au prezentat valori măsurabile în 13 și respectiv 20 probe din totalul de 27 probe de sol analizate în 1994 și respectiv în câte 28 probe de sol din cele 45 probe luate în studiu în anul 1995.

Activitatea invertazică analizată în absența sau în prezența soluției tampon acetat oscilează în raport cu adâncimea de prelevare a probelor de sol extrase din zona radiculară a arbustului *H. rhamnoides* în sezoanele de primăvară și toamnă, diminuându-se numai în sezonul de vară. La probele de sol martor s-au înregistrat oscilații ale acestei activități enzimaticе. Numai în cazul profilului de sol nativ de la baza haldei, activitatea invertazică analizată în cele două variante experimentale se micșorează de la 0—10 cm spre 20—30 cm.

Activitatea fosfatazică a înregistrat tendințe de diminuare în funcție de adâncimea de colectare a probelor din zona radiculară a arbustului *H. rhamnoides* și în profilul de sol nativ de la baza haldei. La probele martor se constată oscilații ale acestei activități enzimaticе.

La activitatea catalazică și activitatea catalitică neenzimatică s-au remarcat fluctuații în raport cu adâncimea de prelevare a probelor de sol din zona radiculară și din zona martor, iar la probele de sol nativ de la baza haldei valorile obținute au fost în general apropiate pe întinderea profilului analizat. În probele de sol cu plantația de *H. rhamnoides* și în zonele martor activitatea catalazică a fost mai scăzută decât activitatea catalitică neenzimatică, exceptând sezonul de vară, când valorile activității catalazice le-au depășit pe cele ale catalizatorilor neenzimatici, termostabili, iar la profilul de sol s-au obținut valori mai

Tabel 7

Analiza enzimologică a probelor de sol colectate în anul 1994

Sezonul	Locul de colectare	Adâncimea (cm)	Activitatea invertazică		Activitatea fosfatazică	Activitatea catalitică		Activitatea dehidrogenazică	
			Fără tampon	Cu tampon		Enzimatică	Neeenzimatică	Activă	Potențială
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Primăvara	<i>Hippophaë</i> SV	0-10	0,121	0,708	3,788	30,003	33,120	0,041	0,221
		10-20	0,182	0,332	1,994	31,702	23,683	0	0,093
		20-30	0,128	0,320	0,834	31,990	27,850	0	0,080
	Martor SV	0-10	0,284	0,480	3,230	30,767	32,690	0	0,075
		10-20	0,294	0,441	1,324	29,876	30,274	0	0,007
		20-30	0,195	0,397	1,236	31,636	30,420	0	0
	Sol	0-10	1,101	1,451	5,307	36,475	22,341	0,736	1,878
		10-20	0,637	0,782	4,179	40,887	21,103	0,335	1,140
		20-30	0,171	0,332	1,083	41,148	21,381	0,057	0,179
Vara	<i>Hippophaë</i> SV	0-10	0,345	0,364	1,290	19,002	12,316	0	0,062
		10-20	0,295	0,334	0,810	21,817	8,797	0	0,043
		20-30	0,205	0,184	0,255	18,650	8,797	0	0,037
	Martor SV	0-10	0,175	0,184	0,660	18,650	4,574	0	0
		10-20	0,205	0,154	0,480	20,058	6,334	0	0
		20-30	0,265	0,234	0,255	19,354	7,741	0	0
	Sol	0-10	1,085	1,024	5,377	35,541	12,668	0,300	0,893
		10-20	0,915	0,794	4,500	42,579	8,797	0,087	0,731
		20-30	0,435	0,354	4,282	40,468	8,093	0,031	0,306
Toamna	<i>Hippophaë</i> SV	0-10	0,404	0,360	2,670	29,206	30,359	0,116	0,191
		10-20	0,340	0,384	2,119	38,308	21,282	0,041	0,178
		20-30	0,371	0,306	1,820	30,385	26,924	0,034	0,122
	Martor SV	0-10	0,087	0,032	0,461	31,326	27,072	0	0
		10-20	0,162	0,162	0,553	29,770	25,953	0	0
		20-30	0,219	0,197	0,156	29,746	25,497	0	0
	Sol	0-10	1,072	1,107	7,126	38,955	21,506	0,843	1,128
		10-20	0,909	0,767	5,764	44,044	14,127	0,391	0,767
		20-30	0,729	0,787	5,108	43,197	17,523	0,303	0,441

Tabel 2

Analiza enzimologică a probelor de sol colectate în anul 1995

Sezonul	Locul de colectare	Adâncimea (cm)	Activitatea invertazică		Activitatea fosfatazică	Activitatea catalitică		Activitatea dehidrogenazică		
			Fără tampon	Cu tampon		Enzimatică	Neenzimatică	Actuală	Potențială	
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Primăvara	<i>Hippophaë</i> SV	0-10	0,295	0,246	0,073	20,789	34,215	0,223	0,415	
		10-20	0,322	0,310	0,483	22,703	34,928	0,054	0,093	
		20-30	0,308	0,320	0,425	28,204	32,109	0	0	
	<i>Hippophaë</i> SE	0-10	0,250	0,250	0,430	22,703	30,691	0,074	0,134	
		10-20	0,439	0,383	1,420	24,192	25,382	0	0	
		20-30	0,311	0,277	0,850	26,602	25,820	0	0	
	Martor SV	0-10	0,262	0,331	0,540	28,567	26,957	0,057	0,107	
		10-20	0,284	0,208	0,419	15,809	35,475	0	0	
		20-30	0,262	0,178	0,263	27,253	33,542	0	0	
	Martor SE	0-10	0,143	0,131	0,651	17,270	28,332	0	0	
		10-20	0,197	0,210	0,500	20,876	34,794	0,077	0,108	
		20-30	0,436	0,349	0,290	29,851	25,461	0	0	
	Sol	0-10	1,006	0,821	3,800	33,789	21,576	0,491	0,585	
		10-20	0,928	0,815	0,679	27,887	19,919	0,403	0,466	
		20-30	0,819	0,762	2,460	27,635	23,571	0,280	0,404	
	Vara	<i>Hippophaë</i> SV	0-10	0,403	0,378	0,245	28,054	18,702	0,127	0,146
			10-20	0,456	0,467	0,286	26,905	18,310	0,066	0,112
			20-30	0,272	0,345	0,432	28,039	14,388	0	0
<i>Hippophaë</i> SE		0-10	0,367	0,315	0,274	28,289	16,830	0,091	0,091	
		10-20	0,347	0,337	0,521	27,807	14,460	0,044	0,063	
		20-30	0,351	0,361	0,590	27,328	13,851	0	0	
Martor SV		0-10	0,175	0,184	0,660	18,650	4,574	0	0	
		10-20	0,205	0,154	0,480	20,058	6,334	0	0	
		20-30	0,265	0,234	0,255	19,354	7,741	0	0	
Martor SE		0-10	0,366	0,376	0,541	26,519	18,416	0	0	
		10-20	0,322	0,322	0,406	25,282	16,854	0	0	
		20-30	0,352	0,362	0,352	30,035	15,017	0	0	
Sol		0-10	1,356	1,368	4,380	52,901	11,612	0,572	0,664	
		10-20	1,268	1,291	1,152	48,732	10,647	0,421	0,472	
		20-30	1,045	1,067	2,019	46,189	8,611	0,269	0,347	

Tabel 2 (continuare)

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Hippophaë</i> SV	0-10	0,971	0,893	1,373	26,322	22,393	0,378	0,734	
	10-20	0,871	0,804	0,996	16,115	31,837	0,342	0,474	
	20-30	0,417	0,439	0,498	19,841	31,745	0,105	0,176	
<i>Hippophaë</i> SE	0-10	0,413	0,369	1,275	19,289	27,556	0,293	0,566	
	10-20	0,364	0,300	1,634	27,949	18,884	0,248	0,482	
	2-30	0,256	0,310	0,898	31,228	16,178	0,073	0,167	
Martor SV	0-10	0,331	0,353	1,185	14,080	36,583	0,055	0,138	
	10-20	0,346	0,306	1,022	2,284	44,553	0,027	0,040	
	20-30	0,323	0,263	0,501	3,035	45,528	0	0	
Martor SE	0-10	0,348	0,329	1,349	14,672	35,135	0,041	0,123	
	10-20	0,334	0,244	0,902	12,930	41,141	0,006	0,076	
	20-30	0,289	0,313	0,513	7,752	44,880	0	0	
Sol	0-10	1,352	1,290	5,880	46,279	12,661	0,668	0,922	
	10-20	1,427	1,286	5,290	33,341	18,111	0,548	0,614	
	20-30	0,902	0,808	2,654	11,549	32,174	0,380	0,549	

ridicate ale activității catalazice decât ale activității catalitice neenzimatică.

Activitatea dehidrogenazică actuală a fost incomparabil mai slabă decât activitatea dehidrogenazică potențială. Activitatea dehidrogenazică actuală a fost prezentă numai în orizontul superior (primăvara) și în probele de sol prelevate de la cele trei adâncimi (toamna) din zona radiculară a arbustului *H. rhamnoides*. În zonele martor activitatea dehidrogenazică actuală nu a putut fi măsurată. Activitatea dehidrogenazică potențială înregistrează tendințe de diminuare de la suprafață spre adâncimea probelor de sol din zona radiculară a arbustului plantat. Activitatea dehidrogenazică actuală și potențială înregistrează tendințe clare de diminuare în funcție de adâncimea solului nativ de la baza haldei (Tabelul 1).

Din datele prezentate în Tabelul 2 rezultă că la activitatea invertazică s-au înregistrat oscilații în raport cu adâncimea probelor de sol, atât în zona radiculară a arbustului cercetat cât și în zonele martor (primăvara și vara), iar în sezonul de toamnă s-au remarcat tendințe de diminuare în profilele de sol din zona radiculară cu plantația de *H. rhamnoides*. Valorile obținute în cazul celor două variante experimentale analizate sunt oscilatorii, fiind relativ apropiate. Activitatea invertazică a solului nativ a fost incomparabil mai mare decât cea a probelor experimentale și a zonelor martor în toată perioada cercetată.

Activitatea fosfatazică arată fluctuații în funcție de adâncimea probelor de sol la cele două variante experimentale, depășind valorile probelor martor, dar fiind mult inferioare solului nativ de la baza hal-

dei. Activitățile catalitice enzimatic și neenzimatic sunt oscilante în raport cu adâncimea probelor de sol din zona radiculară și în probele din zonele martor. Activitatea catalitică neenzimatică depășește în unele cazuri activitatea catalitică, în special la probele de sol din zona martor, solul nativ fiind incomparabil mai activ din punctul de vedere al activității catalitice față de activitatea catalitică neenzimatică.

Activitățile dehidrogenazică actuală și potențială sunt prezente în orizontul superior și mediu (primăvara și vara), în zonele radiculare depășind zonele martor, unde aceste activități enzimatic au fost prezente numai în orizontul superior și numai în sezonul de primăvară. Toamna, activitățile dehidrogenazică actuală și potențială din zona radiculară au fost mult superioare celor din zonele martor, dar în general mai mici decât în solul nativ. Activitatea dehidrogenazică potențială a depășit în general valorile activității dehidrogenazice actuale în toate cazurile.

Pe baza datelor analitice prezentate în Tabelele 1 și 2 s-au calculat indicatorii enzimatici de intensitate și de variabilitate sezonieri (Fig. 1 și 2).

Din analiza Fig. 1 rezultă că în primul an de cercetare indicatorii enzimatici de calitate au înregistrat valori relativ apropiate primăvara și toamna, vara obținându-se valorile cele mai scăzute, atât la probele de sol din zona radiculară (HSV), cât și la zona martor (MSV) și la proba de sol nativ de la baza haldei (S). De asemenea, valorile indicatorilor enzi-

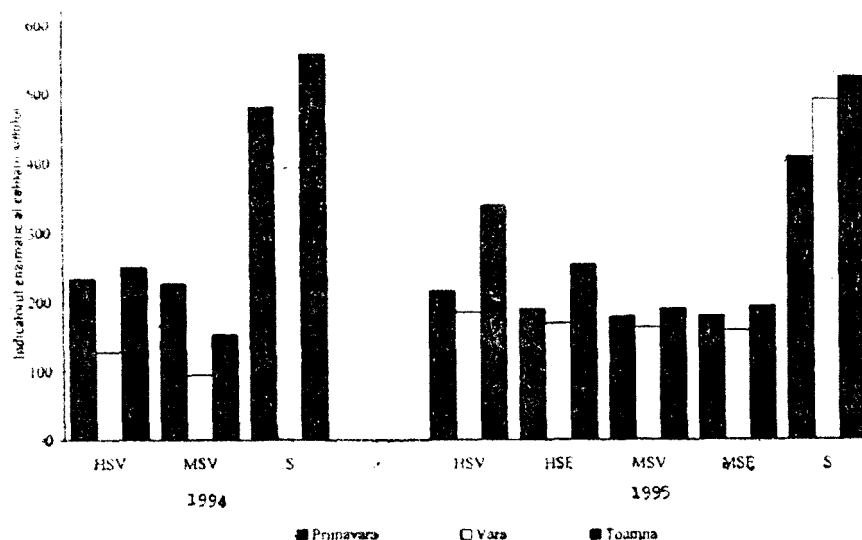


Fig. 1. Indicatorii enzimatici sezonieri de calitate ai solului supus revegetării cu arbustul *Hippophaë rhamnoides*.

H -- Sol de sub *Hippophaë*, SV -- Expoziție sud-vestică, SE -- Expoziție sud-estică, M -- Sol martor, S -- Sol nativ.

matici de calitate au fost incomparabil mai mari la solul zonei radiculară decât la solul zonei martor, dar nivelul acestor indicatori a fost sub cel al solului nativ de la baza haldei. Atât la proba de sol HSV cât și la solul nativ valoarea maximă a indicatorului enzimatic al calității solului (IECS) a atins nivelul maxim în sezonul de toamnă, spre deosebire de zona martor (MSV), la care primăvara, valoarea IECS a fost mai ridicată decât în celelalte două sezoane.

În anul 1995 indicatorii enzimatici sezonieri de calitate au înregistrat în toate cazurile valorile cele mai ridicate toamna. Vara s-au obținut valorile minime ale IECS la cele două probe experimentale HSV și HSE, precum și la probele martor (MSV și MSE), în timp ce la solul nativ de la baza haldei valoarea minimă a IECS s-a obținut în sezonul de primăvară.

Și în al doilea an de studiu se constată că valorile IECS au fost mai ridicate la probele de sol din zona radiculară (HSV și HSE) decât la solul zonei martor (MSV și MSE), dar în toate cazurile aceste valori au fost mai scăzute decât la solul nativ. Indicatorii enzimatici ai calității solului zonei radiculară situate pe terasa cu expoziție sud-vestică au fost cu ceva mai ridicați decât la probele situate la sud-est.

Din analiza Fig. 2 rezultă că în anul 1994 cele trei tipuri de probe de sol s-au comportat diferit din punctul de vedere al valorilor indicatorilor enzimatici de variabilitate ai calității solului (IEVCS). Astfel, în solul din zona radiculară, precum și în solul nativ, valorile IEVCS

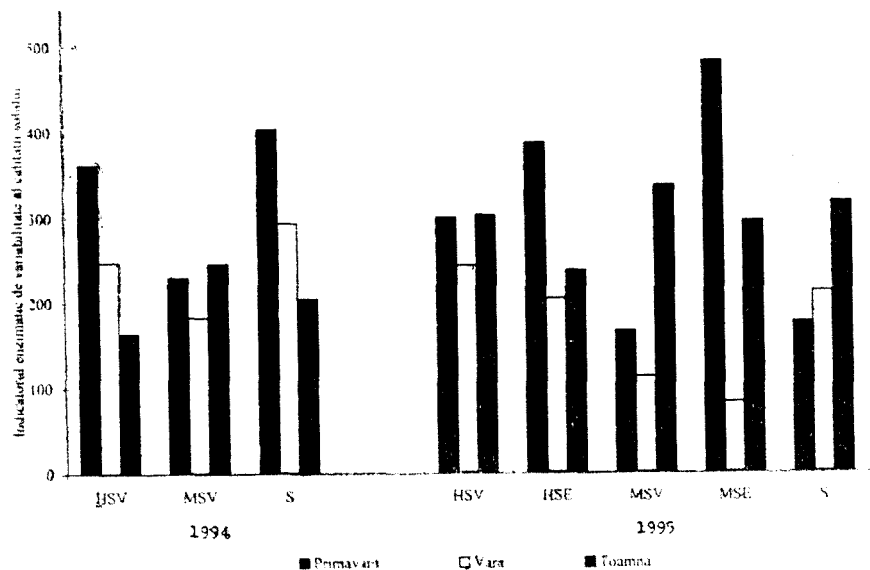


Fig. 2. Indicatorii enzimatici sezonieri de variabilitate ai solului supus revegătorii cu arbustul *Hippophaë rhamnoides*.

Pentru abrevieri, vezi Fig. 1.

s-au diminuat după cum urmează: primăvara > vara > toamna. Rezultă că în cazul acestor probe în sezonul de primăvară s-a constatat variabilitatea maximă, iar în sezonul de toamnă s-a remarcat o stabilitate mare. Solul zonei martor (MSV) a înregistrat valori relativ apropiate ale IEVCS în sezoanele de primăvară și toamnă.

În anul 1995, atât la probele experimentale HSV și respectiv HSE, cât și la probele martor aferente (MSV și respectiv MSE), IEVCS au înregistrat valorile cele mai scăzute în sezonul de vară, arătând variabilitatea minimă a potențialului enzimatic în acest sezon. La probele de sol din zona radiculară de pe parcela cu expoziție sud-vestică (HSV), IEVCS înregistrează oscilații mai slabe, solul fiind mai stabil pe toată perioada cercetată, comparativ cu solul din zona radiculară de pe parcela cu expoziție sud-estică (HSE). Solul zonelor martor (MSV, respectiv MSE) s-a dovedit a fi extrem de variabil în anul 1995. Solul nativ de la baza haldei a înregistrat o stabilitate mai accentuată în sezoanele de primăvară și vară, valoarea IEVCS fiind mai ridicată în sezonul de toamnă.

Acordând pondere egală celor doi indicatori de intensitate și de variabilitate rezultă că în anul 1994, în sezonul de toamnă, s-a înregistrat valoarea maximă a IECS la proba HSV, în acest sezon constatându-se și stabilitatea maximă a activităților enzimaticice. Potențialul enzimatic al solului nativ de la baza haldei a atins nivelul maxim în sezonul de toamnă, când s-a obținut și stabilitatea maximă. La proba de sol MSV valoarea cea mai ridicată a IECS s-a obținut primăvara, iar stabilitatea maximă s-a constatat vara.

În anul 1995, la solul din zona HSV s-a obținut potențialul enzimatic cel mai ridicat și cu stabilitatea cea mai accentuată. În ambele cazuri potențialul enzimatic al solului din zonele HSV și respectiv HSE a fost incomparabil mai ridicat și mai stabil decât al solului martor (MSV și respectiv MSE), dar și mai scăzut decât al solului nativ și mai puțin stabil decât în cazul acestui sol.

În Fig. 3 sunt redați indicatorii enzimatici ai calității solului calculați pe adâncimi, pentru toată perioada cercetată. Rezultă că în orizonturile superioare (0—10 cm) s-au înregistrat valorile cele mai ridicate ale IECS, atât la varianta HSV cât și la varianta HSE, aceste valori diminuându-se pe măsura creșterii adâncimii probelor de sol. Valorile IECS la variantele HSV și respectiv HSE au fost superioare celor ale IECS din zonele MSV și respectiv MSE, dar inferioare solului nativ de la baza haldei.

Rezultă deci că în zona radiculară a plantației de *H. rhamnoides* s-a creat un potențial enzimatic ce îl depășește pe cel al zonelor martor, dar care nu a atins nivelul potențialului solului nativ de la baza haldei.

Potențialul enzimatic înregistrat în anul 1994 în proba de sol HSV se menține în anul 1995, intensitatea maximă remarcându-se toamna, când s-a constatat și stabilitatea maximă. IECS au înregistrat valori mai ridicate la varianta cu expoziție sud-vestică decât la cea cu expo-

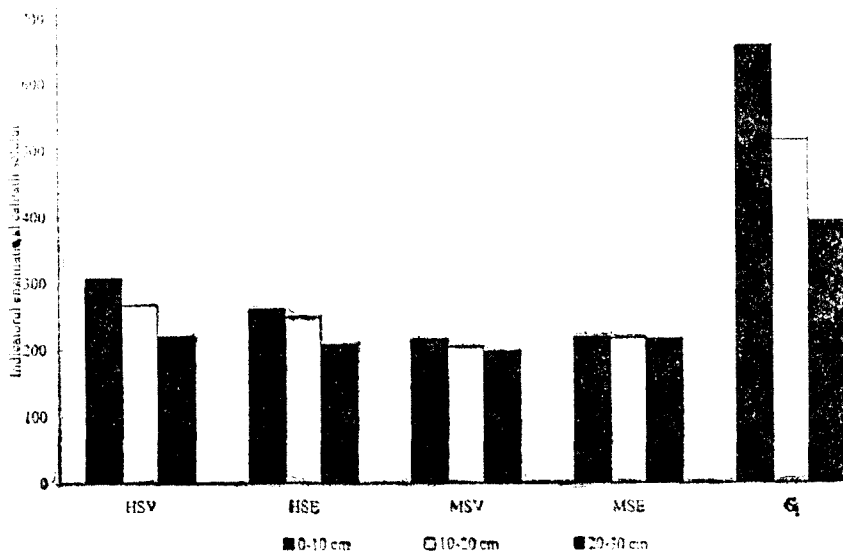


Fig. 3. Indicatorii enzimatici de fertilitate ai solului, calculați pe adâncimi, pentru toată perioada cercetată.

Pentru abrevieri, vezi Fig. 1.

ziție sud-estică, la variantele HSV constatându-se o instabilitate mai puțin accentuată a potențialului enzimatic decât la varianta HSE.

Din datele prezentate mai sus rezultă dezvoltarea abundentă a arbustului plantat pe terasa VIII, expozițiile SV și respectiv SE, contribuind atât la fixarea haldei de steril cât și la crearea unui potențial enzimatic care îl depășește pe cel al zonelor martor și care se menține în timp.

Concluzii. 1. S-au analizat 6 activități enzimatică (activitatea invertazică în amestecuri de reacție fără adaos de soluție tampon acetat, activitatea invertazică în amestecuri de reacție cu adaos de soluție tampon acetat, activitatea fosfatazică, activitatea catalazică, activitatea dehidrogenazică actuală și activitatea dehidrogenazică potențială) și activitatea catalitică neenzimatică în probe de sol prelevate din zona radiculară a arbustului *Hippophaë rhamnoides*, plantat pe terasa VIII, expoziție sud-vestică și respectiv sud-estică. Intensitatea activităților enzimatică și catalitice neenzimatică a fost influențată de felul probei de sol, de condițiile experimentale, de natura enzimei, precum și de adâncimea eșantionului analizat.

2. Potențialul enzimatic al solului evidențiat în zona radiculară a arbustului *H. rhamnoides* este superior celui al solului din zona martor, dar este inferior celui al solului nativ de la baza haldei.

3. Indicatorii enzimatici de calitate ai solului din zona radiculară a arbustului *H. rhamnoides* au înregistrat valorile cele mai ridicate în sezoanele de primăvară și toamnă, iar în sezonul de vară s-a constatat variabilitatea cea mai redusă.

4. În orizonturile superior și mediu (0—10, respectiv 10—20 cm) din zona radiculară a arbustului *H. rhamnoides* s-a creat un potențial enzimatic superior celui din sterilul din zonele martor, care s-a menținut pe toată perioada cercetată, dar care nu a atins valoarea indicatorilor enzimatici ai calității solului nativ de la baza haldei.

5. Plantarea butașilor de *H. rhamnoides* este o metodă recomandabilă pentru revegetarea eficientă a haldelor de steril de la minele de plumb și zinc.

BIBLIOGRAFIE

1. Casida, J. E. jr., Klein, D. A., Santoro, T., *Soil dehydrogenase activity*, „Soil Sci.”, **98**, 1964, 371—376.
2. Kappen, H., *Die katalytische Kraft des Ackerbodens*, „Fühlings Landw. Ztg.”, **62**, 1913, 377—392.
3. Kiss, S., *Die Wirkung des spezifischen Enzymsubstrates (Saccharose) auf die Produktion der Bodensaccharase*, „Z. Pflanzenern., Düng. Bodenk.”, **76**, 1957, 119—122.
4. Kiss, S., Pașca, D., Drăgan-Bularda, M., Crișan, R., Muntean, V., *Enzymological evaluation of the efficiency of the measures applied for biological recultivation of lead and zinc mine spoils*, „Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Biol.”, **37** (2), 1992, 103—107.
5. Kiss, S., Pașca, D., Drăgan-Bularda, M., Crișan, R., Muntean, V., *Evaluarea enzimologică a eficienței biotehnologiei de recultivare a haldei de steril de la o mină de plumb și zinc*, „Proc. 8th Natl. Symp. Ind. Microbiol. Biotehnol. (Bucharest, 1994)”, 1994, 357—363.
6. Krämer, M., Erdei, G., *Primenenie metoda opredeleniia aktivnosti fosfatazi v agrohimiceskih issledovaniakh*, „Pocivovedenie”, No. 9, 1959, 99—102.
7. Pașca, D., Kiss, S., Drăgan-Bularda, M., Crișan, R., Muntean, V., *Evolution of the enzymatic potential in lead and zinc mine spoils submitted to biological recultivation*, „Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Biol.”, **39** (1), 1994, 95—101.
8. Popovici, I., *The use of soil nematodes to assess the quality of technogenic soil rehabilitation*, „Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Biol.”, **38** (1—2), 1993, 43—53.
9. Popovici, I., Pașca, D., Kiss, S., Crișan, R., Munteanu, V., Drăgan-Bularda, M., *Enzymatic potential and nematodes as indicators of the bioremediation efficiency of technogenic soils*, „Abstr., 7th Eur. Ecol. Congr. (Budapest, 1995)”, 1995, 104.

STUDY OF SOME PHYSICO-CHEMICAL AND ENZYMOLOGICAL PROPERTIES OF A BURIED SOIL (Part 2)

MARINELA SIMIHAIAN*, ELENA MANOLACHE**, TIBERIU PICIU* and
STEFAN KISS**

SUMMARY. — The physicochemical and enzymological properties of 22 layers in a 325-cm deep buried soil profile as described in Part 1 of our paper [1] were submitted to simple correlation analysis. Based on the textural characteristics of soil layers, three parts were delimited within the profile. Results of the correlation analysis confirmed the separability of the three profile parts, because some properties in at least one of the profile parts behaved contrarily to the same properties considered in the whole profile. The first, upper profile part comprises the youngest soil layers in which fragments of ceramics from the Roman epoch were found, whereas the third, lower profile part consists of the oldest soil layers, in some of which fragments of ceramics from the Neolithic era were found.

Some properties, however, behaved similarly in all profile parts and in the whole profile. Thus, pH increased, K_2O and total N contents, phosphatase activity (PA) and potential dehydrogenase activity (PDA) decreased with increasing soil depth. There were many positive correlations (e.g. PA— K_2O , PA-humus, PA-PDA, PDA— K_2O , PDA-humus, PDA-total N) as well as negative ones (e.g. PDA-pH, enzymatic-nonenzymatic catalytic activity).

In Part 1 of our paper [1], we have described the results of the physicochemical and enzymological analyses of samples taken at 15-cm intervals from a 325-cm deep buried soil profile. In the upper soil layers (0—25 cm) fragments of ceramics from the Roman epoch, whereas in some deeper soil layers (190—280 cm) fragments of ceramics from the Neolithic era were found. Besides textural characterisation of all soil layers, their pH, $CaCO_3$ content, cation-exchange capacity (CEC), base saturation, available phosphorus, exchangeable potassium, humus and total N contents as well as their phosphatase, enzymatic catalytic (catalase), nonenzymatic catalytic, actual and potential dehydrogenase activities were determined. Incubation times for determination of both dehydrogenase activities were 24 and 72 hours.

The present, second part of our paper completes the first one [1] by submitting the values of the physicochemical and enzymological soil properties to simple correlation analysis.

Material and methods. First, the whole buried soil profile with its 22 layers analysed (depths: 0—325 cm) was considered. Then, based on the textural characteristics of the soil layers, three parts of the profile were considered separately. The first, upper profile part comprising 5 layers analysed (depths: 0—70 cm) is,

* Biological Research Institute, 3400 Cluj, Romania

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

texturally, very varied, consisting of gravel, sand, loam and loamy sand and containing in the 0–25-cm layers, as mentioned above, fragments of ceramics from the Roman epoch. From the second, middle part of the profile 8 layers were analysed (depths: 70–190 cm). These layers are of loamy clay and clay loam texture. In the third, lower profile part, the 9 layers analysed (depths: 190–325 cm) are mostly clays and, as mentioned above, the 190–280-cm deep layers contain fragments of ceramics from the Neolithic era.

Some physicochemical and enzymological data were excluded from the correlation analysis. They are the following: base saturation, because its values were practically the same in all layers; available phosphorus content and 24-hour actual and potential dehydrogenase activities, whose values in the soil layers were extremely low or lacking. In addition, the 72-hour actual dehydrogenase activity was also excluded from the correlation analysis of the middle and lower parts of the profile as this activity was extremely low or lacking in most layers of these two profile parts.

Results. 1. The whole buried soil profile. Results of the correlation analysis considering the whole buried soil profile are presented in Table 1.

Depth dependence. The correlation coefficients and their significance make possible a more accurate evaluation of the depth dependence of the physicochemical and enzymological properties than did their global examination in [1]. Thus, pH, CEC, humus content and nonenzymatic catalytic activity tended to increase with increasing soil depth, but the increase was significant (at >95%) only in the case of CEC. Values of the other properties decreased with depth, the decrease being significant with K_2O and total N contents and with phosphatase, actual and potential dehydrogenase activities.

Correlations between different physicochemical properties. pH correlated significantly and positively only with the $CaCO_3$ content and negatively with the K_2O and humus contents. The $CaCO_3$ content, besides its significant positive correlation with pH, correlated significantly and negatively with the humus content. There were no significant correlation between CEC and the other physicochemical properties. The K_2O content correlated significantly and negatively with pH as stated above, and it also gave significant but positive correlations with the humus and total N contents. As already shown, the humus content correlated significantly and negatively with pH and $CaCO_3$ content and positively with the K_2O content, whereas the total N content gave significant positive correlation only with the K_2O content.

Correlations between enzymological and physicochemical properties. There were significant positive correlations between phosphatase activity (PA) and K_2O and total N contents. The enzymatic (catalase) and nonenzymatic catalytic activities (ECA and NCA) correlated significantly only with the humus content, the significance being negative with ECA and positive with NCA. Significant positive correlations were registered between actual and potential dehydrogenase activities (ADA and PDA) and the K_2O content. PDA also correlated significantly and positively with the total N content.

Correlations between different enzymological properties. There were significant positive correlations between PA and both ADA and PDA as

Table 1

Correlation matrix of the physicochemical and enzymological properties of the whole buried soil profile

(depths: 0-325 cm; n = 22)

	Depth	pH	CaCO ₃	CEC	K ₂ O	Humus	Total N	FA	ECA	NCA	ADA	PDA
Depth	1											
pH	0.108	1										
CaCO ₃	-0.334	0.724*	1									
CEC	0.459*	0.155	-0.035	1								
K ₂ O	-0.687*	-0.528*	-0.121	-0.356	1							
Humus	0.137	0.812*	-0.691*	0.071	0.458*	1						
Total N	-0.486*	-0.383	-0.140	-0.038	0.643*	0.052	1					
PA	-0.678*	-0.109	0.069	-0.313	0.438*	0.477*	0.477*	1				
ECA	-0.318	0.202	0.235	-0.025	0.047	-0.434*	-0.230	-0.046	1			
NCA	0.225	-0.220	-0.196	-0.008	0.051	0.471*	0.308	0.114	-0.960*	1		
ADA	-0.599*	-0.017	-0.009	-0.282	0.462*	-0.080	0.263	0.549*	0.283	-0.203	1	
PDA	-0.667*	-0.169	0.013	-0.349	0.599*	0.080	0.610*	0.625*	0.003	0.047	0.628*	1

CEC -- Cation-exchange capacity, FA -- Phosphatase activity, ECA -- Enzymatic catalytic (catalase) activity, NCA -- Nonenzymatic catalytic activity, ADA -- Actual dehydrogenase activity, PDA -- Potential dehydrogenase activity. The asterisks indicate significance at > 95%.

Table 2

Correlation matrix of the physicochemical and enzymological properties of the upper part of the buried soil profile
(depths: 0-70 cm; n = 5)

	Depth	pH	CaCO ₃	CEC	K ₂ O	Humus	Total N	PA	ECA	NCA	ADA	PDA
Depth	1											
pH	0.864	1										
CaCO ₃	0.659	0.828	1									
CEC	-0.385	-0.271	-0.593	1								
K ₂ O	-0.936*	-0.974*	-0.847	0.370	1							
Humus	-0.767	-0.985*	-0.845	0.246	0.929*	1						
Total N	-0.719	-0.863	-0.966*	0.419	0.894*	0.862	1					
PA	-0.381	-0.756	-0.865	0.183	0.681	0.837	0.867	1				
ECA	0.050	0.486	0.396	0.452	-0.344	-0.586	-0.490	-0.791	1			
NCA	-0.029	-0.467	-0.386	-0.457	0.324	0.569	0.479	0.786	-0.999*	1		
ADA	0.147	0.321	-0.157	0.379	-0.149	-0.354	0.166	-0.047	0.302	-0.291	1	
PDA	-0.676	-0.547	-0.566	0.111	0.681	0.458	0.733	0.407	-0.225	0.215	0.430	1

See Table 1 for abbreviations.

well as between ADA and PDA. The correlation between ECA and NCA was significant and negative.

2. The upper part of the buried soil profile (Table 2).

Depth dependence. Values of the physicochemical properties, excepting those of pH and CaCO_3 content, decreased with increasing soil depth, but the decrease was significant only in the case of the K_2O content. PA and PDA also tended to decrease with depth; however, the decrease was not significant.

Correlations between different physicochemical properties. pH correlated significantly and negatively with the K_2O and humus contents. A similar correlation was found between CaCO_3 and total N contents. CEC gave no significant correlation with any other properties, while the significant correlation of the K_2O content was, as stated above, negative with pH, but it was positive with the humus and total N contents. We mention again the significant negative correlation between humus content and pH and the positive one between humus and K_2O contents, and also the significant negative correlation between total N and CaCO_3 contents and the positive one between total N and K_2O contents.

Correlations between enzymological and physicochemical properties. No significant correlations were registered between these properties.

Correlations between different enzymological properties. A single significant, negative correlation was found, namely that between ECA and NCA.

3. The middle part of the buried soil profile (Table 3).

Depth dependence. pH, CaCO_3 content and CEC increased, while the other properties decreased with increasing soil depth. The increase was significant with pH and CaCO_3 content, and the decrease was significant only with the K_2O and humus contents.

Correlations between different physicochemical properties. pH correlated significantly and positively with the CaCO_3 content and negatively with the K_2O and humus contents. The CaCO_3 content correlated significantly only with pH. Again, CEC exhibited no significant correlation with any other properties. The significant negative correlation between K_2O and pH, and that between humus content and pH should be reiterated. At the same time, the correlation between K_2O and humus contents was significant and positive.

Correlations between enzymological and physicochemical properties. No significant correlation was registered between these properties.

Correlations between different enzymological properties. The significant negative correlation between ECA and NCA was the only significant correlation found.

4. The lower part of the buried soil profile (Table 4).

Depth dependence. Excepting pH and NCA, the soil properties exhibited a decreasing trend with depth, but the decrease was significant only with the K_2O and humus contents.

Table 3

Correlation matrix of the physicochemical and enzymological properties of the middle part of the buried soil profile
(depths: 70--190 cm; n = 8)

	Depth	pH	CaCO ₂	CEC	K ₂ O	Humus	Total N	PA	ECA	NCA	ADA	PDA
Depth	1											
pH	0.768*	1										
CaCO ₂	0.893*	0.911*	1									
CEC	0.586	0.568	0.555	1								
K ₂ O	-0.764*	-0.726*	-0.607	-0.576	1							
Humus	-0.833*	-0.768*	-0.678	-0.471	0.956*	1						
Total N	-0.338	0.054	-0.056	0.028	0.154	0.290	1					
PA	-0.450	0.061	-0.255	-0.095	0.006	0.085	0.545	1				
ECA	-0.022	-0.215	-0.319	-0.186	-0.277	-0.253	-0.621	-0.266	1			
NCA	-0.108	0.048	0.188	0.117	0.386	0.422	0.672	0.243	-0.954*	1		
ADA	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1	
PDA	-0.592	-0.090	-0.257	-0.240	0.593	0.529	0.333	0.538	-0.418	0.350	---	1

See Table 1 for abbreviations.

Table 4

Correlation matrix of the physicochemical and enzymological properties of the lower part of the buried soil profile
(depths: 190–352 cm; n = 9)

	Depth	pH	CaCO ₃	CEC	K ₂ O	Humus	Total N	PA	ECA	NCA	ADA	PDA
Depth	1											
pH	0.522	1										
CaCO ₃	-0.260	0.574	1									
CEC	-0.095	0.453	0.467	1								
K ₂ O	-0.936*	-0.672*	0.037	-0.211	1							
Humus	-0.797*	-0.667*	0.082	0.008	0.694*	1						
Total N	-0.605	-0.397	-0.156	-0.169	0.679*	0.290	1					
PA	-0.264	-0.558	-0.132	-0.063	0.221	0.649	-0.198	1				
ECA	-0.408	-0.618	-0.295	-0.373	0.447	0.639	0.307	0.103	1			
NCA	0.370	0.406	0.095	0.303	-0.384	-0.519	-0.259	0.118	-0.957*	1		
ADA	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	
PDA	-0.320	-0.307	-0.190	-0.062	0.288	0.354	0.675*	0.182	0.228	-0.100	—	1

See Table 1 for abbreviations.

Correlations between different physicochemical properties. Significant negative correlations were registered between pH and K_2O content and between pH and humus content. The $CaCO_3$ content and CEC did not correlate significantly with any other properties. As already mentioned, the correlation between K_2O content and pH was significant and negative, but the K_2O content gave significant positive correlations with the humus and total N contents. The humus content correlated significantly with pH (negatively) and K_2O content (positively). The total N content showed a single significant, positive correlation, namely that with the K_2O content.

Correlations between enzymological and physicochemical properties. A single significant, positive correlation was registered, namely that between PDA and total N content.

Correlations between different enzymological properties. The only significant and negative correlation was again that between ECA and NCA.

5. *Comparison of the whole buried soil profile (Table 1) with its parts (Tables 2—4).* For this comparison, ADA could not be considered because, as already mentioned, this activity was extremely low or lacking in most layers of the middle and lower profile parts.

Depth dependence. Some properties behaved similarly in the whole profile and in its three parts. Thus, pH increased, K_2O and total N contents, PA and PDA decreased with increasing soil depth. But the depth dependence of the other properties was contrary, at least in one of the profile parts, to that of the whole profile, which supports the separation of three parts within the soil profile. Thus, the $CaCO_3$ content increased within the upper and middle profile parts and decreased in the lower part, whereas it showed a decreasing trend with increasing soil depth when the whole profile was considered. CEC decreased depth-dependently in the upper and lower profile parts and increased in the middle part and in the whole profile. Within each profile part, the humus content decreased, but in the whole profile it exhibited a slight increasing trend with increasing soil depth. ECA increased with depth within the upper profile part and decreased within the other two parts and in the whole profile. At the same time, NCA decreased with depth within the upper and middle profile parts and increased in the lower part and in the whole profile.

Correlations between different physicochemical properties. Some correlations were positive (pH- $CaCO_3$, K_2O -humus, K_2O -total N, humus-total N) or negative (pH- K_2O , pH-humus, $CaCO_3$ -total N) in each profile part as in the whole profile. The other correlations gave positive (or negative) values at least in one of the profile parts and negative (or positive) values in the whole profile.

Correlations between enzymological and physicochemical properties. The correlations were always positive between PA and K_2O and humus contents, between PDA and K_2O , humus and total N contents, and al-

ways negative between PDA and pH. The other correlations had a different sense, at least in one profile part, than in the whole profile.

Correlations between different enzymological properties. The correlations PA-NCA and PA-PDA were always positive and that between ECA and NCA was always negative. Again the other correlations were positive (or negative) at least in one profile part and negative (or positive) in the whole profile.

The correlations having the other sense, at least in one profile part, than in the whole profile also support the separability of the three parts within the profile.

Conclusions. 1. Correlation analysis of the physicochemical and enzymological properties in the buried soil profile studied confirmed the texture-based separation of three parts within the profile. The first, upper part comprises the youngest soil layers, whereas the third, lower part consists of the oldest soil layers.

2. Some properties, however, behaved similarly in all profile parts and in the whole profile. Thus, pH increased, K_2O and total N contents, PA and PDA decreased with increasing soil depth. There were many positive correlations (pH- $CaCO_3$, K_2O -humus, K_2O -total N, humus-total N, PA- K_2O , PA-humus, PDA- K_2O , PDA-humus, PDA-total N, PA-NCA, PA-PDA) as well as negative ones (pH- K_2O , pH-humus, $CaCO_3$ -total N, PDA-pH, ECA-NCA).

REFERENCES

1. Manolache, E., Simihăian, M., Piciu, T., Kiss, S., *Study of some physicochemical and enzymological properties of a buried soil (Part 1)*, „Stud. Univ. Babeş-Bolyai, Biol.“, 39 (2), 1994, 121—128.

RESEARCH ON ENZYMES CATALYSING THE SYNTHESIS AND HYDROLYSIS OF LEVANS AND DEXTRANS IN SALT LAKE SEDIMENTS

VASILE MUNTEAN*

SUMMARY. — The presence in an accumulated form of the enzymes levansucrase, dextransucrase, levanase and dextranase in two salt lake sediments has been demonstrated. The Privighetorii (Turda) and Băile (Cojocna) (Cluj county) salt lake sediments have been studied. The enzymatic activities were analysed qualitatively and quantitatively. Both analyses have indicated the existence of detectable differences between the two studied sediments concerning the intensity of the enzymatic activity. All the activities were more intense in the sediment of the Privighetorii lake. In this sediment, a weak preponderance of the levan- and dextran-synthesising activities has also been ascertained in comparison with activities leading to hydrolysis of these polysaccharides.

Levans are branched polymers of fructose. In the linear chains the β -fructofuranose residues are linked by β -2,6 linkages; the branch linkages are of type β -2,1. Levan synthesis from sucrose is catalysed by the transferase levansucrase (E.C. 2.4.1.10). Hydrolytic decomposition of levan is catalysed by the polysaccharidase levanase (E.C. 3.2.1.65).

Dextrans are branched polymers of glucose, consisting of α -glucose residues bound to each other by 1,6 linkages; the branched linkages are of type α -1,4, α -1,3 and α -1,2. Dextran synthesis from sucrose is catalysed by the transferase dextransucrase (E.C. 2.4.1.5). Dextran hydrolysis is catalysed by the polysaccharidase dextranase (E.C. 3.2.1.11).

The microorganisms are the main producers of these 4 enzymes [1]. The presence of these enzymes in soil was registered [1-3, 6, 7]. We have no data to attest their presence in an accumulated form in sediments.

For the salt lake sediments, used as therapeutic muds in balneotherapy, levans and dextrans have a great importance. These polysaccharides confer to the therapeutic muds a high level of onctuousity, a characteristic which increases the therapeutic value of the muds. This fact justifies the interest for studying the enzymes which synthesise or hydrolyse the two polysaccharides in salt lake sediments.

Material and methods. The methods of the cited authors have been applied in order to demonstrate the presence of the 4 enzymes in an accumulated form in the two studied salt lake sediments. The methods have been adapted to the particular conditions, first of all to the high salinity of the studied sediments. For measurement of the levansucrase and dextransucrase activities, the sediments have not been submitted to a special treatment, because the polysaccharides

* Institute of Biological Research, 3400 Cluj, Romania

synthesised by the two enzymes were precipitated with ethyl alcohol, thus preventing the negative effect of a high salt concentration on the accuracy of chromatographic analyses.

Preliminary tests have demonstrated the impossibility of chromatographic revelation of reducing sugars, because of the high concentrations of salts, which interfered with their reaction with AgNO_3 . Revelation of ketoses with the urea-*o*-phosphoric acid reagent was also strongly disturbed by the presence of a high salt concentration. That is why, for assessing levansucrase and dextransucrase activities, the sediments were submitted to a desalinisation procedure by keeping them in a cellophane folio in distilled water for a few days. The degree of desalinisation was measured with AgNO_3 , which gives a white precipitate in the presence of NaCl . When the precipitate did not appear any more in the distilled water from the experimental vessel in which the desalinisation was carried out, i.e. when the NaCl present in sediment was exhausted, we started the experiment for studying the two polysaccharidases.

The reaction mixtures were prepared from centrifuged sediment (30 minutes at 4,000 rotations/minute). The reaction mixture compositions are presented in Tables 1-3. We used the following enzymatic substrates: sucrose from Chemapol, levan obtained by a prescript from literature [7], and dextran from Fluka AG, with a $\sim 40,000$ Da molecular mass.

The reaction mixtures were incubated at 37°C for 10 days, with daily stirring. After the incubation period the mixtures were centrifuged (30 minutes at 8,000 rotations/minute). The supernatant was filtered, and the filtrate was analysed qualitatively for different saccharides by means of paper chromatography, circular technique, and quantitatively for reducing sugars with the Somogyi-Nelson method [8, 9].

For proving the presence of levansucrase and dextransucrase activities in the reaction mixtures which initially contained sucrose as substrate, the possible synthesised polysaccharides were precipitated with absolute ethyl alcohol, in a ratio of 1/5 supernatant/alcohol (vol./vol.). After centrifugation (30 minutes at 10,000 rotations/minute), the sediment was dissolved in 3 ml of distilled water. Two recurrent precipitations with ethanol followed, in order to remove mono- and oligosaccharides (sucrose from the initial reaction mixture and other saccharides resulted from the activities of the enzymes present in sediments). After the

Table 1

Composition of reaction mixtures for measuring levansucrase and dextransucrase activities

Reaction mixture	Lake	Sediment (g)	Toluene (ml)	10% sucrose solution (ml)	Distilled H_2O (ml)
1	Privighetorii	10	3	30	—
2		10	3	—	30
3	Băile	10	3	30	—
4		10	3	—	30
5	—	—	3	30	—

Table 2

Composition of reaction mixtures for measuring levanase activity

Reaction mixture	Lake	Sediment (g)	Toluene (ml)	0.25% levan solution (ml)	Distilled H ₂ O (ml)
1	Privighetorii	10	3	30	—
2		10	3	—	30
3	Baile	10	3	30	—
4		10	3	—	30
5	—	—	3	30	—

Table 3

Composition of reaction mixtures for measuring dextranase activity

Reaction mixture	Lake	Sediment (g)	Toluene (ml)	1% dextran solution (ml)	Distilled H ₂ O (ml)
1	Privighetorii	10	3	30	—
2		10	3	—	30
3	Baile	10	3	30	—
4		10	3	—	30
5	—	—	3	30	—

last centrifugation, the sediment was washed three times with ethyl alcohol and once with ethyl ether. After the evaporation of the alcohol and ether residues, the precipitates were dissolved in 3 ml of distilled water and were examined chromatographically.

Demonstration of the presence of dextranase in a sample is difficult because there is no specific staining reaction for dextran. On the other hand, sucrose, the enzyme substrate, can also be the substrate of other enzymes (levanase, invertase), so that the identification of the reaction products is also more difficult. It needs a very laborious method [1].

To evidence the dextran, the levan from the solution of the last centrifuged sediment must be removed. For this, a part of the total polysaccharide solution,

obtained after the third centrifugation, was mixed with an equal amount of a 1% oxalic acid solution. The mixture was boiled in a water bath one hour and a half [4]. The levan present in solution was hydrolysed, but the dextran was not, as the control samples proved. The remaining dextran was precipitated three times with ethyl alcohol, according to the technique already described. After the first centrifugation, the quantity of the fructose obtained by oxalic acid hydrolysis of levan was measured in the supernatant liquid by the Somogyi-Nelson method [8, 9].

Because there is no method for direct evidentialtion of dextran, it was indirectly assessed by demonstrating the presence of glucose in the acid (H_2SO_4) hydrolysate of the dextran solution. The remaining polysaccharide fraction was submitted to hydrolysis with H_2SO_4 . The hydrolysis was carried out in equal amounts of polysaccharide solution and 6N H_2SO_4 , in vials hermetically closed by melting. The acid hydrolysis was carried out by boiling in a water bath for two hours. After boiling, the hydrolysates were neutralised with $Ba(OH)_2 \cdot 8H_2O$. The $BaSO_4$ formed was removed by centrifugation (30 minutes at 3,000 rotations/minute). The chromatographic analyses and the quantitative measurement of the glucose resulting from the dextran hydrolysis were carried out on the supernatant liquid.

For evidentialtion of levansucrase and dextranase activities, the supernatants of the reaction mixtures mentioned in Tables 2 and 3 were analysed chromatographically. For quantitative measurements, the nonhydrolysed amounts of levan and dextran were once precipitated with ethyl alcohol. After centrifugation, the supernatants were analysed for quantitative determination of fructose and glucose, respectively, which resulted from the enzymatic hydrolysis of substrates, levan and dextran, respectively.

For the qualitative analyses we used Whatman 1 chromatographic paper; volume of the analysed filtrate: 100 μ l; solvent system: n -propanol-ethyl acetate-water 6:1:3 (vol./vol.vol.); development: 2 h at room temperature. The chromatograms were differentially revealed for evidentialtion of the levansucrase and levansucrase activities on one hand, and of the dextransucrase and dextranase activities, on the other.

For proving the presence of levansucrase and levansucrase, a reagent containing urea and *o*-phosphoric acid, which specifically stains ketoses, free (fructose) and combined (levan) was used [10]. The developed and dried chromatograms were sprayed with this reagent and then heated at 100–110°C until the blue spots of ketoses appeared.

For detection of the presence of dextransucrase and dextranase, respectively, the developed and dried chromatograms were revealed using a reagent containing $AgNO_3$, which specifically reveals reducing sugars, including glucose or intermediate products of the dextran hydrolysis [11].

Levansucrase and levansucrase activities are expressed in mg fructose/10 g sediment dry matter/10-day incubation at 37°C. The dextransucrase and dextranase activities are expressed in mg glucose/10 g sediment dry matter/10-day incubation at 37°C.

Results and discussion. The results of qualitative analyses of levansucrase activity are presented in Fig. 1. The levan spots at the starting point both in the reaction mixture with sediment from Privighetorii and Băile lakes can be seen. The lack of levan spot in the reaction mixture without sucrose demonstrates that the spots are not caused by the polysaccharides possibly present in the sediment. The absence of the spot in the reaction mixture with sucrose, but without sediment shows that the levan synthesis occurred only in the presence of sediments, i.e. of the levansucrase accumulated in sediments.

Fig. 2 represents the chromatogram obtained after levan hydrolysis with oxalic acid and revealed by means of the urea-*o*-phosphoric acid

Fig. 1 Results of levansucrase activity analysis.

Revelation with the urea-o-phosphoric acid reagent. Reaction mixtures 1-5: see Table 1. Control solutions: 6- Levan 0.25%; 7-- Fructose 1%.

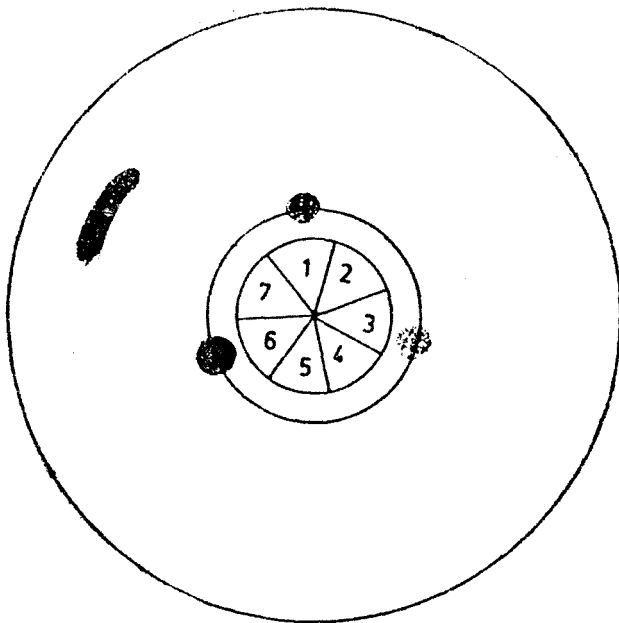
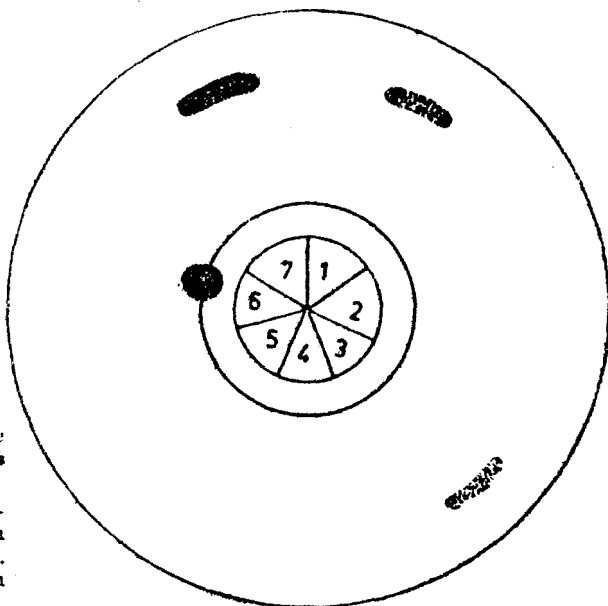


Fig. 2. Demonstration of the complete hydrolysis of levan with oxalic acid.

Revelation with the urea-o-phosphoric acid reagent. Reaction mixtures 1-5: see Table 1. Control solutions: 6 - Levan 0.25%; 7 - Fructose 1%.



reagent. One can see that the hydrolysis was complete, the levan missing at the starting point in both sediments. The only hydrolytic product found was fructose.

A chromatogram with the products of levan hydrolysis was revealed by means of the AgNO_3 reagent, and it is presented in Fig. 3. As one can see even in this case, fructose is the only hydrolytic product detected. The absence of any spot at point 6 (1% dextran solution submitted to the treatment with oxalic acid) demonstrates that the dextran was not hydrolysed during that treatment.

Fig. 4 represents the chromatogram obtained from the solutions of the alcohol-precipitated polysaccharides after the treatment with oxalic acid. The spots of reducing sugars are entirely absent. This means that the precipitation with alcohol entirely removed them from the solution obtained after the treatment with oxalic acid.

As was earlier specified, the polysaccharides remaining after the oxalic acid hydrolysis were precipitated with alcohol and then submitted to H_2SO_4 hydrolysis. The chromatogram with the results of this hydrolysis is presented in Fig. 5. The spots at points 1 and 3 are caused by the glucose which resulted from the dextran hydrolysis with H_2SO_4 . The absence of spots in Fig. 4 demonstrates that the spots in Fig. 5 are caused by glucose molecules resulting from hydrolysis of the dextran that had been synthesised from sucrose during the incubation period. The synthetic reaction was catalysed by the accumulated dextransucrase present in the sediments studied.

The results of the qualitative analyses of levanase activity are presented in Fig. 6. The chromatogram shows a diminution of the intensity of the levan spots in the active reaction mixtures (1 and 3). It is doubled by the appearance of fructose spots in these samples. This demonstrates the presence of accumulated levanase in both sediments studied. The levanase hydrolysed the levan with the formation of fructose as the only hydrolytic product.

Fig. 7 represents the chromatogram which demonstrates the presence of the accumulated dextransucrase in the two studied sediments. Glucose is the only hydrolytic product in the active reaction mixtures (1 and 3). The absence of any spot at point 5 (1% dextran solution) demonstrates that the dextran used in the experiment was pure; it did not contain reducing sugars. Thus, the glucose, which gave the spots in points 1 and 3, resulted from the enzymatic hydrolysis of dextran under the action of dextransucrase present in both sediments.

The results of quantitative measurements of the studied enzymatic activities are presented in Table 4. The quantities of levan and dextran synthesized from sucrose by levansucrase and dextransucrase present in sediments, as well as the quantities of the fructose and glucose resulted from the levan and dextran hydrolysis by levanase and dextransucrase, respectively, are of 1—2 mg fructose (glucose)/10 g sediment dry matter/10-day incubation at 37°C .

Fig. 3. Demonstration of the reducing properties of the products resulting from hydrolysis of levan with oxalic acid.

Revelation with the AgNO_3 reagent. Reaction mixtures 1-5; see Table 1. Control solutions: 6-Dextran 1% submitted to the treatment with oxalic acid; 7-Fructose 1%.

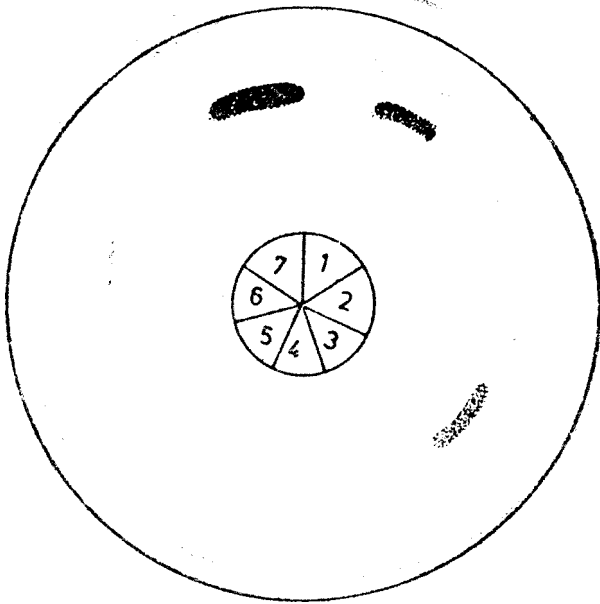
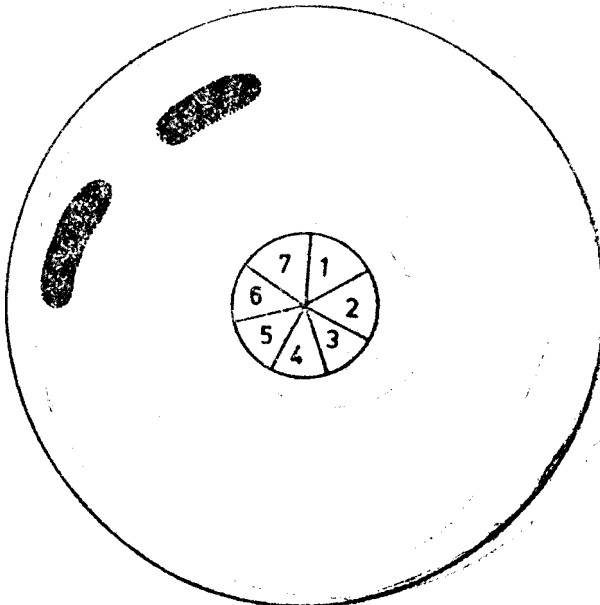


Fig. 4. Demonstration of the absence of reducing sugars in solutions of residual polysaccharides precipitated with ethyl alcohol, after hydrolysis of levan with oxalic acid.

Revelation with the AgNO_3 reagent. Reaction mixtures 1-5; see Table 1. Control solutions: 6-Fructose 1%; 7-Glucose 1%.



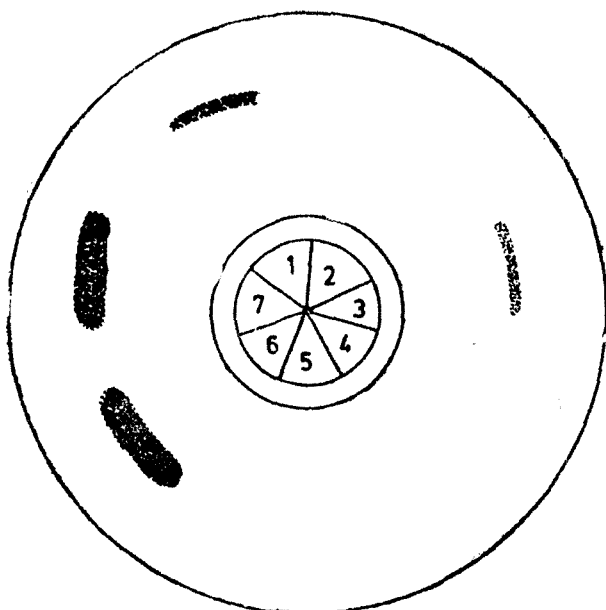


Fig. 5. Results of dextranase activity analysis. Demonstration of the presence of glucose as the only product obtained after the H_2SO_4 hydrolysis of the residual polysaccharide fraction.

Revelation with the $AgNO_3$ reagent. Explanations: see Fig. 4.

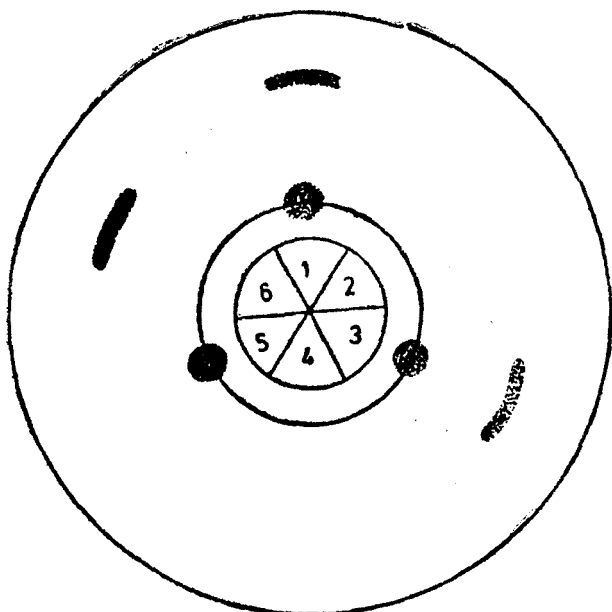


Fig. 6. Results of levanase activity analysis.

Revelation with the urea-phosphoric acid reagent. Reaction mixtures 1--5: see Table 2. Control solution: 6--Fructose 1%.

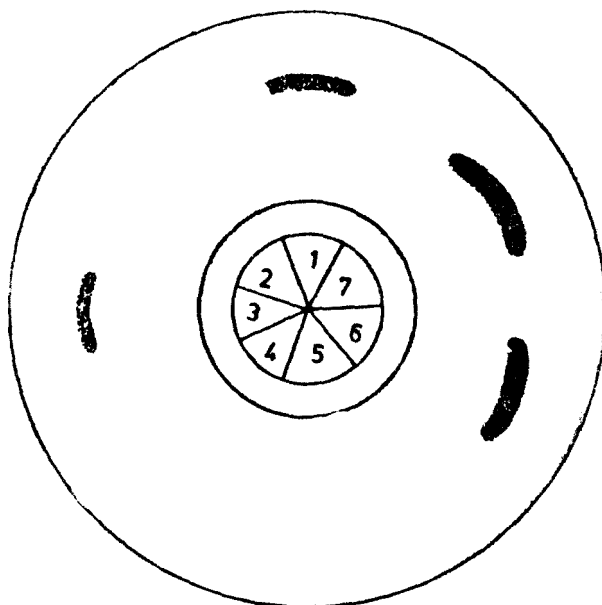


Fig. 7. Results of dextranase activity analysis. Revelation with the AgNO_3 reagent. Reaction mixtures 1-5: see Table 3. Control solutions: 6-Glucose 1%; 7-Fructose 1%.

The results of quantitative measurements confirm those of the qualitative ones. It is obvious that all the 4 activities are more intense in the sediment of the Privighetorii lake. In the Băile lake sediment, the intensity of synthetic and hydrolytic activities is very close (1.036 mg glucose/10 g sediment for dextranase and 1.062 mg glucose/10 g sediment for levansucrase) or even identical (1.336 mg fructose/10 g sediment for levansucrase and levanase).

In the Privighetorii lake sediment, for both levan and dextran, the ratio between synthetic (levansucrase and dextranase) and hydrolytic (levanase and dextranase) activities is always higher than 1. Be-

Table 4

Results of the quantitative measurement of the 4 enzymatic activities

Lake	Activity (mg monosaccharide/10 g sediment)			
	Levansucrase	Dextranase	Levanase	Dextranase
Privighetorii	1.859	1.355	1.401	1.118
Băile	1.336	1.036	1.336	1.062

cause of the importance of the two polysaccharides in the formation of mud onctuousity, a parameter which enhances the therapeutic properties of the sediments, we can appreciate that from this point of view the Privighetorii lake sediment is superior to that of the Băile lake.

Conclusions. 1. The presence of the 4 enzymes catalysing the synthesis and hydrolysis of levans and dextrans (levansucrase, dextransucrase, levanase and dextranase) in an accumulated form in the salt lake Privighetorii (Turda) and Băile (Cojocna) sediments has been demonstrated. According to the available data, the present report is the first one on the presence of these 4 enzymes in an accumulated form in sediments.

2. The Somogyi-Nelson method for quantitative measurement of reducing sugars has been proved to be applicable for the evaluation of the activity of the 4 studied enzymes in salt lake sediments. The quantitative data obtained by means of this method confirmed the results of chromatographic analysis.

3. Intensity of the 4 enzyme activities is of 1—2 mg fructose (glucose)/10 g sediment dry matter/10-day incubation at 37°C. In the Băile lake sediment, there were no significant differences found between the levan- and dextran-synthesising (levansucrase and dextransucrase) and hydrolysing (levanase and dextranase) activities. In the Privighetorii lake sediment, the synthetic activities were more intense than the hydrolytic ones. The superiority of the Privighetorii lake sediment, as compared to that of the Băile lake, can be stated based on the importance of levans and dextrans in the formation of a high level of onctuousity, which enhances the therapeutic qualities of lake sediments used in balneotherapy.

REFERENCES

1. Drăgan-Bularda, M., *Studii asupra unor polizaharide și transferaze din sol*, Teză Dr., Univ. Babeș-Bolyai, Cluj, 1974.
2. Drăgan-Bularda, M., Kiss, S., *Occurrence of dextransucrase in soil*, „Third Symp. Soil Biol.” (Bucharest), 1972, 119—128.
3. Drăgan-Bularda, M., Kiss, S., *Dextranase activity in soil*, „Soil Biol. Biochem.”, 4, 1972, 413—416.
4. Hestrin, S., Avineri-Shapiro, S., Aschner, M., *The enzymic production of levan*, „Biochem. J.”, 37, 1943, 450—456.
5. Kiss, S., *Über die Anwesenheit von Lävansucrase im Bodeu*, „Naturwissenschaften”, 48, 1961, 700.
6. Kiss, S., Boaru, M., Constantinescu, L., *Levanase activity in soil*, „Symp. Methods Soil Biol.” (Bucharest), 1965, 129—136.
7. Kiss, S., Drăgan-Bularda, M., *Polizaharidazele din sol*, „Contrib. Bot.” (Cluj), 1972, 377—384.
8. Nelson, N., *A photometric adaptation of the Somogyi method for determination of glucose*, „J. Biol. Chem.”, 153, 1944, 375—376.

9. Somogyi, M., *Notes on sugar determination*, „J. Biol. Chem.“, **195**, 1952, 19—23.
10. 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.
11. Wright, S. W., Ulström, R. A., Szewczak, J. T., *Studies of carbohydrates in body fluids. I. Identification by means of paper chromatography*, „Am. Med. Assoc. J., Diseases Children“, **93**, 1957, 173—181.

BIBLIOGRAPHY OF ENVIRONMENTAL ENZYMOLOGY IN ROMANIA. II

ŞTEFAN KISS*, MIHAIL DRĂGAN-BULARDA* and DANIELA PAŞCA**

The first Bibliography of Environmental Enzymology in Romania was published in the volume „Fifth Symposium on Soil Biology (Iaşi, 1981)“ (Romanian National Society of Soil Science, Bucharest, 1984, pp. 183—207). The papers appeared after the publication of this volume and those not included in the first Bibliography are listed in the present Bibliography.

Bibliography II is regarded as a continuation of the first Bibliography. Therefore, *a*) as in the first Bibliography, the papers are grouped into 8 chapters; *b*) the papers are numbered in continuation of the last paper from the first Bibliography (paper 234); and *c*) as in the first Bibliography, diploma theses, doctoral dissertations, abstracts and summaries of papers, unpublished contractors' reports and papers under press are not included; if a paper covers topics belonging to two or more chapters, it is specified only in one chapter but it is also referred to, by its number, in the other chapter(s).

1. SOIL ENZYMOLOGY

235. ANTOHE A., BULIMAR F., CĂLUGAR M., CHIFU T., DAVIDESCU G., HUŢU M., MURARIU A., PISICĂ A., RUSAN M., VIŢALARIU C., VASILIU N. Efectele lucrărilor complexe de desecare și amenajare asupra ecosistemului de pajiște naturală din lunca Prutului (*Effects of the complex draining and management works on the natural meadow ecosystem in the Prut flood plain*), Ziridava (Arad), 1988, 17, 99—107.
236. BLAGA G., BUNESCU V., NASTEA S., FILIP F., DUMITRU M. Proprietățile fizice, chimice și biologice ale materialului de haldă rezultat prin degradarea solurilor de pe versanți (Exploatarea minieră Căpuș-jud. Cluj) (*Physical, chemical and biological properties of spoil heap materials resulting from degradation of soils on slopes (The Căpuș Mining Enterprise — Cluj district)*), Simp. „Exploatarea intensivă a terenurilor agricole în pantă“ (Cluj, 1979), Inst. Agron., Cluj, 1979, pp. 87—94.
237. BLAGA G., NASTEA S., RĂUȚĂ C., BUNESCU V., MICLAUȘ V., DOBAI R. Izuchenie fizicheskikh i khimicheskikh svoistv antropogennogo pro-

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

** Biological Research Institute, 3400 Cluj, Romania

- tosola (materialov otvala, nivelirovannykh v tselyakh rekul'tivatsii) (*Study of the physical and chemical properties of an anthropogenic protosol (spoil heap materials levelled with the aim of recultivation)*), Sb. Dokl., 8 Mezhdunar. Simp. „Razrabotka sposobov rekul'tivatsii landshaftov, narushennykh promyshlennoi deyatel'nost'yu“ (București—Craiova—Tg. Jiu, 1984), 1984, pp. 169—176.
238. BLAGA G., NASTEA S., MIHALYI M., DUMITRU M., BUNESCU V., Issledovaniya v svyazi s rekul'tivatsiei sel'skokhozyaistvennykh zemel', narushennykh otkrytymi razrabotkami zheleznoi rudi (*Investigations related to recultivation of agricultural soils disturbed by strip mining of iron ore*), Sb. Dokl., 9 Mezhdunar. Simp. „Rekul'tivatsiya landshaftov, narushennykh promyshlennoi deyatel'nost'yu“ (Kompolt—Gyöngyös, 1988), 1988, 1, 213—220.
239. BLAGA G., BUNESCU H., ȘTEFANESCU L., GUÉRON I., BLAGA L., IECHEȘTAN T., SPINU M., Îmbunătățirea fertilității protosolului antropic de la Căpuș (jud. Cluj) prin utilizarea nămolului orășenesc provenit de la stația de epurare a municipiului Cluj-Napoca (*Improving the fertility of the anthropic protosol in Căpuș (Cluj district) by using municipal sludge from the wastewater treatment plant of the city of Cluj-Napoca*), Bul. Inst. Agron. Cluj, Ser. Agric. Hort., 1981, 45 (1), 93—99.
240. BORLAN Z., HERA C., Optimizarea agrochimică a sistemului sol-plantă (*Agrochemical Optimisation of the Soil-Plant System*), Ed. Acad. Rom., București, 1984, pp. 244—245.
241. BUDOI G., PETCU N., POP M., ȘERBAN V., ZELINSCHI C., PETRE N., DANCAU H., VAGO D., MIHALACHE G., Cercetări privind influența fertilizării de lungă durată, în staționar, asupra unor însușiri chimice și biologice ale solului brun eumezobazic rendzinic litic și asupra productivității pajistii permanente de la Dealul Sasului — Argeș (*Researches on the influence of long-term fertilisation in stationary on some chemical and biological properties of the brown eumezobasic rendzinic lithic soil and on the productivity of the permanent meadow in Dealul Sasului — Argeș*), Lucr. Conf. Naț. Știința Solului (Pitești, 1988), Publ. Soc. Naț. Rom. Știința Solului, București, 1989, No. 26B, 1—10.
242. CALANCEA L., O nouă clasificare a fertilizantilor cu azot (*A new classification of nitrogen fertilisers*), Bul. Inst. Agron. Cluj, Ser. Agric. Hort., 1990, 44 (1), 69—72.
243. CALANCEA L., Effect of dicyandiamide on the efficiency of fertilizer urea applied to soils sown with *Lolium multiflorum*, Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Biol., 1992, 37 (1), 93—99.
244. CALANCEA L., Efectul ureei și al formiatului de uree asupra absorbției azotului de către *Lolium multiflorum* (*The effect of urea and urea formate on nitrogen uptake by Lolium multiflorum*), Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Biol., 1993, 38 (1—2), 125—129.

245. CALANCEA L., CHIRIAC M., *Utilization by maize of phosphonitrilic hexamide labelled with ^{15}N at cyclic and at amino positions*, Isotopenpraxis Environ. Health Stud., 1993, **29**, 357—364.
246. CALANCEA L., CHIRIAC M., *Comparison of the efficiencies of urea nitrogen and phosphoryl triamide for *Lolium multiflorum* and their influence on the soil nitrogen reserve*, Isotopes Environ. Health Stud., 1996, **32**, 79—86.
247. CALANCEA L., BOLOGA M., FIRU V., *Use of ^{15}N urea in the study of the effect of soil urease inhibitors*, ESNA (Eur. Soc. Nucl. Agric.) Newslett., 1977. (15 Nov.), 63—70.
248. CALANCEA L., FIRU V., BOLOGA M., *Efectul inhibitorilor nitrificării și ureazei asupra eficienței ureei și a glicolurilului ca fertilizant (Effect of nitrification and urease inhibitors on efficiency of urea and of glycoluril as a fertiliser)*, in: Separarea și utilizarea izotopilor (*Separation and Utilisation of Isotopes*), Inst. Tehnol. Isotop. Molec., Cluj, 1982, pp. 354—356.
249. CALANCEA L., BOLOGA M., CHIRIAC M., FIRU V., *Utilizarea hexamidei fosfonitrilice ca fertilizant în agricultură (Utilisation of phosphonitrilic hexamide as a fertiliser in agriculture)*, in: BODEA C. (Editor). Progrese în cercetarea biochimică (*Progresses in Biochemical Research*), Acad. Rom., Filiala Cluj, 1986, pp. 127—137.
250. CALANCEA L., BOLOGA M., CHIRIAC M., *Utilization of ^{15}N to evaluate the availability of nitrogen from different fertilizers for *Lolium multiflorum**, Stud. Univ. Babeș-Bolyai. Biol., 1990, **35** (1), 37—44.
251. CHIRIȚA C., *Ecopedologie cu baze de pedologie generală (Ecopedology with Fundamentals of General Pedology)*, Ed. Ceres, București, 1974, pp. 34, 408, 428.
252. CHIRIȚA V., ELIADE G., *Evoluția substanței organice în solurile irigate și fertilizate (Evolution of organic substance in irrigated and fertilised soils)*, Probl. Agrofitehn. Teor. Apl. (Fundulea), 1984, **6** (1), 39—48.
253. CHISTOL A., KISS S., *Enzymatic synthesis of β -alkyl-D-fructofuranosides in soil*, Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Biol., 1994, **39** (1), 103—109.
254. CIOBANU C., MIHAILESCU A., *Indicatori preliminari de monitoring al calității solurilor forestiere afectate de poluare (Preliminary indicators for monitoring the quality of pollution-affected forest soils)*, Știința Solului, 1989, No. 2, 38—48.
255. COLIBAȘ I., COLIBAȘ M., POSTOLACHE T., PAPACOSTEA P., SÂNDOR M., *Efectul compactării secundare și al unor măsuri de refacere a stării de afânare, asupra însușirilor solului și producției, în condițiile luvisolului albic pseudogleizat de la Sinmartin—Oradea (The effect of artificial compaction and of some measures to restore the loosening status on the properties of soil and production under the conditions of the albic pseudogleyed luvisol in Sinmartin—Oradea)*, Lucr. Conf. Naț. Știința Solului (Timișoara, 1985), Publ. Soc. Naț. Rom. Știința Solului, București, 1987, No. 23A, 129—139.

256. COMĂNESCU S., MARIN E., Influența nămolului biologic din industria petrochimică asupra unor procese biologice din sol. II. Acțiunea nămolului fermentat lichid (*Influence of the biological sludge from the petrochemical industry on some biological processes in soil. II. Action of the fluid fermented sludge*), Microbiologie industrială și biotehnologie (Al V-lea Simp. Microbiol. Ind. Biotehnol., Iași, 1985), Univ. Al. I. Cuza, Iași; Întreprinderea de Antibiotice, Iași, 1986, pp. 935—940.
257. COMĂNESCU S., MARIN E., Influența nămolului biologic din industria petrochimică asupra unor procese biologice din sol. III. Acțiunea nămolului fermentat deshidratat (*Influence of the biological sludge from the petrochemical industry on some biological processes in soil. III. Action of the dehydrated fermented sludge*), Microbiologie industrială și biotehnologie (Al V-lea Simp. Microbiol. Ind. Biotehnol., Iași, 1985), Univ. Al. I. Cuza, Iași; Întreprinderea de Antibiotice, Iași, 1986, pp. 941—946.
258. CRIȘAN R., PAȘCA D., KISS S., Contribuții la metodologia de determinare a activității acetilesterazice din sol (*Contributions to the methodology for determining acetylerase activity in soil*), Lucr. Conf. Naț. Știința Solului (Pitești, 1988), Publ. Soc. Naț. Rom. Știința Solului, București, 1989, No. 26A, 251—254.
259. CRISTEA V., KISS S., PAȘCA D., DRĂGAN-BULARDA M., CRIȘAN R., MUNTEAN V., *Dynamics of the vegetation and evolution of the enzymatic potential of technogenic soils submitted to biological recultivation*, Colloq. Phytosociol. (Camerino), 1995, 24, 169—180.
260. DORNEANU D., DORNEANU E., Concepții moderne în fertilizarea organică a solului (*Modern Conceptions in Organic Fertilisation of Soil*), Ed. Ceres, București, 1984, pp. 38, 39, 78, 98, 101, 121, 161, 168.
261. DRĂGAN-BULARDA M., KISS S., Microbiologia solului (*Soil Microbiology*), Univ. Babeș-Bolyai, Cluj, 1986, pp. 6, 65, 66, 70, 72—74, 76, 78—82, 86, 88, 93, 94, 98, 103—110, 113—115, 124, 129, 154—162.
262. DRĂGAN-BULARDA M., ZBOROVSCI E., Influența adaosului de Solacril la apele de irigație asupra activității unor enzime din sol (*The influence of Solacril addition to irrigation waters on the activity of some soil enzymes*), Lucr. Conf. Naț. Știința Solului (Timișoara, 1985), Publ. Soc. Naț. Rom. Știința Solului, București, 1987, No. 23B, 125—129.
263. DRĂGAN-BULARDA M., BLAGA G., KISS S., PAȘCA D., GHERASIM V., VULCAN R., *Effect of long-term fertilization on the enzyme activities in a technogenic soil resulted from the recultivation of iron strip mine spoils*, Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Biol., 1987, 32 (2), 47—52.
264. DRĂGAN-BULARDA M., KISS S., PAȘCA D., Evidențierea unor activități izomerazice din sol (*Evidencing of some isomerase activities in soil*), Lucr. Conf. Naț. Știința Solului (Pitești, 1988), Publ. Soc. Naț. Rom. Știința Solului, București, 1989, No. 26A, 255—260.

265. DRAGAN-BULARDA M., BUMBAR V., CRIȘAN R., Caracterizarea enzimologică a unor soluri din județul Maramureș (*Enzymological characterisation of some soils from Maramureș county*), An. Univ. Oradea, Biol., 1994, 1, 52—56.
266. DRAGAN-BULARDA M., KISS S., PAȘCA D., MANOLACHE E., CRIȘAN R., MUNTEAN V., MARIN G., *Microbial communities in soils of the Danube Delta Biosphere Reserve*, Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Biol., 1995, 49 (1—2), 130—139.
267. ELIADE G., GHINEA L., IONESCU A., ȘTEFANIC G., TIANU M., Rezultate obținute în domeniul chimiei și biologiei solului (*Results obtained in the field of soil chemistry and biology*), An. Inst. Cercet. Cereale Plante Tehn. — Fundulea, 1987, 55, 291—315.
268. GHINEA L., Factorul biologic și detoxificarea mediilor naturale poluate cu pesticide (*The biological factor and detoxification of natural environments polluted with pesticides*), in: IONESCU A. (Editor), Efectele biologice ale poluării mediului (*Biological Effects of the Environmental Pollution*), Ed. Acad. Rom., București, 1973, pp. 161—176.
269. GHINEA L., *Viata în sol (Life in the Soil)*, Ed. Ceres, București, 1985, pp. 15—19, 31—33, 35—37, 40, 41, 54, 55, 62—65, 73, 80, 102.
270. GHINEA L., VLADUTIU I., BERCA M., Efectele reziduale ale erbicidelor (*Residual Effects of the Herbicides*), Ed. Acad. Rom., București, 1987, pp. 196, 197, 206—208, 210—218.
271. GRIGORE M., ȘTEFANIC G., CREANGĂ G., CIOBANU A., Încercări de caracterizare a fertilității solului prin testare agrochimică și agrobiologică (*Attempts for characterising the soil fertility by agrochemical and agrobiological testing*), Lucr. Conf. Naț. Știința Solului (Pitești, 1988), Publ. Soc. Naț. Rom. Știința Solului, București, 1989, No. 26B, 53—59.
272. HERA C., ELIADE G., La dynamique de l'azote dans les sols irrigués (*Dynamics of nitrogen in irrigated soils*), Probl. Agrofitotehn. Teor. Apl. (Fundulea), 1981, 3 (3), 209—215.
273. HERA C., GHINEA L., Interacțiunea erbicide-îngrășăminte și producția agricolă (*The herbicide-fertiliser relationship and the agricultural production*), Probl. Agrofitotehn. Teor. Apl. (Fundulea), 1980, 2 (2), 135—157.
274. HERA C., GHINEA L., ELIADE G., Mecanisme de reechilibrare a biocenozelor din solurile agricole (*Mechanisms of the re-equilibration of biocoenoses in agricultural soils*), in: CEAUȘESCU I., IONESCU A. (Editors), Probleme ale agriculturii contemporane (*Problems of the Contemporary Agriculture*), Ed. Ceres, București, 1977, pp. 196—220.
275. HERA C., ELIADE G., GHINEA L., POPESCU A., Asigurarea azotului necesar culturilor agricole (*Assurance of Nitrogen Required by Agricultural Plants*), Ed. Ceres, București, 1984, pp. 38, 178, 179, 183, 205—207, 219, 221, 222, 256, 259, 265—267.

276. HERA C., CHIRIȚA V., GHINEA L., Optimizarea regimului azotului din sol prin folosirea inhibitorilor enzimatici (*Optimising the nitrogen regime in soil by using enzyme inhibitors*), Probl. Agrofitotehn. Teor. Apl. (Fundulea), 1986, 8 (2), 135—152.
277. IONESCU A., Fenomenul de poluare și efectele sale în agricultură (*The Pollution Phenomenon and Its Effects in Agriculture*), Ed. Ceres, București, 1974, p. 131.
278. IONESCU A., Fenomene de poluare și măsuri antipoluante în agricultură (*Pollution Phenomena and Measures against Pollution in Agriculture*), Ed. Ceres, București, 1982, p. 118.
279. IONESCU A., MOGA I., ELIADE G., Interferențe agricultură-poluare-zone urbane (*Interferences agriculture-pollution-urban areas*), în: CEAUȘESCU I., IONESCU A. (Editors), Probleme ale agriculturii contemporane (*Problems of the Contemporary Agriculture*), Ed. Ceres, București, 1977, pp. 111—122.
280. IONESCU A., JINGA I., ȘTEFANIC G., Utilizarea deșeurilor organice ca îngrășământ (*Utilisation of Organic Residues as Fertilisers*), Ed. Ceres, București, 1985, pp. 6, 19, 20, 26, 27, 61, 64—67, 69, 70, 125, 126.
281. IONESCU F., NICOLESCU M., COIFAN M., DINCA I., BANIȚA E., ȘTEFANIC G., STRATULA V., POP L., Efectul rotației asupra culturii grâului de toamnă pe solul brun-roșcat, slab podzolit din zona centrală a Olteniei (*Effect of rotation on the winter wheat crop on a brown-reddish weakly podzolised soil in the central zone of Oltenia*), An. Inst. Cercet. Cereale Plante Tehn. — Fundulea, 1986, 53, 267—297.
282. KISS S., *Enzymology of oil-contaminated soils*, Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Biol., 1995, 40 (1—2), 3—25.
283. KISS S., PINTEA H., Testarea capacității inhibitoare a unor compuși organici asupra activității ureazice a solului (*Testing of the inhibitory capacity of some organic compounds on the urease activity of soil*), Lucr. Conf. Naț. Știința Solului (Timișoara, 1985), Publ. Sec. Naț. Rom. Știința Solului, București, 1987, No. 23B, 103—116.
284. KISS S., DRĂGAN-BULARDA M., PAȘCA D., Cercetări de enzimologie ambientală (*Environmental enzymological researches*), în: Actualitate și perspectivă în biologie. Structuri și funcții în ecosisteme terestre și acvatice (*Actuality and Perspective in Biology. Structures and Functions in Terrestrial and Aquatic Ecosystems*), Centr. Cercet. Biol., Cluj, 1985, pp. 209—220.
285. KISS S., DRĂGAN-BULARDA M., PAȘCA D., *Enzymological study of the evolution of technogenic soils*, Evol. Adapt. (Cluj), 1985, 2, 159—186.
286. KISS S., DRĂGAN-BULARDA M., PAȘCA D., *Environmental enzymology*, Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Biol., 1986, 31 (1), 3—13.

287. KISS S., DRAGAN-BULARDA M., PAȘCA D., PINTEA H., Inhibarea activității ureazice a solului pentru mărirea eficienței ureei ca îngrășământ și reducerea consumului de energie (*Inhibition of urease activity in soil for increasing the efficiency of urea as a fertiliser and reduction of energy consumption*), Producerea, Transportul și Utilizarea Energiei (Cluj), 1986, 5, 46—51.
288. KISS S., DRAGAN-BULARDA M., PAȘCA D., BLAGA G., ZBOROVSCI E., PINTEA H., CRIȘAN R., MUNTEAN V., MITROESCU S., Enzimologia recultivării biologice a solului iazului de decantare de la Exploatarea minieră Rodna (*Enzymology of the biological recultivation of spoils from the decantation pond at the Rodna Mining Enterprise*), Lucr. Conf. Naț. Știința Solului (Pitești, 1988), Publ. Soc. Naț. Rom. Știința Solului, București, 1989, No. 26A, 211—218.
289. KISS S., DRAGAN-BULARDA M., PAȘCA D., *Enzymology of the recultivation of technogenic soils*, Adv. Agron. (San Diego), 1989, 42, 229—278.
290. KISS S., PAȘCA D., DRAGAN-BULARDA M., CRISTEA V., BLAGA G., CRIȘAN R., MUNTEAN V., ZBOROVSCI E., MITROESCU S., *Enzymological analysis of lead and zinc mine spoils submitted to biological recultivation*, Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Biol., 1990, 35 (2), 70—79.
291. KISS S., DRAGAN-BULARDA M., PAȘCA D., *Enzymology of the evolution of some technogenic soils*, Evol. Adapt. (Cluj), 1991, 4, 125—132.
292. KISS S., ȘTEFANIC G., PAȘCA D., DRAGAN-BULARDA M., ZBOROVSCI E., CRIȘAN R., Enzimologia mediului înconjurător (*Enzymology of the Environment*), Vol. 1, Ed. Ceres, București, 1991, pp. 1—288.
293. KISS S., PAȘCA D., DRAGAN-BULARDA M., CRIȘAN R., MUNTEAN V., *Enzymological evaluation of the efficiency of the measures applied for biological recultivation of lead and zinc mine spoils*, Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Biol., 1992, 37 (2), 103—107.
294. KISS S., DRAGAN-BULARDA M., PAȘCA D., Enzimologia mediului înconjurător (*Enzymology of the Environment*), Vol. 2, Ed. Ceres, București, 1993, pp. 1—93.
295. KISS S., DRAGAN-BULARDA M., PAȘCA D., *Enzymology of Technogenic Soils*, Ed. Casa Cărții de Știință, Cluj, 1993, pp. 1—96.
296. KISS S., PAȘCA D., DRAGAN-BULARDA M., CRIȘAN R., MUNTEAN V., Evaluarea enzimologică a eficienței tehnologice de recultivare a haldei de steril de la o mină de plumb și zinc (*Enzymological evaluation of the efficiency of the biotechnological recultivation of spoils at a lead and zinc mine*), Proc. 8th Natl. Symp. Ind. Microbiol. Biotechnol. (Bucharest, 1994), Univ. București, 1994, pp. 357—363.
297. KISS S., DRAGAN-BULARDA M., PAȘCA D., *Enzymology of technogenic soils*, Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Biol., 1996, 41 (1—2), 3—21.
298. MANOLACHE E., SIMIHAIAN M., PICIU T., KISS S., *Study of some physicochemical and enzymological properties of a buried soil* (Part 1), Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Biol., 1994, 39 (2), 121—128.

299. MARIN E., COMANESCU S., HEFCO G., Influența nămolului biologic din industria petrochimică asupra unor procese biologice din sol. I. Acțiunea nămolului nefermentat (*Influence of the biological sludge from the petrochemical industry on some biological processes in soil. I. Action of the unfermented sludge*), Microbiologie industrială și biotehnologie (Al V-lea Simp. Microbiol. Ind. Biotehnol., Iași, 1985), Univ. Al. I. Cuza, Iași; Intreprinderea de Antibiotice, Iași, 1986, pp. 929—934.
300. MICLAUȘ V., Pedologie ameliorativă. Protecția mediului (*Ameliorative Pedology. Environmental Protection*), Ed. Dacia, Cluj, 1991, p. 207.
301. MIHALACHE G., ZELINSCHI C., NIȚU I., DANCAU H., UDRESCU A., VAGO D., Contribuții la cunoașterea unor indicatori microbieni pentru caracterizarea gradului de ameliorare a solurilor sărăturate (*Contributions to the knowledge of some microbial indicators for characterisation of amelioration degree of saline soils*), Știința Solului, 1989, No. 4, 13—21.
302. MUNTEAN V., DRĂGAN-BULARDA M., ZBOROVSCI E., PINTEA H., MUNTEANU I., Influența unor tehnologii agricole asupra numărului microorganismelor și activității enzimatică a solului în condițiile Stațiunii de Cercetări Agricole Turda (*The influence of some agricultural technologies on the number of microorganisms and enzymatic activity in soil under the conditions of the Agricultural Research Station in Turda*), Lucr. Conf. Naț. Știința Solului (Pitești, 1988), Publ. Soc. Naț. Rom. Știința Solului, București, 1989, No. 26A, 175—180.
303. MUNTEAN V., JAKAB S., CRIȘAN R., PAȘCA D., DRĂGAN-BULARDA M., KISS S., *Enzymatic potential in sewage sludge-amended soils*, Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Biol., 1991, 36 (1), 31—38.
304. PAPACOSTEA P., *Agricultura biologică (Biological Agriculture)*, Ed. Ceres, București, 1981, pp. 36—37.
305. PAȘCA D., CRIȘAN R., MUNTEAN V., MARIN G., KISS S., DRĂGAN-BULARDA M., Activități enzimatică în solurile din Delta Dunării — Rezervația Biosferei (*Enzyme activities of soils in the Danube Delta — Biosphere Reserve*), Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Biol., 1992, 37 (1), 77—92.
306. PAȘCA D., CRIȘAN R., MUNTEAN V., DRĂGAN-BULARDA M., KISS S., Activitatea enzimatică a solurilor din Parcul Național Retezat (*Enzymatic activity in soils of the Retezat National Park*), in: POPOVICI I. (Editor), Parcul Național Retezat — Studii ecologice (*The Retezat National Park — Ecological Studies*), Ed. West Side Computers, Brașov — Ed. EUS, Chișinău, 1993, pp. 117—129.
307. PAȘCA D., KISS S., DRĂGAN-BULARDA M., CRIȘAN R., MUNTEAN V., *Evolution of the enzymatic potential in lead and zinc mine spoils submitted to biological recultivation*, Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Biol., 1994, 39 (1), 95—101.

308. PAȘCA D., CRISTEA V., CRIȘAN R., MUNTEAN V., KISS S., DRAGAN-BULARDA M. Potențialul enzimatic al unui sol tehnogen supus revegetării cu cățina albă (*Hippophaë rhamnoides* L.) (Enzymatic potential of a technogenic soil submitted to revegetation with seabuckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.)), Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Biol., 1996, 41 (1—2), 183—193.
309. PAUNESCU A. D., ȘTEFANIC G. Cercetări privind microbiologia și enzimologia haldelor de cenușă de termocentrală luate în cultură de la Ișalnița-Craiova (Investigations concerning microbiology and enzymology of the cultivated power plant ash heaps at Ișalnița-Craiova), Știința Solului, 1989, No. 2, 32—37.
310. POPOVICI I. The use of soil nematodes to assess the quality of technogenic soil rehabilitation, Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Biol., 1993, 38 (1—2), 43—53.
311. PREDĂ M., GALLÓ S., POP V. V., PICIU T., MARCHIEVICI F. Solurile andice din ramura estică a Masivului Vlădeasa (Munții Apuseni) (The andic soils of the eastern part of the Vlădeasa Mountain Mass (Apuseni Mountains)), Lucr. Conf. Naț. Știința Solului (Satu Mare, 1973), Publ. Soc. Naț. Rom. Știința Solului, București, 1974, No. 14B, 569—585.
312. RAUȚA C. Sistemul de monitoring al calității solului (System for monitoring the soil quality), Știința Solului, 1986, No. 4, 22—28.
313. RAUȚA C., CĂRȘTEA S. Prevenirea și combaterea poluării solului (Prevention and Control of Soil Pollution), Ed. Ceres, București, 1983, pp. 89—91, 168, 185.
314. RAUȚA C., DUMITRU M., CĂRȘTEA S., DUMITRESCU F., DAMIAN M., GĂMENȚ E., ZELINSCHI C. Contribuții la stabilirea condițiilor de aplicare pe terenurile agricole a nămolului rezultat de la stația de epurare a apelor uzate din municipiul București (Contributions to establishing the conditions for application of the sludge from the wastewater treatment plant of the city of Bucharest on agricultural areas), Știința Solului, 1987, No. 1, 53—66.
315. RAUȚA C., MIHALACHE G., DANCAU H., UDRESCU A., RĂDULESCU V., ZELINSCHI C., DUMITRESCU F., DAMIAN M. Rezultate preliminare privind influența trifluralinului asupra activității microbiene din sol și a producției de muștar, porumb masă verde și soia (Preliminary results regarding the influence of trifluralin on soil microbial activity and yield of mustard, green corn mass and soybean), An. Inst. Cercet. Pedol. Agrochim., 1987, 48, 249—256.
316. RAUȚA C., IANCULESCU M., MIHĂILESCU A., CĂRȘTEA S., TÔȚI M., BUCEAG E., GĂMENȚ E., MIHALACHE G., DANCAU H., TISESCU A. Contribuții la cunoașterea poluării industriale a solului și vegetației forestiere în zona Copșa Mică (Contributions to the knowledge of industrial pollution of soil and forest vegetation in the Copșa Mică area), Ziridava (Arad), 1988, 17, 114—116.

317. SANDULESCU N., ELIADE E., IVAN D., POPESCU G., SPIRIDON L., CRISTUREAN I., DABUJA P., PUȘCA-HORENGA V. *A study concerning the elimination of the excess soil moisture in the zone Titu-Siebozia of the region Dâmbovița, during the year 1983*, An. Univ. București, Biol., 1989, 38, 61—66.
318. ȘTEFĂNIAN M., KISS S., PAȘCA D., ȘTEFĂN C. *Testing of some synthetic derivatives of L-glutamic acid as inhibitors of soil urease activity*, Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Biol., 1999, 27 (2), 99—101.
319. ȘTEFĂNIAN M., MANOLACHEA D., BOCȘĂN C. *A study of some physicochemical and enzymological properties of a buried soil (Part 2)*, Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Biol., 1990, 31 (3—4), 193—202.
320. ȘTEFĂNIC G. *Teste biologice în cazul de la E. P. Săsar în urma aplicării unor tratamente azoobiotice (Biological activity tests in the case of the application of azoobiotic treatments at the Săsar Lead Mining Enterprise)*, Bul. Științ. Inst. Investăm. Sup. Baia Mare, Ser. B, 1983, 6, 99—92.
321. ȘTEFĂNIC G. *Effectul încălzirii cu ultrasunete a amoniilor de conținut asupra creșterii plantelor și activității enzimice a solului (Effect of the microwave treatment of seeds of conifers on plant growth and soil enzymatic activity)*, Bul. Științ. Inst. Investăm. Sup. Baia Mare, Ser. B, 1983, 6, 138—140.
322. ȘTEFĂNIC G. *Metode de aplicare în cercetările microbiologice de teren (Metode aplicate în cazul solului de la E. P. Săsar)*, (Eucharest, 1985), Rom. Natl. Soc. Sci. Sol., Bucharest, 1985, pp. 157—165.
323. ȘTEFĂNIC G. *Teste biologice aplicate în cazul solului irigat cu apă caldă și în cazul fertilizării cu nămol (Biological activity tests in soil irrigated with warm waters and in soil fertilized with sludge)*, Grup. Tehnic și Cercet. Științ. de Cercet. de Valorificare a Nămolurilor și de Epurare a Apelor rezonante de la cazișorile de animale, sistemul salicel și îndulcirea apei⁶ (Eucharest, 1973), București, 1973, pp. 21—25.
324. ȘTEFĂNIC G. *Determinarea nivelului potențial al respirației solului cu un respirometru care generează oxigen (Determination of the potential level of soil respiration with an oxygen-generating respirometer)*, Lucr. Conf. Naț. Știința Solului (Pitești, 1988), Publ. Soc. Naț. Rom. Știința Solului, București, 1989, No. 26A, 237—241.
325. ȘTEFĂNIC G. *Progrese realizate în determinarea stării de fertilitate a solurilor prin testare biologică (Progresses achieved in determination of fertility status of soils by biological testing)*, Probl. Agrofitotehn. Teor. Apl. (Fundulea), 1989, 11 (1), 1—18.
326. ȘTEFĂNIC G. *Cercetări în vederea perfecționării metodei de testare a activității fosfomonocetazice a solurilor (Researches for improving the testing method of phosphomonoesterase activity in soils)*, Știința Solului, 1989, No. 3, 81—90.

327. ȘTEFANIC G., Cercetări cu privire la metoda de testare a activității fosfomonoesterazice a solurilor (*Researches concerning the testing method of phosphomonoesterase activity in soils*), Probl. Agrofitotehn. Teor. Apl. (Fundulea), 1990, 12 (3), 195—203.
328. ȘTEFANIC G., *Assay of the potential level of soil respiration with an oxygen-generating respirometer*, Bull. Acad. Sci. Agric. Forest. (Bucarest), 1991, No. 21, 87—91.
329. ȘTEFANIC G., *Researches concerning the method for testing the soil phosphomonoesterase activity*, Bull. Acad. Sci. Agric. Forest. (Bucarest), 1993, No. 23, 5—11.
333. ȘTEFANIC G., Cuantificarea fertilității solului prin indici biologici (*Quantification of soil fertility by biological indices*), Lucr. Conf. Naț. Știința Solului (Tulcea, 1994), Publ. Soc. Naț. Rom. Știința Solului, București, 1994, No. 28A, 45—55.
331. ȘTEFANIC G., *Arguments for the improvement of the tests concerning the accumulated phosphatases in soils*, Rom. Agric. Res. (Fundulea), 1994, No. 1, 63—65.
330. ȘTEFANIC G., *Biological definition, quantifying method and agricultural interpretation of soil fertility*, Rom. Agric. Res. (Fundulea), 1994, No. 2, 107—116.
322. ȘTEFANIC G., CHIRNOGEANU I., Testarea enzimatică a fertilității solurilor agricole (*Enzymatic testing of the fertility of agricultural soils*), An. Inst. Cercet. Cereale Plante Tehn.-Fundulea, 1985, 52, 359—374.
334. ȘTEFANIC G., CHIRNOGEANU I., Contribuții la stabilirea concentrației optime de clorură de trifeniltetrazoliu în amestecul de reacție pentru determinarea activității dehidrogenazice în diferite soluri din România (*Contributions to establishing the optimum triphenyltetrazolium chloride concentration in the reaction mixture for determination of dehydrogenase activity in different soils of Romania*), în: Actualitate și perspectivă în biologie. Structuri și funcții în ecosisteme terestre și acvatice (*Actuality and Perspective in Biology. Structures and Functions in Terrestrial and Aquatic Ecosystems*), Centr. Cercet. Biol., Cluj, 1985, pp. 247—252.
335. ȘTEFANIC G., DANCAU H., Influența imediată a fertilizantilor (superfosfat și azotat de amoniu sau uree) asupra activității dehidrogenazice a solului (*The immediate influence of fertilisers (superphosphate and ammonium nitrate or urea) on soil dehydrogenase activity*), Lucr. Conf. Naț. Știința Solului (Pitești, 1988), Publ. Soc. Naț. Rom. Știința Solului, București, 1989, No. 26A, 187—193.
336. ȘTEFANIC G., PICU I., Modul de afânare anuală de bază a solului și unele modificări biotice, enzimatică și agrochimice constatate la cernoziomul cambic irigat de la ICCPT-Fundulea (*The mode of the basic annual loosening of soil and some biotic, enzymatic and agrochemical modifications in the irrigated cambic chernozem at the Research Institute for Cereals and Industrial Crops-Fundulea*),

- Lucr. Conf. Naț. Știința Solului (Pitești, 1988), Publ. Soc. Naț. Rom. Știința Solului, București, 1989, No. 26A, 169—174.
337. ȘTEFANIC G., ELIADE G., PICU I., PETRESCU R., Modificări chimice și biologice în sol sub acțiunea arăturii la diferite adâncimi și fertilizării (*Chemical and biological changes in soil under the action of ploughing to different depths and of fertilisation*), Lucr. Științ. Univ. Craiova (Vol. Omagial), 1975, pp. 151—158.
338. ȘTEFANIC G., HANDRA M., GHILIC D., Calcularea concentrației optime a clorurei de trifeniltetrazoliu (TTC), în funcție de unele însușiri pedologice, pentru determinarea activității dehidrogenazice a solurilor (*Calculation, depending on some soil properties, of the optimum triphenyltetrazolium chloride (TTC) concentration for determination of dehydrogenase activity of soils*), Probl. Agrofitotehn. Teor. Apl. (Fundulea), 1988, 10 (1), 47—59.
339. ȘTEFANIC G., GHINEA L., ȘARPE N., PENESCU A., Influența tratamentului de lungă durată cu atrazină asupra însușirilor biotice și enzimatică ale solului cernoziomic de la ICCPT-Fundulea (*The influence of long-term atrazine treatment on biotic and enzymatic properties of the chernozemic soil at the Research Institute for Cereals and Industrial Crops-Fundulea*), Lucr. Conf. Naț. Știința Solului (Pitești, 1988), Publ. Soc. Naț. Rom. Știința Solului, București, 1989, No. 26A, 181—185.
340. ȘTEFANIC G., OPREA G., MIHAILA V., Recyclage des déchets végétaux en agriculture (*Recycling of plant residues in agriculture*), Probl. Agrofitotehn. Teor. Apl. (Fundulea), 1992, 14 (3—4), 117—131.
341. ȘTEFANIC G., OPREA G., MIHAILA V., Reciclarea deșeurilor vegetale în agricultură (*Recycling of plant residues in agriculture*), Probl. Agrofitotehn. Teor. Apl. (Fundulea), 1992, 14 (3—4), 147—165.
342. TEKNOS P., DRĂGAN-BULARDA M., KISS S., PAȘCA D., *Enzymatic activities in some Greek forest soils*, Stud. Univ. Babeș-Bolyai. Biol., 1987, 32 (1), 68—72.
343. TURCU M., FRITEA T., VLADUȚIU I., ȘTEFANIC G., GHINEA L., Cercetări privind ecotoxicologia dibutoxului (*Researches concerning ecotoxicology of dibutox*), Probl. Agrofitotehn. Teor. Apl. (Fundulea), 1988, 10 (1), 81—89.
344. UDRESCU S., IONESCU A., MORI A., ZELINSCHI C., Calitatea solului și a recoltelor în zone poluate cu pulberi, sulf și fluor (*Quality of soil and crop yield in areas polluted with dusts, sulphur and fluorine*), Lucr. Științ. Inst. Agron. N. Bălcescu, Ser. A, 1987, 30, 83—88.
345. ZARNEA G., *Tratat de microbiologie generală. Vol. V. Bazele teoretice ale ecologiei microorganismelor. Microorganismele și mediile lor naturale (Treatise of General Microbiology. Vol. V. Theoretical Basis of Microbial Ecology. The Microorganisms and Their Natural Environments)*, Ed. Acad. Rom., București, 1994, pp. 238—242.

346. ZBOROVSCI E., CRIȘAN R., MUNTEAN V., Analiza enzimologică a unor soluri alpine din Parcul Național Retezat (*Enzymological analysis of some alpine soils in the Retezat National Park*), Lucr. Conf. Naț. Știința Solului (Pitești, 1988), Publ. Soc. Naț. Rom. Știința Solului, București, 1989, No. 26A, 219—225.
See also papers 365, 378 (p. 158) and 388 (pp. 24—28).

2. PEAT ENZYMOLOGY

347. CRIȘAN R., Activitatea enzimatică a turbei de sub diferite asociații vegetale din tînecul Calul de Piatră (jud. Cluj) (*Enzymatic activity in peat under different plant associations in the Calul de Piatră moss moor (Cluj county)*), An. Univ. Oradea, Biol., 1994, 1, 125—131.
348. CRIȘAN R., ZBOROVSCI E., PAȘCA D., Activitatea enzimatică a unor turbe din jud. Harghita (*Enzymatic activity in some peats from Harghita district*), în: Actualitate și perspectivă în biologie. Structuri și funcții în ecosisteme terestre și acvatice (*Actuality and Perspective in Biology. Structures and Functions in Terrestrial and Aquatic Ecosystems*), Centr. Cercet. Biol., Cluj, 1985, pp. 299—308.
349. PAȘCA D., KISS S., *Enzymatic potential of some highmoor peats from Romania*, Proc. 10th Int. Peat Congr. (Bremen, 1996), Schweizerbart, Stuttgart, 1996, 2, 263—272.
350. PAȘCA D., CRIȘAN R., RADU H., Activitatea enzimatică a unor zăcăminte de turbă din județele Harghita, Brașov și Argeș (*Enzymatic activity of some peat deposits in the Harghita, Brașov and Argeș districts*), Lucr. Conf. Naț. Știința Solului (Timișoara, 1985), Publ. Soc. Naț. Rom. Știința Solului, București, 1987, No. 23B, 139—150.
351. PAȘCA D., CRIȘAN R., ZBOROVSCI E., PINTEA H., RADU H., Analiza enzimologică a zăcămintelor de turbă din Bazinul Someșului Rece și Cald (*Enzymological analysis of peat deposits in the Someșul Rece and Cald Basin*), Lucr. Conf. Naț. Știința Solului (Pitești, 1988), Publ. Soc. Naț. Rom. Știința Solului, București, 1989, No. 26A, 227—235.
352. PAȘCA D., CRIȘAN R., KISS S., MUNTEAN V., DRAGAN-BULARDA M., *Utilization of peat for modelling artificial organo-mineral systems analogous to therapeutic mud*, Proc. 10th Int. Peat Congr. (Bremen, 1996), Schweizerbart, Stuttgart, 1996, 2, 534—541.
See also papers 284 and 286.

3. ENZYMOLOGY OF NATURAL WATERS AND BOTTOM SEDIMENTS, INCLUDING THERAPEUTIC MUDS

353. BEDELEAN I., KISS S., DRAGAN-BULARDA M., PAȘCA D., CRIȘAN R., ZBOROVSCI E., MUNTEAN V., *Mineralogical characteristics of some therapeutic mud analogues obtained by using a zeolitic volcanic tuff*, în: *The Volcanic Tuffs from the Transylvanian Basin*, Univ. Babeș-Bolyai, Cluj, 1991, pp. 443—446.

354. BULGĂREANU V.-A. C., IANC R., IONESCU V., KISS S., PRODĂNESCU I., ȚINTILĂ D., URCAN T., *Roșu Lake (Ocna Șugatag, Maramureș): the limnogeology of an anthroposaline, brackish- and acidic water lake*, Rev. Roum. Géol., Géophys. Géogr., Géol., 1985, **29**, 91—95.
355. BULGĂREANU V.-A. C., KISS S., PAȘCA D., DRĂGAN-BULARDA M., CRIȘAN R., PINTEA H., ZBOROVSCI E., *The relations between the limnogeology and enzymology of sediments from some brackish and salt lakes*, Rev. Roum. Géol., Géophys. Géogr., Géol., 1987, **31**, 107—114.
356. BULGĂREANU V.-A. C., KISS S., ENACHE G., CUȘMIRENCO G., URCAN T., PAȘCA D., DRĂGAN-BULARDA M., CRIȘAN R., PINTEA H., ZBOROVSCI E., *Dependența compoziției mineralogice a nămolurilor de lac de enzimologia acestora, precum și de unele caracteristici ale mediului lacustru (Dependence of the mineralogical composition of lake muds on their enzymology as well as on some characteristics of the lacustrine environment)*, Stud. Cercet. Geol., Geofiz. Geogr., Geol., 1989, **34**, 109—120.
357. BULGĂREANU V.-A. C., KISS S., ENACHE G., CUȘMIRENCO G., URCAN T., PAȘCA D., DRĂGAN-BULARDA M., CRIȘAN R., ZBOROVSCI E., *Some data concerning the relations between limnological factors, mineralogical composition and enzymatic and nonenzymatic catalytic activities of pelogenous sediments from brackish and salt lakes*, Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Biol., 1989, **34** (1), 69—81.
358. CRIȘAN R., ILIESCU C., ILIESCU M., ZBOROVSCI E., *Compararea enzimologică a diferitelor zone ale Lacului Sinoe (jud. Constanța) (Enzymological comparison of different zones of the Sinoe Lake (Constanța district))*, în: Actualitate și perspectivă în biologie. Structuri și funcții în ecosisteme terestre și acvatice (*Actuality and Perspective in Biology. Structures and Functions in Terrestrial and Aquatic Ecosystems*), Centr. Cercet. Biol., Cluj, 1985, pp. 289—292.
359. CRIȘAN R., PAȘCA D., MUNTEAN V., ZBOROVSCI E., DRĂGAN-BULARDA M., KISS S., *Enzymological study of muds from salt lakes in Turda (Cluj district)*, Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Biol., 1988, **33** (2), 76—86.
360. DRĂGAN-BULARDA M., PINTEA H., KISS S., *Influența razelor gama asupra potențialului enzimatic al nămolului din Lacul Sinoe (jud. Constanța) (Influence of gamma rays on the enzymatic potential of mud from the Sinoe Lake (Constanța district))*, în: Actualitate și perspectivă în biologie. Structuri și funcții în ecosisteme terestre și acvatice (*Actuality and Perspective in Biology. Structures and Functions in Terrestrial and Aquatic Ecosystems*), Centr. Cercet. Biol., Cluj, 1985, pp. 275—280.
361. DRĂGAN-BULARDA M., FLORIAN M., KISS S., INCZE I., *Aplicarea metodelor enzimologice pentru studierea tasării și argilizării nămolului terapeutic (Application of enzymological methods for studying subsidence and clay formation in therapeutic mud)*, în: Actualitate și perspectivă în biologie. Structuri și funcții în ecosisteme te-

- restre și acvatică (*Actuality and Perspective in Biology. Structures and Functions in Terrestrial and Aquatic Ecosystems*), Centr. Cercet. Biol., Cluj, 1985, pp. 281—288.
362. KISS S., DRĂGAN-BULARDA M., PAȘCA D., PINTEA H., ZBOROVȘCHI E., MUNTEAN V., CRIȘAN R. *Use of zeolite as an adsorbing surface for modelling systems analogous to therapeutic mud*, Rev. Roum. Chim., 1990, 35, 915—918.
363. MUNTEAN V. *Activitatea sistemului transportor de electroni în sedimente (Electron transport system activity in sediments)*, An. Univ. Oradea, Biol., 1994, 1, 75—85.
364. MUNTEAN V. *Activitatea fosfatazică în sedimente (Phosphatase activity in sediments)*, An. Univ. Oradea, Biol., 1994, 1, 109—117.
365. MUNTEAN V. *Inhibition of phosphatase activity in a salt lake sediment, a leached chernozem and a brown luvis soil*, Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Biol., 1994, 39 (2), 105—111.
366. MUNTEAN V. *Enzymological study of muds from the Ursu and Negru Lakes (Sovata, Mureș county)*, Evol. Adapt. (Cluj), 1995, 5, 97—105.
367. MUNTEAN V. *Research on enzymes catalysing the synthesis and degradation of levans and dextrans in salt lake sediments*, Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Biol., 1996, 41 (1—2), 205—215.
368. MUNTEAN V., CRIȘAN R., PAȘCA D., KISS S., DRĂGAN-BULARDA M. *Enzymological classification of salt lakes in Romania*, Int. J. Salt Lake Res., 1996, 5, 35—44.
369. PAȘCA D., BULGĂREANU V.-A., PINTEA H., ZBOROVȘCHI E. *Influența depozitării nămolului terapeutic asupra potențialului lui enzimatic (Lacul Balta Albă, jud. Buzău și Lacul Baia Neagră, Slănic Prahova) (Influence of the storage of therapeutic mud on its enzymatic potential (the Balta Albă Lake, Buzău district and the Baia Neagră Lake, Slănic Prahova))*, în: Actualitate și perspectivă în biologie. Structuri și funcții în ecosisteme terestre și acvatică (*Actuality and Perspective in Biology. Structures and Functions in Terrestrial and Aquatic Ecosystems*), Centr. Cercet. Biol., Cluj., 1985, pp. 259—264.
370. PAȘCA D., KISS S., PINTEA H. *Cercetări enzimologice la nămolul din Lacul Băile de la Cojocna (jud. Cluj) (Enzymological researches concerning the mud from the Băile Lake in Cojocna (Cluj district))*, în: Actualitate și perspectivă în biologie. Structuri și funcții în ecosisteme terestre și acvatică (*Actuality and Perspective in Biology. Structures and Functions in Terrestrial and Aquatic Ecosystems*), Centr. Cercet. Biol., Cluj, 1985, pp. 265—274.
371. PAȘCA D., KISS S., DRĂGAN-BULARDA M., PINTEA H., CRIȘAN R., ZBOROVȘCHI E. *Biotehnologie pentru creșterea potențialului enzimatic al nămolului slab activ dintr-un lac salin (Biotechnology for increasing the enzymatic potential of the weakly active mud from a salt lake)*, Microbiologie industrială și biotehnologie (Al VI-lea Simp. Microbiol. Ind. Biotechnol., Iași, 1987), Univ. Al. I. Cuza, Iași; Întreprinderea de Antibiotice, Iași, 1988, pp. 307—311.

372. PAȘCA D., KISS S., DRĂGAN-BULARDA M., PINTEA H., CRIȘAN R., ZBOROVSCI E., Activarea pe cale microbiologică a nămolului lacului nr. 3 de la Cojocna (jud. Cluj) (*Microbiological activation of the mud from Lake No. 3 in Cojocna (Cluj county)*), Ziridava (Arad), 1988, 17, 398—400.
373. PAȘCA D., MUNTEAN V., CRIȘAN R., PINTEA H., ZBOROVSCI E., ILIESCU M., ILIESCU C., DRĂGAN-BULARDA M., KISS S., *Evolution of the enzymatic potential of mud in the Techirghiol salt lake*, Evol. Adapt. (Cluj), 1991, 4, 119—123.
374. PAȘCA D., CRIȘAN R., KISS S., MUNTEAN V., DRĂGAN-BULARDA M., *Enzymatic potential of some artificial organo-mineral systems analogous to therapeutic mud*, Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Biol., 1994, 39 (2), 113—120.
375. PINTEA H., CRIȘAN R., DRĂGAN-BULARDA M., Efectul fluxului balneoterapeutic asupra potențialului enzimatic al nămolului în condițiile Stațiunii balneare Lacu Sărat, Brăila (*Effect of the balneotherapeutic flux on the enzymatic potential of mud under the conditions of the Lacu Sărat health resort in Brăila*), in: Actualitate și perspectivă în biologie. Structuri și funcții în ecosisteme terestre și acvatice (*Actuality and Perspective in Biology. Structures and Functions in Terrestrial and Aquatic Ecosystems*), Centr. Cercet. Biol., Cluj, 1985, pp. 293—297.
376. PRICAJAN A., Substanțele minerale terapeuțice din România (*Therapeutic Mineral Substances in Romania*), Ed. Științ. și Encicl., București, 1985, p. 26.
See also papers 284, 286 and 352.

4. ENZYMOLOGY OF WASTE WATERS AND ACTIVATED SLUDGES

377. ALDEA M., Biosinteza acidului D-gluconic din β -D-glucoză în prezența imobilizatelor de nămoluri active excedentare (*Biosynthesis of D-gluconic acid from β -D-glucose in the presence of immobilised excessive activated sludges*), Microbiologie industrială și biotehnologie (Al V-lea Simp. Microbiol. Ind. Biotehnol., Iași, 1985), Univ. Al. I. Cuza, Iași; Întreprinderea de Antibiotice, Iași, 1986, pp. 339—345.
378. CHIRIAC V., GHEDERIM V., IONESCU-SISEȘTI V., NEGULESCU C. A. L., Epurarea apelor uzate și valorificarea reziduurilor din industria alimentară și zootehnie (*The Cleanup of Wastewaters and Utilisation of Residues from the Food Industry and Animal Husbandry*), Ed. Ceres, București, 1977, pp. 41, 82.
379. CURCĂNEANU N., PRĂDATU M., LUCA E., Studiul biodegradabilității apelor reziduale rezultate din procesul de fabricare al DEHPC (*Study of the biodegradability of waste waters resulted from the manufacturing process of DEHPC (diethylhexyl peroxy carbonate)*), Microbiologie industrială și biotehnologie (Al VI-lea Simp. Microbiol.

- Ind. Biotechnol., Iași, 1987), Univ. Al. I. Cuza, Iași; *Întreprinderea de Antibiotice*, Iași, 1988, pp. 895—899.
380. EMINOVICI A., VAICUM L., ZEANA R., Modificări ale caracteristicilor biochimice și microbiologice ale nămolului activ sub influența unor impurități organice din apele uzate industriale (*Modifications of the biochemical and microbiological characteristics of activated sludge under the influence of organic impurities from industrial waste waters*), în: *Actualitate și perspectivă în biologie. Structuri și funcții în ecosisteme terestre și acvatice (Actuality and Perspective in Biology. Structures and Functions in Terrestrial and Aquatic Ecosystems)*, Centr. Cercet. Biol., Cluj, 1985, pp. 237—246.
381. PAȘA R., POPA M., TEODORESCU C., ȚICU G., POSTU E., Studiul biodegradării caprolactamei și clorurii de tereftaloil în nămol activ de la Stația de epurare a Combinatului de fibre sintetice Săvinești (*Study of the biodegradation of caprolactam and terephthaloyl chloride in the activated sludge from the wastewater treatment plant of the Synthetic Fibres Factory in Săvinești*), *Microbiologie industrială și biotehnologie (Al V-lea Simp. Microbiol. Ind. Biotechnol., Iași, 1985)*, Univ. Al. I. Cuza, Iași; *Întreprinderea de Antibiotice*, Iași, 1986, pp. 917—922.
382. PAȘA R., AILIESEI O., NIMIȚAN E., PRICOP E., POPA M., IOJA O., Biodegradarea aminelor aromatice și a fenolului de către nămolul activ de la stația de epurare a Combinatului de fibre sintetice Săvinești (*Biodegradation of aromatic amines and phenol in the activated sludge from the wastewater treatment plant of the Synthetic Fibres Factory in Săvinești*), *Microbiologie industrială și biotehnologie (Al V-lea Simp. Microbiol. Ind. Biotechnol., Iași, 1985)*, Univ. Al. I. Cuza, Iași; *Întreprinderea de Antibiotice*, Iași, 1986, pp. 923—928.
383. PAȘA R., POPA M., TEODORESCU C., POSTU E., Cercetări asupra reactivării nămolului degradat de la stația de epurare Săvinești (*Researches on the reactivation of degraded sludge at the wastewater treatment plant in Săvinești*), *Microbiologie industrială și biotehnologie (Al VI-lea Simp. Microbiol. Ind. Biotechnol., Iași, 1987)*, Univ. Al. I. Cuza, Iași; *Întreprinderea de Antibiotice*, Iași, 1988, pp. 855—859.
384. PAȘA R., POPA M., TEODORESCU C., POSTU E., Studiul biodegradării ciclohexanolului și ciclohexanonei în nămolul activ de la stația de epurare a C.F.S. Săvinești (*Study of the biodegradation of cyclohexanol and cyclohexanone in the activated sludge from the wastewater treatment plant of the Synthetic Fibres Factory in Săvinești*), *Microbiologie industrială și biotehnologie (Al VI-lea Simp. Microbiol. Ind. Biotechnol., Iași, 1987)*, Univ. Al. I. Cuza, Iași; *Întreprinderea de Antibiotice*, Iași, 1988, pp. 871—879.
385. POSTU E., MAXIM I., TEODORESCU C., PAȘA R., POPA M., Unele aspecte privind identificarea cauzelor înnegrii și umflării nămolului activ de la stația de epurare Săvinești (*Some aspects regarding the identification of causes of blackening and swelling of activated*

- sludge at the wastewater treatment plant in Săvinești), Microbiologie industrială și biotehnologie (Al VI-lea Simp. Microbiol. Ind. Biotehnol., Iași, 1987), Univ. Al. I. Cuza, Iași; *Întreprinderea de Antibiotice*, Iași, 1988, pp. 851—854.
386. RADULESCU D., TEHEICA C. Valorificarea apelor reziduale din complexe industriale și îngrășare a porcinelor (*Utilisation of the waste waters from swine-breeding complexes*), Ziridava (Arad), 1988, 17, 557—559.
387. ZEANA R., ILIȘESCU A., EMINOVICI A. Intensificarea procesului de degradare biologică aerobă prin folosirea stimulatoarelor de metabolism microbial (*Intensification of the aerobic biological degradation process by using stimulants of the microbial metabolism*), Ziridava (Arad), 1988, 17, 560—563.
See also papers 278 (p. 213), 280 (p. 65—71), 284, 286, 314 and 323.

5. COMPOST AND FARMYARD-MANURE ENZYMOLOGY

388. IONESCU-SISEȘTI V., PAPACOSTEA P., ȘTEFANIC G. Compostul-ingrășământ din deșeurile organice (*The Compost Fertiliser from Organic Residues*), Ed. Științ. și Encicl., București, 1980, pp. 31, 51, 65, 96.
389. ȘTEFANIC G., IONESCU-SISEȘTI V., PAPACOSTEA P., ȘTEPĂNESCU B., JINGA I., IONESCU S., CIOBANU G., CHIRNOGEANU I., DANCAU H. Compostarea nămolurilor de la stațiile de epurare ale întreprinderilor de creștere a porcilor (*Composting of sludges from the wastewater treatment plants of swine-breeding enterprises*), în: DUMITRU M., IONESCU-SISEȘTI V., NASTEA S., RAUȚĂ C. (Co-ordinatori), Valorificarea pentru producția vegetală a nămolurilor apelor uzate de la complexe zootehnice (*Utilisation, for crop production, of the sewage sludges from animal husbandry complexes*), Inst. Cercet. Pedol. Agrochim., București, 1986, pp. 117—126.
See also papers 280 (pp. 85, 86, 93, 94, 100), 284 and 286.

6. HUMUS ENZYMOLOGY

390. ELIADE G. Probleme actuale în studiul substanțelor humice din sol (*Actual problems in the study of humic soil substances*), Probl. Agrofitehn. Teor. Apl. (Fundulea), 1979, 1 (1), 65—90.
391. ELIADE G., IONESCU A. Formarea substanței organice în natură (*Formation of Organic Substance in the Nature*), Ed. Științ. și Encicl., București, 1981, pp. 94—96, 98.
392. IONESCU M. Materia organică a solului (*The Organic Matter of Soil*), Ed. Ceres, București, 1977, pp. 84, 85, 101.
See also papers 251 (p. 407), 260 (pp. 51—53, 57), 275 (pp. 13—18), 284 and 286.

7. CLAY ENZYMOLOGY

393. KISS S., DRĂGAN-BULARDA M., PAȘCA D., *Activity and stability of enzyme molecules following their contact with clay mineral surfaces*, Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Biol., 1986, **31** (2), 3—29; Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Chem., 1988, **33** (1), 27—30.
See also papers 251 (p. 419), 275 (p. 23), 284 and 286.

8. MISCELLANEA

594. MANOLACHE E., DRĂGAN-BULARDA M., KISS S., *Cercetări microbiologice și enzimologice în Peștera Tăușoare și Peștera Mare din Valea Firii (Microbiological and enzymological researches in the Tăușoare Cave and in the Great Cave of the Firea Valley)*, Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Biol., 1991, **36** (1), 39—51.
See also papers 284 and 286.

RECENZII

Vasile Cristea, *La conservation de la nature en Roumanie (Nature Conservation in Romania)*, Università degli Studi, Camerino, 1995, 107 pages with 37 figures in the text.

The book represents a successful and welcome synthesis on the main problems of nature conservation in Romania. It is based on various sources of information, among which the author selected 149 bibliographical titles. This valuable book with excellent drawings was published under the patronage of Camerino University (Italy) as the 18th number from the series „L'uomo e l'ambiente“.

The text is accompanied by 37 figures representing: maps, graphs, portraits of Romanian nature conservation promoters, first page reproductions from some important legislative papers on nature protection in Romania, protected plants and animals, parks and nature reservations, ethnographical and archaeological museums.

The first chapter deals briefly with the physico-geographic characteristics of Romania, regarding geographic co-ordinates, relief, petrography, hydrographical system and climate.

In the second chapter entitled „Historical Eco-Protecting Retrospections“, there are successively exposed the activities on nature protection carried on by Romanian scientists and cultivated people. There are also briefly mentioned not only the legislations on nature protection in Romania, but also an estimate of the dynamics of the number of reservations during 1949—1991, together with their surface recorded in a suggestive adjoined table.

The third chapter is the largest of all, describing the „Protected Units of Romania“.

There are mentioned the main activities undertaken by the Committee for the Nature Monuments of Romania, after having been previously identified and rigorously inventorised all the plant and animal species considered to be rare, relicts or endemic. There have been also examined the vegetal, geological, paleontolo-

gical and speleological formations with a special scientific importance.

The book presents the following protected objects in Romania: two present and planned national parks having a temporary statute, the Retezat National Park and the Danube Delta Reserve; two natural parks; 46 scientific reservations; 372 nature reservations having a mixed phytotaxonomic, forestry, zoological, paleontological, geological and speleological characteristic; 349 landscape reservations; 134 nature monuments represented by associations, rare species of plants and animals or on point of disappearing, secular trees, unique geological and speleological formations, etc.

In each analysed unit, there are included various data regarding the surface of reservations, the physico-geographic and geological aspects, the protected plants and animals, the specific plant associations, etc.

In the last chapter, there are mentioned the main „Institutions Carrying on a Secondary Eco-Protecting Activity“ which are represented by botanical gardens, zoological parks, natural history museums, ethnographical and archaeological museums, monasteries, etc.

The book „*La conservation de la nature en Roumanie*“, elaborated with a high sense of responsibility by Professor Dr. Vasile Cristea, addresses itself to all the lovers of nature and to those who want to know not only the biodiversity and richness of nature monuments, but also their aestetical potentialities with a special intrinsic value.

IOAN POP

Vasile Cristea, Simone Denaeayer, Jean-Paul Herremans, Irina Goia, *Ocrotirea naturii și protecția mediului în România*, Editura Cluj University Press, Cluj-Napoca, 1996, 365 pagini, 71 ilustrații.

Lucrarea este rezultatul unei fructuoase colaborări dintre două cadre universitare clujene și două personalități științifice de prestigiu, un profesor universitar și un secretar general al Rezervațiilor

naturale, ambii din Belgia, care se dovedesc a fi propagatori activi ai ocrotirii naturii și protecției mediului.

În primul capitol al lucrării — „Ocro-tirea naturii și protecția mediului, probleme majore ale lumii contemporane” (V. Cristea) — sunt prezentate argumentat rezultatele impactului dintre om și natură, exemplificate prin supraex-ploatarea speciilor și a habitatelor, de-teriorarea ecosistemelor în urma activi-tăților economice și sociale, intensificarea poluării cu efecte nocive asupra sănătății naturii și a omului, la care se mai adaugă și catastrofele ecologice de natură geo-fizică, climatică, antropică, demografică și tehnologică.

Considerăm ca deosebit de utilă și convingătoare definirea sferei acțiunilor eco-protective întreprinse de om, cu semnificație biologică, socio-economică, eti-co-estetică și culturală. Se arată că toate aceste acțiuni bine dirijate contribuie atât la conservarea genofondului și bio-diversității ecosistemelor, cât și la asig-urarea perpetuării speciilor, păstrarea nealterată a frumuseților naturii, cu efecte benefice pentru sănătatea omului.

În strânsă corelație cu problematicile analizate în capitolul I al lucrării, capi-tolul II — „Strategiile globale în ocrotirea naturii și protecția mediului” (J.-P. Herremans) — tratează succint despre evoluția și dinamica postglaciară a for-mațiunilor forestiere în funcție de fac-torii pedo-climatici și de practicile agro-silvo-pastorale desfășurate de om, care au determinat accentuarea diversității ecosistemelor. De asemenea, acest capi-tol mai prezintă argumentat influența negativă pe care a avut-o asupra naturii revoluția industrială și științifică care a succedat perioadei anticare, deter-minând atât destrămarea sistemului agro-silvo-pastoral, cât și pauperizarea flo-rei și faunei spontane. Sunt prezentate modificările recente pricinuite de om la nivelul agro-ecosistemelor, precum și plan-ul de gestionare rațională a pădurilor, pașiștilor și a diverselor culturi.

Una dintre importantele problematici cu implicații majore în economia umană este abordată în capitolul III — „Agrî-cultura biologică, o alternativă pentru o dezvoltare durabilă” (S. Deraney). Se trece în revistă eșecul agriculturii in-dustriale, care pe termen scurt a înreg-istrat o creștere a productivității, dar care ulterior s-a diminuat simțitor, da-

torită degradării solurilor, poluării pân-zelor freatice în deosebi cu pesticide, repercutându-se negativ și asupra calității alimentelor. Sunt menționate metodele de remediere a acestor carențe prin practicarea unei agriculturi mai apro-piate de natură, utilizându-se tehnicile de fertilizare tradiționale, procedee ex-perimentate cu succes de către unele țări din nordul Europei. Sunt mențio-nate în lucrare practicile de cultură pe baza principiilor agriculturii biologice, precum și avantajele ei privind produc-ția cerealiară și animală.

Cea mai mare parte a lucrării este consacrată capitolelor IV și V, care tratează despre principalele probleme ale ocrotirii naturii în România.

Capitolul IV — „Ocroțirea naturii în România” (V. Cristea) — constituie o reușită și binevenită sinteză. După pre-zențarea pe scurt a principalelor par-ticularități fizico-geografice și retrospec-tivele istorice eco-protectoare din Ro-mânia, sunt analizate, pe baze de date cu exemplificări judicioase selectate, 896 obiective protejate, care adăpostesc specii de plante și animale rare sau endemice, precum și formațiuni geologice și speo-logice unice. De asemenea, mai sunt evi-dențiate și principalele „Instituții care desfășoară o activitate eco-protectoare secundară”.

Capitolul V, „Politica ecologică în Ro-mânia” (Irina Goia), tratează despre mo-dul de organizare a ocrotirii naturii și protecția mediului atât în trecut, cât și în prezent. Se evidențiază, de asemenea, rolul partidelor ecologiste și al organi-zațiilor neguvernamentale, precum și in-strumentul legislativ aplicat în România pentru ocrotirea naturii.

Considerăm că lucrarea referată, cu un conținut unitar și bogat argumentată, prezintă interes major atât pentru practicieni, cât și pentru cei ce iubesc na-tura cărora li se și adresează.

IOAN POP

Gerd W. Lüttig (Editor), *Proceedings, 10th International Peat Congress (Lucrările celui de al 10-lea Con-gres Internațional de Turbă)* (Bremen, 1996), E. Schweizerbart'sche Verlags-buchhandlung (Nägele u. Obermiller), Stuttgart, 1996, Vol. 1, VIII + 229 pa-gini cu o figură și un tabel; Vol. 2, XIV + 558 pagini cu 131 figuri și 104 tabele;

Vol. 3, VIII + 116 pagini cu 6 tabele; Vol. 4, VIII + 149 pagini cu 30 figuri și 17 tabele incluse în text.

Contribuțiile științifice și tehnice ale celui de al 10-lea Congres Internațional de Turbă, Bremen (27 mai — 2 iunie 1996) sunt reprezentate sub forma a 4 volume: Abstracts — Rezumate (Vol. 1), Proceedings — Lucrări complete (Vol. 2), Summary Papers — Lucrări în rezumat (Vol. 3) și Late Contributions — Contribuții ulterioare (Vol. 4).

Rezultatele cercetărilor originale, fundamentale și tehnico-aplicative reprezintă strădanii depuse de marea familie a cercetătorilor turbei din 40 de țări de pe toate continentele Terrei. Informațiile cuprinse în cele 4 volume ilustrează în special preocupările cercetătorilor în ultimii 4 ani, cuprinzând perioada dintre cel de al 9-lea Congres Internațional de Turbă (Uppsala, Suedia), având ca temă „Turba în natură și în industrie — o problemă de echilibru” și cel de al 10-lea Congres Internațional de Turbă (Bremen, Germania), având ca temă generală „Utilizarea turbei — prezent, trecut și viitor”.

Congresul al 10-lea este primul congres care are loc în Germania, localizarea fiind pe deplin justificată de prezența giganticele depozite de turbă din nord-vestul Germaniei, precum și a instituțiilor științifice axate pe studiul turbei — nord-vestul Germaniei constituind un adevărat centru al cercetărilor fundamentale și de utilizare a turbei.

Structura celor 4 volume, ca și a lucrărilor congresului se axează pe 6 direcții, corespunzând comisiilor de specialitate ale Comitetului Internațional de Turbă. Cele 21 de teme generale, în care au fost incluse peste 250 lucrări științifice, sunt cuprinse în cele 4 volume.

Cantitatea enormă de informații prezentate sub formă de comunicări în plen, postere, conferințe, expoziții tehnice și mai ales discuții au putut fi accesibile datorită programului științific riguros respectat, precum și cordialității care caracterizează familia cercetătorilor turbei, permițând realizarea de numeroase întâlniri între colegi și contacte cu participanți și specialiști din toată lumea.

Denumirile celor 6 comisii de specialitate și ale principalelor teme abordate sunt specificate în cele ce urmează.

Comisia I: Stratigrafia, inventarierea și conservarea turbăriilor, în care au fost incluse patru teme:

1. *Tipurile, geneza și clasificarea mlaștinilor de turbă*, cuprinzând cercetări botanice, ecologice, pedologice, noi sisteme de clasificare în funcție de geneza turbei, zonarea și succesiunea vegetației;

2. *Distribuția globală și resursele mlaștinilor*, cu referire la analizele cartografice, geografice, reconsiderarea resurselor de turbă;

3. *Criteriile de conservare a diferitelor tipuri de mlaștini de turbă*; discutarea de noi criterii științifice, ecologice, educaționale și de recreere, proiectarea unor sisteme de prezervare, biodiversitate, măsuri de remediere pentru restabilirea funcțiilor ecosistemelor naturale cu turbării;

4. *Turbăriile ca arhive istorice*; stratigrafia turbei ca indicator al evenimentelor climatice, datarea cu radiocarbon în investigații geochimice și geobotanice, lito- și chronostratigrafice, mlaștinile arhive ale poluării atmosferei cu metale grele.

Comisia II: Utilizarea industrială a turbei, cu următoarele 4 teme:

5. *Standarde internaționale pentru turbă, produși de turbă și substituenți de turbă*;

6. *Extracția și tratarea turbei, produși de turbă cu valoare suplimentară*; îmbunătățirea normelor de colectare, modelele economice pentru recoltarea turbei, prevenirea pulverizării în timpul utilizării turbei;

7. *Ambalaje pentru turbă și reciclarea materialelor de ambalaj*;

8. *Turba ca resursă energetică*; istoria extragerii turbei, dezvoltarea producției de turbă în programele de bioenergie.

Comisia III: Utilizarea turbei și a turbăriilor în agricultură, horticultură și silvicultură, având trei teme generale:

9. *Utilizarea intensă și extensivă în agricultură — beneficiile și riscurile ecosistemelor de turbării*; dezvoltarea agriculturii în turbăriile tropicale, schimburile în ecosistemele turbatoase în urma drenării și utilizării agricole, fertilizanti cu P și N pentru o agricultură durabilă în mlaștinile ombrogene;

10. *Silvicultura pe turbării și balanța carbonului*; efectele drenajului asupra spălării suspensiilor solide și a nutrienților, condiții optime de drenaj;

11. *Turba și produșii competitivi în horticultură*; turba — mediu indispensabil în horticultură, influența gradului de uscare asupra proprietăților fizice.

Comisia IV: Caracteristicile chimice, fizice și biologice ale turbei, cu următoarele 4 teme:

12. *Caracteristicile chimice ale turbei, solurilor turboase, produșilor de turbă, substanțelor balneologice — noi metode analitice*; transformarea C și N în solurile turboase drenate, biochimia humusului din turbă, conținutul în metale grele, schimburi de substanțe între plante și turbă, cercetări ecologice în mlaștinile montane, potențialul enzimatic al unor mlaștini oligotrofe, acumularea Fe — proces al degradării solurilor turboase drenate, utilizarea analizelor chimice discriminatorii pentru clasificarea turbărilor;

13. *Cercetări recente asupra proprietăților fizice ale turbei și evaluarea lor*; cercetări hidrogeologice în zone naturale și cultivate, variabilitatea proprietăților fizice și condițiile de creștere a plantelor, influențele antropogene, proprietățile fizice ale turbei măcinată, măsurători magnetice și cercetări stratigrafice;

14. *Cunoștințe biologice actuale asupra tipurilor de turbă*; activitatea microbiană a turbei de *Sphagnum magellanicum*, activitatea biologică a acizilor humici izolați din turbă și săropel;

15. *Tehnologia chimică a turbei*; caracteristici fizico-chimice ale turbei și tehnologii moderne de producere, prelucrarea turbei — aplicații biotehnologice, particularitățile structurale și proprietățile fizico-chimice ale substanțelor humice.

Comisia V: Planificarea utilizării turbărilor în agricultura, având ca teme:

16. *Balanța carbonului în turbării în raport cu schimbarea globală a acestuia*; analize de radiocarbon, dinamica C în mlaștinile oceanice, fixarea CO₂ atmosferic de către plantele din mlaștini, fluxul oxidului nitros și al metanului într-o turbărie montană;

17. *Managementul ecosistemelor de turbării naturale și modificate*; restaurarea proceselor de turbificare și revitalizarea proceselor de înmlăștinire, conținutul biomasei microbiene și activitatea microorganismelor în solurile turboase, structura și funcțiile microorganismelor în mlaștini virgine și modificate, structura

și funcțiile ecosistemelor turboase cu diferite utilizări, monitoringul geoeologic în depozitele de turbă, biodiversitatea și importanța ambientală a turbăriilor, situația ecologică și posibilitățile de revitalizare a mlaștinilor oligotrofe, re-vegetarea naturală în mlaștini exploatate, istoricul sistemelor de protecție a mlaștinilor, creșterea secundară a turbei și restaurarea mlaștinilor;

18. *Cartarea turbăriilor — condiție preliminară pentru planificarea utilizării turbei*.

Comisia VI: Balneologia, medicina și terapia turbei, având trei teme:

19. *Terapia cu turbă în contextul rezervei de peleiți, tratament, aditivi și îndepărtarea reziduurilor*; istoria terapiei cu turbă în Europa centrală, geomedicina;

20. *Utilizarea în terapeutică a turbei și a substanțelor extrase din turbă*; rolul substanțelor humice rezultate din degradarea ligninei, efectul băilor cu turbă asupra reumatismului, influența unor produși din turbă asupra proceselor metabolice, stimularea proceselor enzimatice, creșterea rezistenței organismului, clasificarea proprietăților balneologice, preparate din *Sphagnum* ca agenți antiulcerosi, preparate anti-stres, analgezice, antitumorale, hepatoprotectoare, modelarea unor sisteme organo-minerale analoge nămolului terapeutic, complexe de acizi humici din turbă cu proprietăți curative și cu eficiență profilactică;

21. *Turba și preparatele din turbă în medicina veterinară*; rolul preparatelor humice în reglarea metabolismului proteic la pui, preparate cu influențe fiziologice și biochimice.

Amploarea și complexitatea cercetărilor cuprinse în cele 4 volume constituie surse unice de documentare pentru cercetătorii turbei din țara noastră, permițând totodată sincronizarea investigațiilor noastre cu cele din principalele institute de cercetare a turbei din lume.

DANIELA PAȘCA

Brunello Ceccanti and Carlos Garcia (Editors), **Environmental Biochemistry in Practice, Vol. 1 — Wastes and Soil Management (1994)**, Istituto per la Chimica del Terreno, Pisa, 1995, X + 173 pages, including 42 figures, 27 tables, 5 colour photos and Subject Index.

This volume is a special publication in the framework of the scientific cooperation between Consiglio Nazionale delle Ricerche (Italy) and Consejo Superior de Investigaciones Científicas (Spain) in the period of 1989—1992. The contributors comprise 9 Italian scientists from Florence, Pisa, Rome and Viterbo, and 9 Spanish scientists from Barcelona, Murcia and Santiago de Compostela.

The volume consists of 6 chapters, each containing a subchapter of References. Even the titles of chapters, subchapters and sections, specified below, will clearly demonstrate the sustained commitment of the authors of chapters to the practical solution of environmental problems, based on the application of knowledge of basic biological processes.

Chapter 1, entitled „Biomonitoring the Environment and Its Functionality“ (pp. 1—24) was elaborated by B. Ceccanti, G. Masciandaro and C. Garcia. This is the introductory chapter, comprising 3 subchapters and 5 sections: Prologue; environmental ecology (Conceptual approach to the biosphere „status“; Global change and biochemical cycles); Perturbations (Nature-induced; Man-induced); Biomarkers of ecosystem perturbations and recovery (Content of the chapters).

In Chapter 2 (pp. 25—49), S. Grego, L. Badalucco, F. De Cesare, M. Bonmati and P. Nannipieri deal with „Soil Biotechnology“. Titles of the 5 subchapters and 9 sections are the following: Introduction; Soil inoculation (Microbial inocula and plant nutrition; Microbial inocula and biological control; Microbial inocula and physical soil properties; Risk assessment); Soil enzymes (Enzymes and agricultural residue degradation; Enzymes and solubilization of phosphorus; Enzymes involved in pesticide degradation; Enzymes and biological control; Enzymes and phenolic waste); Enzymes in arable soils; Conclusions.

Chapter 3, „Composting: Biochemistry and Characterization“ (pp. 51—78), written by C. Garcia, T. Hernández, F. Costa and B. Ceccanti, is divided into 5 subchapters and 7 sections: Introduction; Compositing process (Characterization of a composting process — CO₂ emission; lipid fraction of wastes; The biochemistry of composting — changes in ATP; changes in enzymatic activity); Humic

substances (Biochemistry of humic substances; Extraction and fractionation); New technologies to characterize a composting process (Use of pyrolysis-gas chromatography (Py-GC) in composting; Controlled ultrafiltration on membrane; Isoelectric focusing (IEF); Conclusions.

Chapter 4, „Anaerobic-Aerobic Treatments of Agricultural Wastes“ (pp. 79—112), is described by G. Masciandaro in 4 subchapters with 8 sections: Introduction (Agricultural wastes and environmental quality; Needs of waste recycling in soils); Biological treatments (Aerobic — lagoons; composting; Anaerobic — microbiology and biochemistry; biogas production; Anaerobic-aerobic); Proposals (A practical case: pig slurry; Anaerobic test to evaluate compost stability; Humic acid formation during anaerobic-aerobic process); Conclusions.

A. Benedetti, A. Figliolia and S. Canali deal with „Waste Treated Soil and Crop Production“ (Chapter 5, pp. 113—130) in 5 subchapters, only Subchapter 3 being divided into sections (3). Their titles are the following: Introduction; Animal waste and vermicompost; Leather meal and chromium toxicity (Cr uptake by crops; Cr mobility in the soil; Effects of Cr on microorganisms); Research on the chromium bioavailability; Organic fraction of olive-oil waste waters; Conclusions.

E. Gil-Sotres, M. C. Leiros, M. C. Teissar-Cepeda, A. Saá and M. V. González-Sangregorio have structured Chapter 6, „The Importance of Soil Biochemical Properties in the Reclamation of Lignite Mining Land“ (pp. 131—170), into 3 subchapters with 6 sections: Introduction (The characteristics of spoil; Spoil management); Revegetation-induced changes in spoil (Evolution of biochemical properties — evolution of microbial populations; evolution of biological activity; decomposition processes; summary); The dynamics of organic matter in mine-soils; Evolution of physical and chemical properties — physical properties; chemical properties; Pollution-neutralizing properties); Summary and conclusions.

Due to the multidisciplinary character of the investigations described in *Environmental Biochemistry in Practice*, this volume is a very useful source of information for a broad circle of res-

ders: soil biochemists (including enzymologists), microbiologists, chemists, physisists, plant physiologists, phytopathologists, zoologists, pesticide scientists, toxicologists, environmental engineers.

STEFAN KISS

Francisco Guitián Ojea (Editor), **Recuperación de las Escombreras de la Mina de Lignitos de Meirama (A Coruña)** (*Recovery of the Spoil Benches of the Lignite Mine in Meirama (A Coruña)*), Universidade de Santiago de Compostela, 1995, 286 pages including 81 figures, 48 tables and 26 colour photos.

The volume consists of Introduction and Epilogue written by the Editor and of 9 chapters. The Editor and most of the Authors of chapters are professors (E. Benito Rueda, F. Gil Sotres, M. C. Leirós de la Peña and S. Seoane Labandeira) or researchers (A. Saá Sarria and C. Varela Martínez) of the University of Santiago de Compostela (Galicia, Spain). M. C. Trasar Cepeda is collaborator of the Agrobiological Research Institute of Galicia in Santiago de Compostela. F. Herránz Villafruela is director of the Lignite Mining Enterprise in Meirama, Province of A Coruña, Galicia, NW Spain (Lignitos de Meirama S.A.), and P. Galán Regalado is head of the Department for Environmental Studies of this enterprise.

The volume describes the complex investigations performed since 1985 for reutilization of spoil benches of the Meirama opencast lignite mine.

Chapter 4, „The deposit of lignites of Meirama“ (pp. 15—41), elaborated by F. Herránz Villafruela, is divided into 5 subchapters (Geographic localisation and characteristics of the deposit; The mine materials — lignites, clays, sands and sandy clays, colluviums; Mining systems and management of the mine; Spoil benches of the mine; Necessity for rehabilitation of spoil benches. Legislation).

In Chapter 2 (pp. 43—67), M. C. Leirós de la Peña, P. Galán Regalado, M. C. Trasar Cepeda and F. Gil Sotres deal with „The natural environment of the mine“, under the following subchapter headings: Description of the area; Geology; Topography and geomorphology;

Climatology; Soil science; Agricultural potentiality of the earths and actual utilisation of the soil; Autochthonous vegetation; Fauna.

„The spoil materials of the mine“ (pp. 69—96), written by S. Seoane Labandeira, E. Benito Rueda, M. C. Leirós de la Peña, F. Gil Sotres and F. Guitián Ojea is the topic of Chapter 3, comprising 5 subchapters: Morphology and composition; Physical properties; Chemical properties; Biochemical properties — enzyme activities, ATP content; Environmental problematics of the spoils.

In Chapter 4 (pp. 97—123), P. Galán Regalado reviews „The works for recovery of spoil benches“. The subchapter titles are specified below: Works previous to revegetation; Selection of plant species — grasses, legumes and their mixtures; Seeding methods; Selection of ligneous species; Works for following up the development of vegetation; Integration into the landscape; General conclusions on the recovery works.

Chapter 5, „The mine soils“ (pp. 125—157) was elaborated by M. C. Leirós de la Peña, C. Varela Martínez, F. Gil Sotres, M. C. Trasar Cepeda and S. Seoane Labandeira. It consists of 4 subchapters: Evolution of the physical properties; Evolution of the chemical properties; Evolution of the biochemical properties — respiration, ATP content, enzymatic activities, mineralisation of nitrogen, forms of nitrogen and phosphorus; Synthesis.

„The organic matter of mine soils“ is the title of Chapter 6 (pp. 159—184). The Authors, M. C. Trasar Cepeda, A. Saá Sarria, M. C. Leirós de la Peña and F. Gil Sotres, have delineated, within this chapter, three subchapters: Structure and composition of the humic substances; Evolution of the humic substances; Synthesis.

In Chapter 7, F. Gil Sotres, M. C. Leirós de la Peña, M. C. Trasar Cepeda and E. Benito Rueda deal with the „Modification of the contamination risk in the recovered spoil benches“ (pp. 185—211). The subchapters are entitled as follows: Modification of the risk for dispersion of solid particles; Degradation of organic materials — pH-dependent variation of enzymatic activity, enzyme kinetics, thermodynamic data; Retention of cations; Sorption of anions; Synthesis.

Chapters 8 and 9 were written by P. Galán Regalado. Chapter 8 is devoted to „The vegetation of mine soils“ (pp. 213—244) and comprises 5 subchapters: Bioclimatic and biogeographic characteristics of the study area; Methodology; Evolution of the introduced (planted) vegetation; Colonising spontaneous vegetation; Conclusions.

Chapter 9 deals with the „Fauna of the reclaimed lands: colonisation and evolution of the vertebrate communities“ (pp. 245—283), in the following subchapters: Community of the amphibians; Community of the reptiles; Community of the birds; Community of the mammals; Discussion; Conclusions.

In each chapter, the subchapters are followed by Bibliography.

The investigations described in this volume may serve as a model for recultivation of spoils resulting from open-cast mining of coal. The fruitful co-operation between the University of Santiago de Compostela and the Lignite Mining Enterprise in Meirama also has a model value.

The recultivation success manifesting itself in the rapidity of the pedogenetic processes in the Meirama lignite mine spoils should be attributed to the appropriate soil management practices applied by the Authors of the volume. The favourable properties of the parent material and the favourable climatic conditions in the region of the Meirama mine also contributed — as the Authors point out — to the recultivation success.

This excellently printed volume with its beautiful photos and accurate figures is a valuable source of information for all experts interested in the multidisciplinary activity of land rehabilitation.

STEFAN KISS

Wolfgang Balzer, Auswirkungen langjähriger Klärschlammdüngung und daraus resultierender Schwermetallakkumulationen auf den mikrobiologischen Status verschiedener Böden (Effects of Long-term Sewage Sludge Fertilisation and of the Resulting Heavy Metal Accumulations on the Microbio-

logical Status of Different Soils), Wissenschaftlicher Fachverlag, Giessen, 1993, IV + 192 pages including 85 tables and 30 figures.

The investigations described in the book were performed in Germany, at four locations (Rauischholzhausen, Speyer, Braunschweig and Baumannshof), where experimental plots on different soils had been submitted to long-term fertilisation with sewage sludges and compared with NPK-fertilised or farmyard-manured plots. Besides these field experiments, laboratory ones were also carried out. Thus, the accumulations in soils of the heavy metals originating from sewage sludges were modelled in laboratory experiments, in which soil samples were treated with solutions of Cd, Zn, Cu, Ni, Pb, Cr and Hg chlorides at different rates.

The effects of sewage sludges on soils were evaluated by analysing a great number of physicochemical, microbiological, enzymological and other biochemical parameters. For example, the enzymological parameters comprised dehydrogenase, catalase, β -glucosidase, urease, protease and alkaline phosphatase activities playing an important role in the biogeochemical cycles of C, N and P.

The results have shown that long-term fertilisation of soils with sewage sludges, like treatment of their samples with solutions of heavy metal chlorides, affected unfavourably their biological quality which was attributed, in principal, to accumulations of heavy metals and, in part, to a decrease in pH. These effects were sensitively indicated by diminutions in dehydrogenase, alkaline phosphatase, urease and catalase activities and in substrate-induced respiration of soils.

Based on these findings, the Author recommends that for long-term fertilisation with sewage sludges their maximum admissible heavy metal contents should be lowered in comparison to the values admitted by present regulation.

The book presents much interest for agronomists, soil microbiologists and biochemists and even for decision makers in problems related to environmental protection.

STEFAN KISS

Tiparul executat la Imprimeria „ARDEALUL” Cluj
sub comanda nr. 70082

În cel de al XLI - an (1996) *STUDIA UNIVERSITATIS BABEȘ-BOLYAI*
apare în următoarele serii:

matematica (trimestrial)	studii europene (semestrial)
informatica (semestrial)	business (semestrial)
fizica (semestrial)	psihologia-pedagogia (semestrial)
chimia (semestrial)	științe economice (semestrial)
geologia (semestrial)	științe juridice (semestrial)
geografia (semestrial)	istorie (trei apariții pe an)
biologia (semestrial)	filologie (trimestrial)
filosofia (semestrial)	teologie ortodoxă (semestrial)
sociologia (semestrial)	teologie catolică (anual)
politica (anual)	educație fizică (anual)
efemeride (anual)	

In the XLI - year of its publication (1996) *STUDIA UNIVERSITATIS
BABEȘ-BOLYAI* is issued in the following series:

mathematics (quarterly)	european studies (semesterily)
computer science (semesterily)	business (semesterily)
physics (semesterily)	psychology - pedagogy (semesterily)
chemistry (semesterily)	economic sciences (semesterily)
geology (semesterily)	juridical sciences (semesterily)
geography (semesterily)	history (three issues per year)
biology (semesterily)	philology (quarterly)
philosophy (semesterily)	orthodox theologie (semesterily)
sociology (semesterily)	catholic theologie (yearly)
politics (yearly)	physical training (yearly)
ephemerides (yearly)	

Dans sa XLI - e année (1996) *STUDIA UNIVERSITATIS BABEȘ-BOLYAI*
paraît dans les séries suivantes:

mathématiques (trimestriellement)	european sciences (semestriellement)
informatiques (semestriellement)	affaires sciences (semestriellement)
physique (semestriellement)	psychologie pedagogie (semestriellement)
chimie (semestriellement)	sciences économiques (semestriellement)
geologia (semestriellement)	sciences juridiques (semestriellement)
géographie (semestriellement)	histoire (trois apparitions per année)
biologie (semestriellement)	philologie (trimestriellement)
philosophie (semestriellement)	théologie orthodoxe (semestriellement)
sociologie (semestriellement)	théologie catholique (annuel)
politique (annuel)	éducation physique (annuel)
ephemerides (annuel)	

