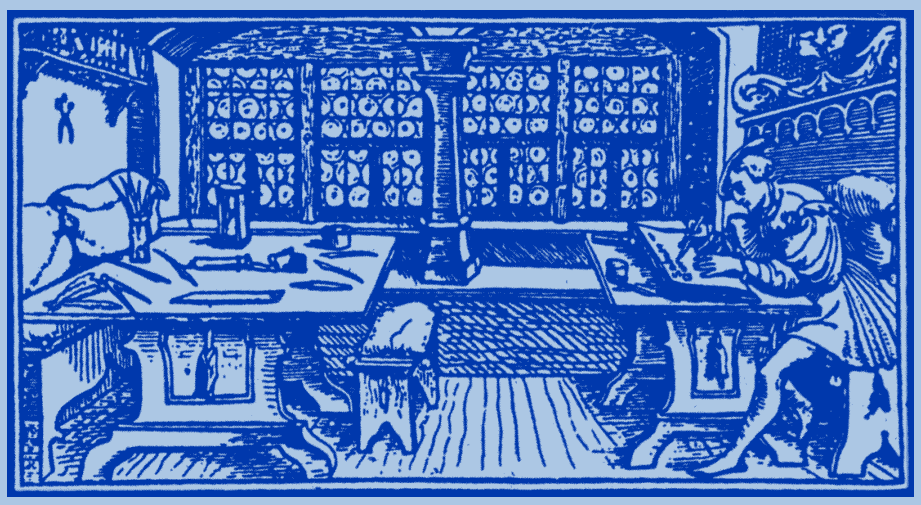
STUDIA UNIVERSITATIS BABEŞ-BOLYAI

Biologia

CLUJ-NAPOCA 2003



2

ANUL XLVIII **2003**

STUDIA
UNIVERSITATIS BABEŞ–BOLYAI
BIOLOGIA
2

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

SUMAR – CONTENTS – SOMMAIRE – INHALT

S. KISS, Advances in Soil Enzymology (Part V)..... 3

A. DAVID, Argumente avifaunistice pentru extinderea Rezervației Naturale "Cheia Turzii" (județul Cluj, România) ■ Avifaunistical Reasons for Enlargement of the Gorge of Turda Nature Reserve (Cluj County, Romania) 37

V. BERCEA, C. DOBROTĂ, Conținutul în pigmenți asimilatori al plantulelor crescute în condiții de ecranare a câmpului magnetic ■ The Content of Assimilatory Pigments in Plantlets Grown under Shielded Magnetic Field Conditions..... 47

V.-D. SANDU, C. PAŞCA, C. CRĂCIUN, A. COSTEA TURCU, Aspecte structurale şi ultrastructurale ale hepatotoxicității Nurofenului la şobolanul alb Wistar ■ Structural and Ultrastructural Aspects of the Hepatotoxicity of Nurofen in White Wistar Rats 53

C. PAŞCA, C. CRĂCIUN, V.-D. SANDU, Modificări structurale şi ultrastructurale induse de Nurofen la nivelul componentelor mucoasei gastrice la şobolanul alb Wistar ■ Structural and Ultrastructural Modifications Induced by Nurofen at the Level of the Components of Gastric Mucosa in White Wistar Rats..... 67

E. KIS, C. CRĂCIUN, Atenuarea modificărilor gravimetrice induse de tratamentul cu Fluocinolon-acetonid N prin administrarea de propranolol ■ Attenuation of the Fluocinolone-acetonid N- Induced Gravimetric Disorders by Propranolol 83

A. FLOREA, C. PUICĂ, M. C. OPREA, P. GHERGHEL, C. CRĂCIUN, Efecte structurale şi ultrastructurale determinate de veninul de albine în miocard ■ Structural and Ultrastructural Effects Produced by the Honey Bee Venom in Myocardium..... 89

A. FLOREA, C. CRĂCIUN, Reacții ale organismului la veninul de albine şi toxicitatea acestuia ■ Reactions of the Organism to the Honey Bee Venom and Its Toxicity..... 103

M. DRĂGAN-BULARDA, C. IUŞAN, Microbiota unor ape minerale din zona Lăpuşului (jud. Maramureş) ■ Microbiota of Some Mineral Waters from the Lăpuş Zone (Maramureş County)..... 115

B. BOCOŞ, D. MOGA, Ş. ȚIGAN, Investigarea caracterelor fenotipice asociate cu potențialul enterotoxigen la tulpini de *Aeromonas* izolate din surse individuale de apă potabilă netratată ■ Investigation of Some Phenotypic Characteristics, Associated with the Enterotoxigenic Potential in Strains of *Aeromonas* Isolated from Individual Untreated Drinking Water Supplies..... 123

RECENZII - BOOK REVIEWS - COMPTES RENDUS - BUCHBESPRECHUNGEN

C. Tudorancea, W. D. Taylor (Editors), **Ethiopian Rift Valley Lakes** (L. MOMEU)..... 129

STUDIA UNIVERSITATIS BABEŞ-BOLYAI, BIOLOGIA, XLVIII, 2, 2003

ADVANCES IN SOIL ENZYMOLOGY (PART V)

STEFAN KISS*

SUMMARY. - In Part V of *Advances in Soil Enzymology* new data are added to our review article entitled "Soil enzyme activites as influenced by earthworms" which was published in 2000 [34]. Comparison of this review article with Part V convincingly shows that the earthworm-related soil enzymological investigations were largely developed in the last period.

Parts I-III of *Advances in Soil Enzymology* [35] dealt with Enzymology of oil-contaminated soils; Enzymology of soils affected by industrial emissions; and Enzymology of technogenic soils, respectively, updating the review published in 1998 [37], while in Part IV [36] new data were added to our review article on "Enzymology of soils inoculated with microorganisms" which was published in 1999 [33].

Part V contains new data added to our review article entitled "Soil enzyme activities as influenced by earthworms" which was published in 2000 [34] and follows the structure initially established for the review article [34].

Comparison of enzyme activities in earthworm casts and underlying soil

In laboratory experiments performed by Flegel *et al.* [22], several properties, including acid and alkaline phosphatase activities in soil and casts of three detritivorous earthworm species: *Lumbricus terrestris*, *L. rubellus* and *Dendrobaena octaedra* were compared. The soil used is a gleyic luvisol of loamy texture. The soil samples were taken from the Ap horizon of an arable land near Neuenkirchen (Lower Saxony, Germany).

The earthworm species were kept in separate microcosms (consisting of two parallel glass sheets) filled with sieved soil aggregates, on the surface of which plant materials (as foods for earthworms) were placed. These materials were leaves of dandelion (*Taraxacum officinale)*, lupine (*Lupinus polyphyllus*), rye (*Secale cereale*) and alder (*Alnus glutinosa*) and half-year-old leaves from litter layer of beech (*Fagus sylvatica*) and larch (*Larix decidua*). The leaves were air-dried and cut into pieces of 1-2 cm^2. The soil aggregates used were 1-2 mm in diameter for *L. terrestris* and 0.5-1 mm for *L.rubellus* and *D.octaedra*.

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

For each food treatment, 25 specimens of *L. terrestris* and *L.rubellus* and 56 of *D.octaedra* were kept in the microcosms at 18% (weight/weight) soil moisture content and a constant temperature of 11^0C, for 4-6 weeks. Then the contents of microcosms were air-dried and the cast aggregates as well as the unconsumed plant materials were separated from the soil aggregates.

Of the results obtained in the analysis of cast and soil aggregates, some will be cited below.

The amount of water-stable aggregates was significantly higher in casts (40-81%) than in the soil (21%). The increase was highest in casts of *D.octaedra* (81%) and *L.rubellus* (80%) fed on dandelion leaves, while the lowest increase (40%) was registered in casts of *L.terrestris* and *D.octaedra* fed on alder leaves.

Acid phosphatase activity (pH 6.5) correlated very significantly (p=0.007) and alkaline phosphatase activity (pH 11) correlated significantly (p=0.024) with the amount of water-stable aggregates in casts.

Within the laboratory experiments briefly described above, Flegel and Schrader [21] compared organic C and total N contents as well as dehydrogenase, acid and alkaline phosphatase activities in soil and casts of *D.octaedra* fed on the six plant materials specified above.

The organic C content in soil (1.79%) was higher than in casts of earthworms fed on larch, alder, beech and rye leaves (1.56-1.68%), but the total N content in soil (0.165%) was higher than in the casts only in the case of worms fed on larch leaves (0.162%). As foods, dandelion caused the highest and larch the lowest contents of organic C and total N in casts.

The three enzyme activities measured were higher in casts than in the soil. The only exception was dehydrogenase activity which was lower in casts resulting from feeding on larch leaves than in the soil.

The correlations between enzyme activities and organic C and total N contents in casts were significant at p=0.016 (dehydrogenase), p=0.009 (acid phosphatase) and p=0.004 (alkaline phosphatase). Furthermore, dehydrogenase activity significantly correlated with acid and alkaline phosphatase activities (at p=0.005 and p=0.03, respectively) in the casts.

The litter bag experiment described by McInerney and Bolger [48] was carried out under field conditions on a 2-ha stand of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) in Camolin, Co. Wexford, Ireland.

In all, six litter bag treatments were applied. These were: earthworm casts; intact oak litter plus soil; shredded oak litter (< 2 mm) plus soil, each placed either on the surface or buried.

The earthworm used was *L.terrestris*. The oak litter was collected from *Quercus petraea*. The gray-brown podzolic soil was sampled from the top 7-15 cm of a Norway spruce plantation in Kilkea, Co. Kildare, Ireland. This soil is a silt loam and contains 8.62% organic matter and 0.3% total N; its pH in H_2O is 4.7.

The earthworms were maintained in containers with oak litter and soil from the spruce plantation. The resulting casts were collected. As the casts had a mean organic matter content 1.17% greater than the initial soil, in the non-cast treatments the oak litter was added to soil in such an amount which assured the same organic matter content in the oak litter-soil mixture as that in the casts, *i.e.* 8.62 + 1.17% ≈ 9.8%.

The bags (10 x 10 cm) were made from polyester mono-filament (mesh size: 40 μm) in order to exclude most mesofauna and to reduce the effect of climatic extremes (desiccation or saturation). The litter bags contained 12 g (dry weight equivalent) of casts and oak litter + soil mixtures. They were placed on the surface or buried at 7 cm in the soil of the Douglas fir stand. The experiment began in April 1995 and ended in May 1997. There were nine sampling dates between June 1995 and May 1997.

The samples were analysed for determination of several physical, chemical and microbial parameters. The fluorescein-diacetate hydrolysis (FDAH) activity was also measured.

All parameters exhibited significant changes depending on the sampling date. Overall, organic matter and total C contents, C:N ratio and bacterial counts were significantly higher in the cast than in the two non-cast treatments, whereas there were no significant differences between the treatments for moisture and total N contents, respiration (CO_2 production), fungal length and FDAH activity. Significant differences between the surface-placed and buried litter bags were found only for moisture, organic matter and total N contents, C:N ratio and bacterial counts. No parameter presented significant difference between the litter bags with intact and shredded litter, respectively.

In a complex study of the anecic earthworm *Martiodrilus carimaguensis*, conducted by Jiménez *et al.* [29a], acid phosphatase activity in casts and surrounding soil was also determined. Field and laboratory experiments were performed at the Carimagua experimental station located in the Eastern Plains of Colombia. The site is representative of the well-drained isohyperthermic savanna ecosystems. Samplings were done in a silt-clay Oxisol of low fertility (pH in H_2O 4.80-4.96; total C 23.5-24.9 mg/g soil; total N 1.45-1.67 mg/g soil), during the rainy season, more precisely in the period of May-September 1994.

Two field experiments were carried out on nearby lands, namely on a 2.3-ha herbaceous native savanna dominated by *Andropogon bicornis* and *Trachypogon vestitus* and on an 18-year-old 2-ha introduced (improved) pasture of *Brachiaria decumbens* and *Pueraria phaseoloides*. The pasture was grazed by 1 cattle/ha during the dry season and by 2 cattles/ha during the rainy period.

In the laboratory experiments, soil samples taken from the 0-15-cm layer of the field (native savanna and pasture) plots were introduced into pots (6 kg soil, air-dried and sieved to 2 mm/pot), then amended or not amended with oven-dried, finely ground green plant material from the native savanna and pasture plots, respectively (20 g plant material/kg soil) and inoculated with 12 adult earthworms.

In both field and laboratory experiments, the surface casts corresponding to the ages of 1, 4, 8, 16, 32 and 64 days and the surrounding soil (0-15-cm layer) were submitted to different analyses.

It was found that pH, total C, total P and microbial P contents were significantly ($p<0.001$) higher in the casts than in the soil. Acid phosphatase activity (expressed in mg *p*-nitrophenol/kg soil/hour) had the following mean values in the 1-day-old casts and surrounding soil, in the experiments:

field experiment on native savanna - 312 (casts) and 254 (soil);

field experiment on pasture - 249 (casts) and 299 (soil);

laboratory experiment with native savanna soil sample not amended with green plant material - 120 (casts) and 215 (soil);

laboratory experiment with pasture soil sample not amended with green plant material - 242 (casts) and 313 (soil).

It is evident from these data that the casts were more phosphatase-active than the soil only in a single case: in the field experiment on native savanna. For explaining these observations, one can assume that in the field experiment on pasture and in the laboratory experiments the acid phosphatase and other enzyme molecules were partly degraded during gut transit and/or the mobile inorganic phosphate fraction in the high total P content repressed the biosynthesis of the acid phosphatase molecules. For verification of these assumptions, activities of other enzymes should also be determined, beside the acid phosphatase activity.

Studying the occurrence of acetylesterases in different tissues and in casts of *Eisenia fetida* and *E.andrei*, the specimens of which were collected in Norway, Engelstad and Stenersen [19] applied the method of polyacrylamide gel electrophoresis. Five and four bands (isoenzymes) designated E3-E7 and E4-E7 were distinguished from tissues of *E.fetida* and *E.andrei*, respectively. Only two bands (E3 and E4) were detectable from the casts, namely from casts of only some specimens. But when present in casts, E3 and E4 were highly active acetylesterases. It should be mentioned that the E3 and E4 bands are connected to the gut, whereas the other bands originate from enzymes found in other tissues.

Comparison of enzyme activities in drilosphere (vermisphere) and matrix soil

Stehouwer *et al.* [64] collected *Lumbricus terrestris* burrow lining and bulk soil samples in the autumn of 1990 from a silt-loam soil at the Agricultural Research and Development Center in Wooster, Ohio. The site was planted with soybean in 1990 and had been under no-tillage management for 3 years with a 2-year maize-soybean rotation.

Three undisturbed soil blocks (30 x 30 x 50 cm deep), each containing 7-8 occupied *L. terrestris* burrows were excavated. The burrows (> 5-mm diameter) contained within the soil blocks were excavated and vertically bisected to expose

the inner surface. The burrow lining material (drilosphere) was generally 1 to 2 mm thick. With the aid of 10x magnification lens, the lining material was scraped from 7 depth intervals: 0-5, 5-10, 10-15, 15-20, 20-30, 30-40 and 40-50 cm. Samples of the bulk soil (matrix soil not affected by earthworm activity) were taken from the same depths adjacent to the burrows. Then, the lining material and bulk soil samples were air-dried and sieved (0.42 mm) before determination of their alkaline phosphatase activity, pH, total and water-soluble organic carbon (TOC and WSOC) and clay contents. Atrazine sorption on, and desorption from, lining and bulk soil were also investigated.

Fig. 1 shows that alkaline phosphatase activity in both lining material and bulk soil decreased with depth, but at the same depth it was much higher in the lining material than in the bulk soil. Thus, in the upper 15 cm the activity in the lining material exceeded 2.5 to 6 times that measured in the bulk soil. At 25 to 45 cm, the activity in the lining material was similar to that of the surface bulk soil.

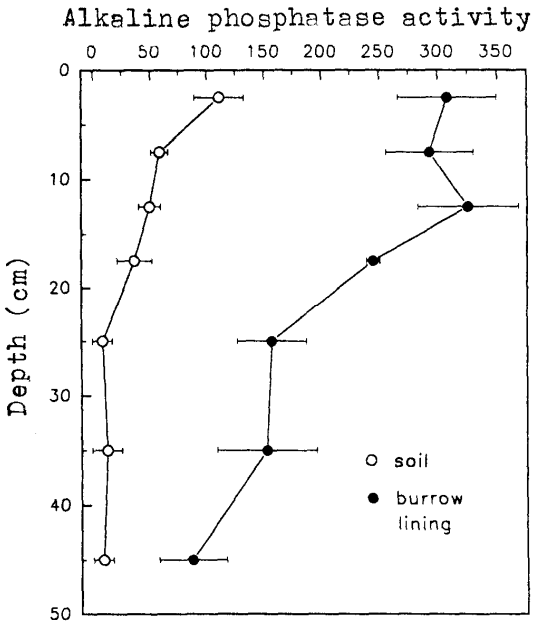


Fig. 1. *Alkaline phosphatase activity of earthworm burrow lining material and bulk soil* [64]. The activity is expressed in *p*-nitrophenol/g soil/hour. The error bars indicate standard deviation.

TOC and WSOC contents, like alkaline phosphatase activity, decreased with depth, but were higher in the lining material than in the bulk soil throughout the profile. In the lining material compared to the bulk soil, pH was lower in the superior part and higher in the inferior part of the profile, and the reverse was true for the clay content.

Sorption of atrazine was greater on burrow linings than on bulk soil at depths from 5 to 45 cm, whereas desorption of atrazine from burrow linings was less than from bulk soil at depths from 5 to 30 cm. These findings corroborated with the finding, that alkaline phosphatase activity as an indicator of overall microbial activity is much higher in the lining material than in the bulk soil, suggest that biodegradation of herbicides sorbed on burrow lining is greater than in the soil matrix at similar depths.

A short report on these investigations was referred to on page 11 in [34], too.

Studying nitrogen transformations in earthworm burrows, Parkin and Berry [54] have examined the drilosphere from burrows of *Lumbricus terrestris* maintained in laboratory and from burrows in no-till plots under continuous, 17-year monoculture of maize, in Ankeny, Iowa. In both laboratory and field experiments, the soil was the same (a fine loam). Non-drilosphere soil (not associated with burrows) served for comparison.

The following chemical, microbial and enzymatic parameters had higher values in the drilosphere than non-drilosphere soil in both laboratory and field experiments: pH, soluble organic C and nitrate contents, numbers of ammonium-oxidising and denitrifying bacteria, rates of nitrification and denitrification, and denitrification enzyme activity.

In the laboratory experiment, the water contents of drilosphere and non-drilosphere soil were not different, but in the field experiment, the drilosphere was significantly wetter than the non-drilosphere soil.

Ammonium content was also higher in the drilosphere than in the non-drilosphere soil in the laboratory experiment and was not different in the field experiment. The number of nitrite-oxidising bacteria in the drilosphere in comparison with that in the non-drilosphere soil was higher in the laboratory experiment and lower in the field experiment.

Thus, the drilosphere is a microenvironment which supports intense microbial transformations of nitrogen.

Jégou *et al.* [29] performed a laboratory experiment for studying the burrow walls of *Lumbricus terrestris* and *Aporrectodea giardi* sampled in Brittany (France). The soil used was sampled from the upper 30 cm of the uncultivated border of an experimental field in Brittany. The soil is a silt loam containing 2.17% organic matter.

After air-drying and sieving (< 4 mm), the soil was rewetted to 20% by weight. It was then artificially compacted into polyvinyl chloride cylinders of 15 cm diameter and 30 cm height. The bulk density of soil in each cylinder was 1.35 g/cm^3.

The soil in each of four + four cylinders was inoculated with one adult *L. terrestris* or *A. giardi*, respectively. A mixture of different grasses from permanent grassland was dried at 35^{0}C, ground and sieved (> 1 mm) and, serving as litter, food for earthworms, it was placed on the soil surface. The cylinders were then kept at 12^{0}C with 12 hours light/day for 70 days. About 50 ml of distilled water was sprayed on the soil surface after every 10 days. At the end of this 70-day incubation period, no litter was visible on the soil surface and all the worms were alive.

After incubation, the burrow walls, defined as a mantle of 1 cm diameter around the burrow lumen, were analysed for determination of their enzyme (acid and alkaline phosphatase and dehydrogenase) activities and C and N contents. The surface casts produced during incubation and the surrounding soil (sampled at least 2 cm away from any structures formed by earthworms) were submitted to the same analyses.

It was found that the three enzyme activities have different patterns in casts, burrow walls and surrounding soil of the two earthworm species. The activities may be characterised by the following orders:

- acid phosphatase activity (pH 6.5): casts ≈ burrow walls ≈ surrounding soil (both earthworm species);
- alkaline phosphatase activity (pH 11): casts ≈ burrow walls > surrounding soil (*L. terrestris*); casts > burrow walls ≈ surrounding soil (*A. giardi)*;
- dehydrogenase activity: casts > burrow walls > surrounding soil (both species).

All activities were higher for *L. terrestris* than for *A. giardi*. Acid phosphatase activity in casts, burrow walls and surrounding soil was insignificantly higher for *L. terrestris* than for *A. giardi*. Alkaline phosphatase activity had significantly ($p < 0.01$) higher value only in the burrow walls of *L. terrestris* than in those of *A. giardi*, while dehydrogenase activity in both casts and burrow walls was significantly higher for *L. terrestris* than for *A. giardi*. It is evident from these findings that dehydrogenase activity indicated most sensitively the differences between the two earthworm species.

The C and N contents in casts, burrow walls and surrounding soil followed the pattern of dehydrogenase activity, but only the N content in casts was significantly ($p < 0.05$) higher for *L. terrestris* than for *A. giardi.*

Comparison of enzyme activities in earthworm middens and surrounding bulk soil

Earthworm middens are small mounds consisting of mixed organic litter, soil and casts; they are formed at the openings of burrows through feeding, burrowing and casting activities of some species of earthworms.

Subler and Kirsch [78] collected samples of soil from earthworm middens and surrounding bulk soil in a maize field on four dates: 16 May, 1, 14 and 29 June 1995, when seasonal earthworm activity was expected to be intense. The maize field was located in Columbus, Ohio, on a silt-loam soil and had been farmed over the past several years using no-tillage in a continuous maize system with high input of dairy cow manure. The field had been abandoned the previous year following the harvest, so it was not replanted to maize during the study period. By the end of this period, moderate vegetative cover had developed, consisting primarily of common weeds.

The earthworm population sampled at the site consisted of *Lumbricus terrestris*, *Lumbricus rubellus* and *Aporrectodea* spp. with ~ 40, ~ 40 and ~ 20% abundance, respectively. There were about 30-50 recognisable middens per m^2, occupying about 15-25% of the total surface area. The diameter of middens ranged from 5 to 11 cm, having an average of about 8 cm.

On each sampling date, 10 middens were collected from within a 10 x 20 m study plot in the maize field. Each midden was sampled to a depth of 10 cm. The samples of bulk soil were taken from the 0-10-cm layer at the same distance (20 cm) from each midden.

The field-fresh midden and bulk soil samples were sieved through a 2-mm mesh. Except for the samples taken on 16 May, the coarse organic litter (> 2 mm) was removed from each sample by hand before sieving, then rinsed free of soil particles with deionised water, oven-dried (60^0C), weighed and analysed for C and N contents.

The sieved soil samples were submitted to several physical, chemical and microbiological analyses. Their dehydrogenase activity was also determined.

The parameters having significantly ($p < 0.05$) higher values in the midden than in the bulk soil *on each sampling date* were:

- soil moisture content (g/g soil);
- coarse organic litter (kg/m^2)*;
- soil C(%) : N (%) ratio;
- microbial biomass-N (mg/kg soil);
- fungal substrate-induced respiration (SIR) (μg CO_2/g soil);
- dehydrogenase activity (μg triphenylformazan/g soil/hour).

Soil C and N (%), ammonium-N (mg/kg soil), total microbial SIR (μg CO_2/g soil) and fungal SIR: total SIR ratio were significantly or insignificantly higher in the midden than in the bulk soil.

Nitrate-N content (mg/kg soil) was the only parameter which had a significantly lower value in the midden than in the bulk soil, namely in the samples taken on 1 June; on the other sampling dates, the differences were not significant.

It is evident from Table 1 that dehydrogenase activity as compared to substrate-induced respiration gave stronger correlations with moisture, total C and total N contents in both midden and bulk soil, taken separately and pooled. The only exception was moisture content in the midden soil.

All the results obtained indicate that the middens are favourable microsites (hot spots) for microbial activity and a reserve of preconditioned food for earthworms.

* But the C and N contents and C:N ratios in the coarse organic litter did not differ significantly between midden and bulk soil.

Table 1

Correlations of dehydrogenase activity and substrate-induced respiration with moisture, total C and total N contents in midden and bulk soil separately and pooled [78]

Content	Dehydrogenase activity			Substrate-induced respiration		
	Midden soil	Bulk soil	Pooled	Midden soil	Bulk soil	Pooled
Moisture	-0.402*	-0.468**	-0.176	-0.497**	-0.296	-0.169
Total C	0.611**	0.608**	0.693**	0.473**	0.525**	0.593**
Total N	0.618**	0.437**	0.595**	0.514**	0.085	0.386**

Significant correlations are indicated by * ($p<0.05$) and ** ($p<0.01$).

Schrader and Seibel [62] studied the hot spot effects of *L. terrestris* middens on micro- and mesofauna, abiotic parameters and enzyme activities in a sandy loam soil on an experimental field of the Federal Biological Research Centre of Agriculture and Forestry in Braunschweig, Germany.

Six plots (24 x 19.5 m) were set up in 1998. Three plots were seeded with faba bean (*Vicia faba*) and other three plots with yellow lupine (*Lupinus luteus*). One of the three plots was unmulched, the second was mulched with wheat straw (0.2 kg/m^2) and the third was cultivated with mustard (*Sinapis alba*) as an intermediate crop during autumn 1997.

Soil was sampled from each plot in 1998, namely before seeding (6 April) and five times during the growth period of the two crops (between 22 May and 14 August). On each sampling date, soil cores (surface area 50 cm^2, depth 0-5 cm) were taken from ten *L. terrestris* middens (10 cores). Similarly, 10 cores were taken from the surrounding soil at least 20 cm from the middens. 7 + 7 cores were used for determination of the abundance of micro- and mesofauna and 3 + 3 cores for determination of abiotic parameters (pH, moisture, total C and N contents), acid and alkaline phosphatase and dehydrogenase activities.

The results have shown that, generally, twice as many individuals of soil micro- and mesofauna were found in the middens than in the surrounding soil.

No significant differences concerning both abiotic parameters and enzyme activities were established between the bean and lupine plots at all. Generally, the enzyme activities were more pronounced in middens than in surrounding soil, but the difference in the same treatment (unmulched or mulched or intermediate crop) was not significant. Contrarily, some significant differences were registered between the unmulched, mulched and intermediate crop treatments. Thus, the soil in the intermediate crop treatment contained significantly ($p < 0.05$) more total N than in the unmulched and mulched treatments. Total C content and alkaline phosphatase activity of both midden and surrounding soil samples were significantly ($p < 0.01$) higher in the mulched and intermediate crop treatments than in the unmulched one.

The conclusion drawn from the results of this field study was that the hot spot effects of *L. terrestris* middens on enzyme activity and fauna in arable soil are supported by crop management (addition of organic mulch to the top soil or cultivation of an intermediate crop).

Comparison of enzyme activities in soils rich and poor in earthworms

Kovalev *et al.* [38] determined urease activity of the arable soil layer in two field experiments carried out for increasing soil fertility (hay production). Plots in the first experiment were set up on a formerly intensely cultivated soddy-podzolic deeply gleyed soil, whereas the plots in the second experiment were installed on a soddy-podzolic gleyed soil used for hay production even before the experiment. The initial soil pH was 6.2 in the first experiment and 6.9 in the second experiment, while the humus content was 1.97 and 3.95%, respectively.

The plots were fertilised with compost, PK and compost + PK or left unfertilised.

The soils were analysed in the July-August periods of 1996 and 1997.

Soil urease activity, like hay yield in both years, was higher in plots of the second experiment than in the corresponding plots of the first experiment. In concordance with these results, the soil was found to be rich in earthworms in the second experiment and poor in the first one.

Comparison of enzyme activities in soil with and without addition of earthworms

Buck *et al*. [14] conducted a laboratory experiment, in which *Lumbricus terrestris* or *Octolasion cyaneum* (representing the anecic and endogeic earthworms, respectively) was added to soil samples previously treated with different mulch types (leaves and straw of barley and lupine, leaves of maize and sugar beet). The soil samples were taken from the Ap horizon of an arable soil in the southern Lower Saxony. The soil is characterised as a gleyic podzoluvisol derived from loess with a texture of loamy silt. The samples were air-dried and sieved; diameter of the sieved aggregates was 1-2 mm. The mulch materials were air-dried and cut into 0.5-1.5-cm fragments.

Microcosms consisting of two parallelly orientated glass sheets were used. The fragmented mulch (2.5 g) was mixed with soil aggregates remoistened to 19-21% water content and the mixtures (525 cm^3) were introduced into the microcosms. The bulk density in microcosms ranged from 1.0 to 1.5 g/cm^3. Then, 0.2 g of mulch was littered on the soil suface and two adult earthworms were inoculated. Each microcosm was kept in a dark climate room at 10^0C for about 4 weeks. Soil samples without worms and without worms and mulch were the controls.

After the ~ 4-week period, the soil and casts were analysed for determination of their nutrient contents (organic C, total N and inorganic P) and acid phosphatase activity measured at pH 6.5.

Nutrient contents were in general higher in casts than in soil, and higher in casts of *L. terrestris* than in those of *O. cyaneum.*

Fig. 2 shows that the acid phosphatase activity exhibited only little changes in the control soils, but it was in general higher in casts than in soils. The activity was increased in the casts of *O. cyaneum* compared to *L. terrestris* in the case of the barley and sugar beet treatments, and the reverse was true in the lupine and maize treatments.

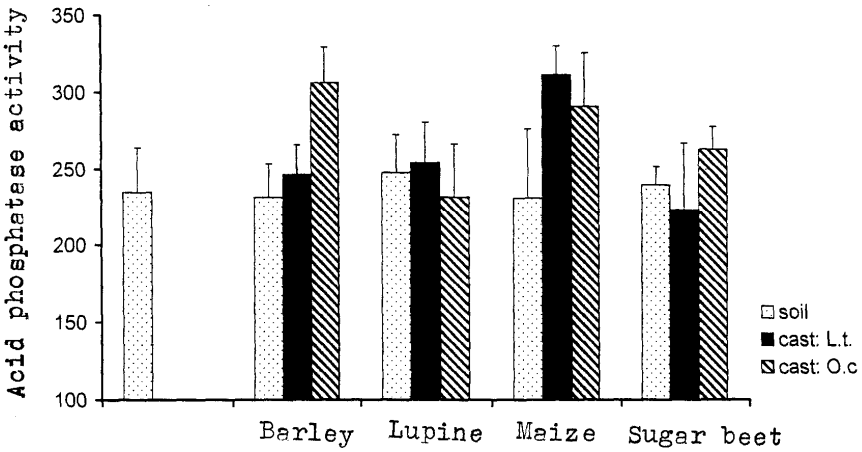


Fig. 2. *Mean values of acid phosphatase activity in soil and casts of* L. terrestris (*L.t.) and* O. cyaneum (*O.c.) depending on the mulch type* [14].
The activity is expressed in μg *p*-nitrophenol/g soil or casts/hour.

It was also established that the correlation between acid phosphatase activity and C:N ratio in casts was positive and significant for *O. cyaneum* and insignificant for *L. terrestris.*

Within this laboratory experiment, Buck *et al.* [15] also studied the effect of soil compaction on the properties of earthworm casts. The uncompacted soil was compared with the compacted soil having bulk densities of 1 and 1.5 g/cm^3. The higher bulk density was obtained by compressing the soil with a stiff plate. Besides acid phosphatase activity (pH 6.5), the alkaline phosphatase (pH 11) and dehydrogenase activities were also measured.

For evaluation of the effect of soil compaction on enzyme activities in casts and soil aggregates, the analytical data registered in the treatments with different mulches were pooled.

Acid and alkaline phosphatase activities of soil aggregates were insignificantly ($p > 0.05$) higher in the compacted than in the uncompacted soil, while dehydrogenase activity was similar in the two soils.

In the uncompacted soil, acid phosphatase and dehydrogenase activities were insignificantly and alkaline phosphatase activity was significantly ($p < 0.05$) higher in casts than in soil aggregates.

In the compacted soil, acid phosphatase activity was insignificantly lower, alkaline phosphatase activity was significantly higher in casts than in soil aggregates, whereas dehydrogenase activity was nearly identical in casts and soil.

Significant difference between enzyme activities in casts of the two earthworm species was registered in a single case: in the uncompacted soil, alkaline phosphatase activity in casts of *O. cyaneum* was significantly higher ($p = 0.042$) than in the casts of *L. terrestris*.

The relative dehydrogenase activity (% of the activity in casts in relation to the soil) increased with the relative water-stable aggregation (% of this aggregation in casts in relation to the soil) in the casts of *L. terrestris* in the uncompacted soil. The increase was linear (in the following order of mulch types: sugar beet < maize < barley < lupine) and significant at $p = 0.0381$. The relationship between relative dehydrogenase activity and relative water-stable aggregation was less strong for casts of *O. cyaneum.*

There was also a linear relationship ($p = 0.084$) between relative alkaline phosphatase activity and relative water-stable aggregation in casts of *O. cyaneum* in compacted soil.

Another finding was that the effect of mulch type was very significant ($p < 0.001$) on dehydrogenase activity, significant ($p < 0.01$) on alkaline phosphatase activity and insignificant ($p > 0.05$) on acid phosphatase activity.

The conclusion which may be drawn from the investigations of Buck *et al.* [14, 15] is that the effect of soil compaction is less important than the mulch quality for the properties of earthworm casts.

Zhang *et al.* [81] added specimens of the anecic earthworm *Metaphire guillelmi* to surface samples (0-10 cm) of a silty loamy clay soil taken from the experimental station of the Agricultural University in Beijing. The soil was air-dried and sieved (< 2 mm). Four parts (volume/volume) of soil were mixed with one part of sieved (< 2 mm) wheat straw compost; the mixture was adjusted to 50% of water-holding capacity and incubated at 25^0C for at least 10 days before starting the experiment.

To pots containing 200-g (dry weight equivalent) samples of the incubated soil-compost mixture, adult earthworms were added at a ratio of 1 g fresh weight worms to every 5 g (dry weight equivalent) soil. After 24 hours at 25^0C, the earthworms were withdrawn. Worm-free soil-compost mixtures were the controls. Enzyme activities in the worm-worked soil (fresh casts) and in the uningested (control) soil were compared. The results obtained are summarised in Table 2.

It is evident from this table that passage of soil through the gut of *M. guillelmi* caused significant decreases in enzyme activities. As the total soil microbial biomass also decreased during the passage with concomitant increase of available nutrients (N and P), the conclusion was drawn that *M. guillelmi* used the soil microorganisms and even the soil enzymes as secondary food resources.

Table 2

Mean values of enzyme activities in soil and fresh casts of Metaphire guillelmi [81]

Analysed material	Enzyme activities*		
	Phosphatase		Protease
	Acid (pH 6.5)	Alkaline (pH 9.0)	
Soil	570 (2.9)	748 (7.3)	29.5 (1.7)
Casts	327 (26.7)	549 (19.7)	17.8 (2.0)
Significance of the difference between soil and casts	$p < 0.001$	$p < 0.001$	$p < 0.01$

* Expression of activities: phosphatase – μg *p*-nitrophenol/g soil/hour; protease – mg tyrosine/g soil/hour.
Standard errors are given in parenthesis.

We consider that the opinion of Zhang *et al.* [81] concerning the degradation of soil phosphatase and protease molecules in the gut of *M. guillelmi* is very interesting and deserves further studies, because the uningested soil was a soil + wheat straw compost mixture and, thus, it contained enzyme molecules present in soil and in compost. It is well documented in the soil enzymological literature that enzymes accumulate in soil in form of enzyme-humic and enzyme-humic-clay mineral complexes in which the enzyme molecules are resistant to proteolytic degradation. Consequently, one can hypothesise that the less resistant compost enzymes were degraded in the gut of *M. guillelmi* and the residual enzyme activities in casts were due to the soil enzymes.

Origin of earthworm cast enzymes

As emphasised in [34], the general opinion is that the enzymes in the earthworm casts originate from two sources: the microorganisms living in gut and casts and the earthworm tissues themselves. Table 3 lists literature data, according to which there are enzymes produced at least partly or not produced at all by tissues of the earthworm species studied, and represents an addendum to the list published in [34].

It is well known that the cholinesterase enzymes play an important physiological role in the animal organisms. Of the studies, in which cholinesterase activity in earthworms was measured or referred to, we quote those described in [2, 25, 39, 57, 59-61, 65-70, 72, 73, 79, 80].

Table 3

Production of enzymes in earthworms

Abbreviation for some earthworm genera: *A. – Allolobophora. D. – Dendrobaena. E. – Eisenia. L. – Lumbricus. O. – Octolasium (Octolasion)*

Enzyme	Earthworm	Examined material	Reference
Enzymes in earthworms produced, at least partly, by earthworm tissues			
Hydrolases. *Hydrolases participating in C-cycle*			
Invertase, amylase, cellulase	*Lampito mauritii, Octochaetona surensis, Drawida calebi*	Supernatant of centrifuged homogenates of the anterior, middle and posterior parts of gut cleaned from its contents	50
Invertase, amylase, cellulase	*Dichogaster bolaui*	Supernatant of centrifuged homogenate of whole worms	50
Acetylesterases, carboxylesterases	*E.fetida (E.fetida typica), E.unicolor (E.fetida unicolor)*	Supernatant of centrifuged homogenate of whole worms and of the anterior and post-clitellate parts of worms	53
Acetylesterases	*E.andrei, E.fetida, E.veneta*	Supernatant of centrifuged homogenate of whole worms and tissue samples	19
Carbohydrases hydrolysing oligosaccharides (maltose, sucrose, laminaribiose), heterosides (α – and β-glucoside, β-N-acetylglucosamine) and polysaccharides (starch, cellulose, laminarin, mannan, galactomannan, lichenin)	*Polypheretima elongata, Pontoscolex corethrurus, Millsonia anomala*	Solution resulting from dialysis of the centrifuged homogenate of gut comprising wall tissues and gut contents, solutions from the *in vitro* tissue cultures of fore-, mid- and hindgut and from the culture media	40
The same as above and cellobiose, gentiobiose; α- and β-galactoside, β-mannoside, β-xyloside; pullulan, carboxymethylcellulose	*Hormogaster elisae*	The same as above	23
Cellulase	*Metaphire guillelmi*	Supernatant of centrifuged homogenate of gut wall and its contents	81
Cellulase	*E.fetida*	Supernatant of centrifuged homogenate of whole worms	81
Hydrolases participating in N-cycle			
Protease	*Lampito mauritii, Octochaetona surensis, Drawida calebi*	Supernatant of centrifuged homogenates of the anterior, middle and posterior parts of gut cleaned from its contents	50

Table 3 (continued)

Enzyme	Earthworm	Examined material	Reference
Urease	*Lampito mauritii, Drawida calebi*	The same as above	50
Protease, urease	*Dichogaster bolaui*	Supernatant of centrifuged homogenate of whole worms	50
Protease	*Metaphire guillelmi*	Supernatant of centrifuged homogenate of gut wall and its contents	81
Protease	*E.fetida*	Supernatant of centrifuged homogenate of whole worms	81
Hydrolases participating in P-cycle			
Acid phosphatase	*L.terrestris*	Midgut	56
Acid phosphatase	*Metaphire guillelmi*	Supernatant of centrifuged homogenate of gut wall and its contents	81
Acid phosphatase	*E.fetida*	Supernatant of centrifuged homogenate of whole worms	81
Oxidoreductases			
Aldrin epoxidase	*L.terrestris*	Microsomal preparation from different tissues	52 See also [70]
Catalase	*L.terrestris*	Chloragogenous tissue	20
Superoxide dismutase	*E.foetida*	Different tissues	51
Cytochrome P-450	*L.terrestris*	Microsomal preparation from midgut	10, 11, 41
Cytochrome P-450	*D.veneta*	The same as above	49
Catalase	*L.terrestris*	Midgut	56
Catalase, glutathione peroxidase, superoxide dismutase	*L.terrestris*	Different tissues	43
Superoxide dismutase	*L.terrestris*	Giant hemoglobin	42
Catalase, superoxide dismutase	*E.fetida E.veneta*	Supernatant of centrifuged homogenate of whole worms and of anterior, middle and posterior parts of the worms	27
Catalase, glutathione peroxidase	*E.fetida andrei*	Supernatant of centrifuged homogenate of whole worms	39
Catalase, glutathione reductase	*E.fetida andrei*	The same as above	58
Catalase, NADH and NADPH cytochrome reductases	*E.fetida andrei*	The same as above	3, 60
Catalase, glutathione reductase, NADH and NADPH cytochrome reductases	*E.fetida andrei*	The same as above	57, 59
Methoxyresorufin-O-deethylase (cytochrome P-450-dependent)	*E.fetida andrei*	The same as above	3, 57, 59, 60

Table 3 (continued)

Enzyme	Earthworm	Examined material	Reference
Transferases			
Glutathione-S-transferase	*E.foetida, L.terrestris, L.rubellus, A.longa, A.caliginosa, A.chlorotica*	Supernatant of centrifuged homogenate of whole worms	74
Glutathione-S-transferase	The same as above and *A.rosea, D.hortensis, O.cyaneum*	The same as above and supernatant of centrifuged homogenates of different organs	76 See also [70, 71]
Glutathione-S-transferase	*E.unicolor*	Supernatant of centrifuged homogenate of whole worms	75
Glutathione-S-transferase	*E.andrei*	The same as above	77
Glutathione-S-transferase	*E.andrei, E.veneta*	The same as above	12
Glutathione-S-transferase	*E.fetida*	The same as above	24
Glutathione-S-transferase	*E.fetida andrei*	The same as above	3, 57-60
Lyases			
δ-Aminolevulinic acid dehydratase	*L.terrestris*	Different tissues	28
Enzymes in earthworms not produced by earthworm tissues			
Hydrolases			
Hydrolases participating in C-cycle			
Cellulase, mannanase	*Pontoscolex corethrurus, Millsonia anomala*	Solutions from the in vitro tissue cultures of fore-, mid- and hindgut and from the culture media	40
Cellulase, mannanase	*Hormogaster elisae*	The same as above	23
Chitinase	*Metaphire guillelmi*	Supernatant of centrifuged homogenate of gut wall and its contents	81
Chitinase	*E.fetida*	Supernatant of centrifuged homogenate of whole worms	81
Hydrolases participating in N-cycle			
Urease	*Octochaetona surensis*	Supernatant of centrifuged homogenates of the anterior, middle and posterior parts of gut cleaned from its contents	50

Enzyme activities and earthworms in urban soils

Broll and Keplin [13] performed a complex study of soils in the city of Dorsten (Northwest-Germany). This study, in which besides determination of some soil chemical parameters and estimation of phytomass, soil urease activity and abundance and biomass of earthworms were also dealt with, has been referred to on page 27 in [35].

Enzyme activities and earthworms in mine spoils submitted to recultivation

The investigations conducted by Scullion and Malik [63] on the effects of earthworms on organic matter, aggregation, microbial and enzyme activity in soils restored after opencast mining of coal in South Wales were briefly reviewed on pages 34-35 in [35].

Enzyme activities in earthworm-worked composts

The compost called Biohumus was analysed enzymologically by Kireeva *et al.* [31]. As specified on page 32 in [37] and on page 31 in [34], this compost was prepared from cattle, pig and horse dungs mixed with sawdust and chopped straw and inoculated with a Californian population of *Eisenia foetida* adapted to farmyard manure, then subjected to maturation for 6 months.

The enzyme activities reported to 1 g of Biohumus had the following values: invertase 12.5 mg glucose; urease 22 mg NH_3; catalase 18 cm^3 O_2/minute; peroxidase and polyphenol oxidase 14.9 and 12.5 mg *p*-benzoquinone, respectively; dehydrogenase 8.7 mg triphenylformazan. pH of the Biohumus was 6.6.

In a review article by Ceccanti *et al.* [17] on the activity and role of humic substances in the environment, changes in enzyme activities during vermicomposting of different organic residues (especially sewage sludges) were also dealt with. β-Glucosidase, N-α-benzoyl-L-argininamide-hydrolysing protease (BAA-protease) and dehydrogenase activities were initially higher than at the end of the vermicomposting process. The activities significantly ($p < 0.05$) correlated with each other and also with the water-soluble C content.

Herrero *et al.* [26] determined alkaline phosphatase activity in 14 organic products (9 composts, 1 vermicompost, 2 manures, 1 sewage sludge and 1 product from green residues). The activity expressed as μg *p*-nitrophenol/g product/hour ranged from 3430 (compost of urban residues from Ador, Valencia, Spain) to 45 (product from green residues), whereas the activity of vermicompost was 745, occupying position 5.

The investigations briefly reviewed on pages 28-29 in [34] were continued by Benítez *et al.* [7 - 9].

In one of the experiments, Benítez *et al.* [7] studied the vermicomposting process in sewage sludges amended with garden refuse artificially contaminated with the carbamate insecticide carbaryl.

The sewage sludges used consisted of a mixture, at 50%, of an anaerobically digested sewage sludge at the wastewater treatment plant of a paper mill factory and an aerobically digested municipal sewage sludge. The mixture (1000 g, fresh weight) was amended, at a ratio of 1:1 (volume/volume), with garden refuse (grass clippings of *Poa* sp. and *Festuca* sp.) artificially contaminated with carbaryl (1-naphthyl methylcarbamate). The initial concentration of carbaryl was 350 mg per kg organic substrate (sewage sludge mixture amended with garden refuse). The control organic substrate was not contaminated with carbaryl.

Plastic containers were filled with the contaminated or with the uncontaminated organic substrate. Then, the top of organic substrate in each container was covered with a layer of composted sewage sludge (100 g, fresh weight) as a microbial inoculum and to provide a suitable earthworm habitat. Ten clitellated *Eisenia foetida* were introduced into this layer. The containers were kept in the darkness at room temperature (20-25^{0}C) and the water content in the organic substrate was maintained at 75-80% during the vermicomposting period which lasted 10 weeks. After this period, the earthworms were removed and the compost in each container was left at room temperature and maintained at 75-80% water content for another, 8-week period to complete the stabilisation of organic matter, *i.e*. for maturation of compost.

During the 10 weeks of vermicomposting, the number and weight of earthworms were determined weekly. Enzymological and chemical analyses were carried out also weekly, during 18 weeks. Activities of four hydrolases (β-glucosidase, urease, BAA-protease, phosphatase) as well as dehydrogenase activity were measured. The chemical analyses comprised determination of water-soluble carbon (WSC), NH_4^+-N, NO_3^--N and PO_4^{3-} contents.

Carbaryl was found to have a strong negative effect on the growth and reproduction of *E. foetida*.

Fig. 3 shows that hydrolase activities tended to decrease during the 18 weeks of the experiment. The effect of carbaryl on the β-glucosidase and phosphatase activities was inhibitory during the whole experimental period, whereas urease activity was inhibited only during the first 2 weeks and BAA-protease activity was reduced during the first 4 weeks. Contrarily, dehydrogenase activity in the carbaryl-contaminated organic substrate increased during the first 4 weeks, then decreased.

WSC, NH_4^+-N and PO_4^{3-} contents decreased and the NO_3^--N content increased during the composting. The ratio between dehydrogenase activity and WSC content, which shows the relation between microbial activity and easily metabolisable organic matter, was higher during the first 4 weeks and lower during the 5-18-week period in the uncontaminated than in the carbaryl-contaminated organic substrate.

In another experiment, Benítez *et al.* [8] used a 50% mixture of the two sewage sludges, but no amendment with garden refuse was applied. The conditions of vermicomposting with *E. foetida* were identical to those described by Benítez *et al.* [7] and briefly reviewed above. Samples were collected weekly during the 10-week

composting and after 18 weeks and analysed for determination of WSC and pyrophosphate-extractable C (PEC) contents as well as extracellular urease activity (activity of the pyrophosphate-extracted humic-urease complexes).

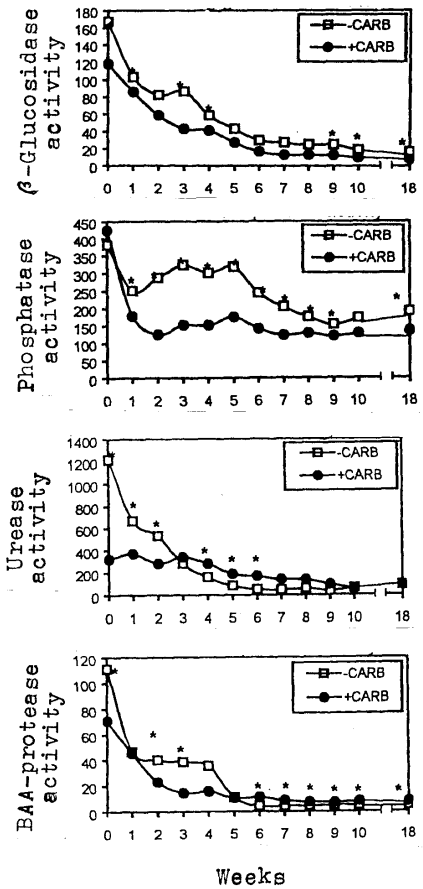


Fig. 3. *Changes in hydrolytic enzyme activities during vermicomposting of sewage sludges amended with garden refuse contaminated with carbaryl (+CARB) or not contaminated (-CARB)* [7].

Expression of enzyme activities: β-glucosidase and phosphatase - μmol *p*-nitrophenol/g/hour; urease and BAA-protease - μmol NH_3/g/hour.

The asterisk denotes a significant difference ($p < 0.05$) at a given time (weeks).

The extracts of the humic-urease complexes from the sewage sludge mixture (*i.e.* before vermicomposting) and from the vermicompost after 18 weeks of the experiment were characterised by analytical isoelectric focusing.

For extraction of PEC and humic-urease complexes an 0.1 M $Na_2P_4O_7$ solution (pH 7.1) was used. It was carried out at 37^0C by shaking for 24 hours, followed by centrifugation at 18,000 rpm, filtering through a 0.22 μm Millipore membrane and dialysis against distilled water.

During the 10-week composting, WSC content decreased to a larger extent than did the PEC content, but the ratio between PEC and WSC showed an increasing trend which indicates that vermicomposting resulted in an increase in the amount of stable, humic substances.

The total extracellular urease activity and the specific urease activity, reported to 1 g of compost and 1 g of humic-C, respectively, increased during the 18 weeks of the experiment, proving that composting resulted in accumulation of stable humic-urease complexes (Fig. 4).

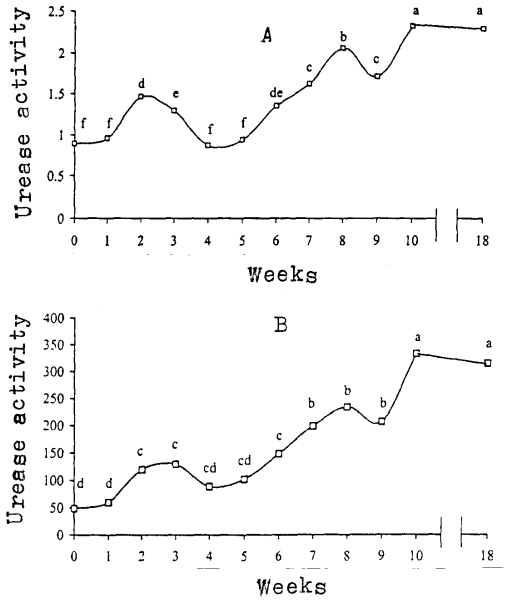


Fig. 4. *Changes in total (A) and specific (B) activity of humic-urease complexes in pyrophosphate extracts during the 18-week experiment for vermicomposting of a mixture of sewage sludges* [8].

Expression of urease activity: total - μmol NH_3/g compost/hour; specific - μmol NH_3/g humic-C/hour.

Activity values with the same letter are not significantly different at $p < 0.05$.

By the isoelectric focusing, 6 urease-active humic bands were evidenced from the sewage sludge mixture, and only 4 such bands from the vermicompost after 18 weeks of the experiment. But these 4 bands exhibited a doubling of the total and a 6-fold increase of the specific urease activity, when the sewage sludge mixture was compared with the vermicompost. This finding also proves the positive effect of vermicomposting on the accumulation of humic-urease complexes.

Benítez *et al.* [9] presented a short report on the vermicomposting of olive cakes at pilot scale. Olive cakes are by-products (remaining after extraction of olive oil). *Eisenia andrei* was used for composting. The olive cakes were applied alone or in combination with cattle manure or municipal biosolids. Each of these substrates in an amount of 64 kg (dry weight) was placed in 1.5-m^2 beds and inoculated with 300 g earthworms. The composting lasted 6 months, during which the number and biomass of earthworms and enzyme (β-glucosidase, urease, BAA-protease, phosphatase and dehydrogenase) activities were periodically determined. In all substrates, the biomass of earthworms increased substantially and dynamics of enzyme activities allowed the monitoring of the vermicomposting process.

Enzyme activities in soils treated with earthworm-worked manures

The results of a field experiment proving the enhancing effect of Biohumus on microbial degradation of hydrocarbons in a crude oil-contaminated Bashkirian grey forest soil and on its invertase, phosphatase, dehydrogenase, catalase, peroxidase and polyphenol oxidase activities and also on the grain yields of oats and barley, as mentioned on pages 32-33 in [37] and on pages 31-32 in [34], were reiterated by Kireeva *et al.* [30, 31].

The field experiments conducted by Baran *et al.* [4] made it possible to compare the soil enzymological effects of farmyard manure, sewage sludges and Biohumus. The sewage sludges were produced from 70% municipal and 30% industrial wastewaters at the wastewater treatment plant in Końskie, Poland. The Biohumus was obtained from these sludges composted with a Californian population of *E. foetida*. Sewage sludges from the wastewater treatment plant in Skarżisko were also used. These sludges originated from 50% municipal and 50% industrial wastewaters.

The soil was a sandy loam. The experiments began in 1993. The manures were mixed into the upper 25-cm soil layer of the experimental plots. The rate of farmyard manure application was 30 t/ha, while the sludges and Biohumus were applied at rates of 1, 2.5, 5, 10 and 20% relative to weight of soil. The control plots received no manure. The test plant was maize in 1993 and spring barley in 1994.

For determination of enzyme activities the 0-25-cm soil layer was sampled from each experimental and control plot, after the harvest in both years.

The activities determined and the results obtained are specified in Table 4.

It is evident from this table that each enzyme activity presented significant variations depending on the year of soil sampling, nature of manure and its rate of application.

The maximum activity values were registered in the soil of plots manured with 10% Biohumus (dehydrogenase, in both years), 20% sewage sludge from Końskie (protease, in 1993), 20% Biohumus (protease, in 1994), 5% Biohumus (phosphatase, in 1993) and control (phosphatase, in 1994). Thus, the most activity-increasing effect was exerted most frequently by Biohumus.

Ceccanti [16] described a laboratory experiment, in which an Italian sandy soil was mulched with sewage sludge colonised by *E. foetida*. After 8 months of this "living mulching", dehydrogenase activity (expressed in μg iodonitrotetrazolium formazan/g dry soil/hour) was 13, while it was only 8.2 in the untreated soil. It was also emphasised that mulching required less water (about 30%) than unmulched soil to keep the soil at 60% of field capacity for 8 months.

In another laboratory experiment, Ceccanti and Masciandaro [18] and Masciandaro *et al.* [44] treated a clayey soil with vermicompost. This soil (pH 7.8; total organic C 11 g and total N 3.03 g/kg dry weight) was sampled from the Ap horizon (0-15 cm depth) at Vicarello, Pisa Province, Italy. The sewage sludge, used for preparation of vermicompost, was a mixture (1:1:1) of two aerobic municipal

sludges and one anaerobic sludge from paper industry. The sewage sludge mixture was inoculated with *E. foetida* (5 kg earthworms/m^3 sludge). The composting process lasted 8-10 months.

Table 4

Enzyme activities in a light soil manured with farmyard manure, sewage sludges and Biohumus [4]

Manure		Enzyme activities*					
		Dehydrogenase		Protease		Phosphatase	
		Year of soil sampling					
		1993	1994	1993	1994	1993	1994
No (control)		2.8	7.2	20.5	17.9	48.2	129.8
Farmyard manure		4.1	8.4	20.9	15.7	55.6	118.6
Sewage sludges, %	1	2.6	8.6	22.5	18.3	51.3	102.9
- Końskie –	2.5	3.0	7.9	23.6	17.7	52.9	102.8
	5	3.0	8.2	26.6	18.3	54.2	94.8
	10	3.0	11.7	36.1	44.5	59.3	64.4
	20	7.3	9.9	67.2	38.5	69.7	83.8
Biohumus, %	1	5.0	5.0	19.2	19.2	118.6	118.6
	2.5	7.8	7.8	19.8	19.8	110.2	110.2
	5	8.7	8.7	20.3	20.3	118.7	118.7
	10	12.8	12.8	21.4	21.4	92.8	92.8
	20	12.5	12.5	49.1	49.1	99.1	99.1
Sewage sludges, %	1	3.1	4.2	23.2	14.2	43.8	75.8
- Skarżisko	2.5	3.0	4.0	26.1	11.8	44.7	81.5
	5	3.1	4.6	28.0	9.0	46.3	47.9
	10	3.5	6.0	26.8	18.1	47.8	81.9
	20	3.8	12.6	26.2	17.9	48.5	76.2
LSD (p=0.01)							
between years		0.03		0.08		0.17	
between manures		0.03		0.08		0.17	
between rates		0.08		0.22		0.50	

* Expression of enzyme activities: dehydrogenase – µg triphenylformazan/g dry soil/24 hours; protease – µg tyrosine/g dry soil/hour; phosphatase – µg *p*-nitrophenol/g dry soil/hour.

The vermicompost used in the laboratory experiment contained 48% water, its pH was 7.7 and its dry matter was characterised by 342 g/kg total organic C and 20.2 g/kg total N contents. It was added to 1-kg (dry weight) soil samples (placed into 21 cm long x 15 cm wide x 5 cm high containers) at a rate of 6% (wet weight/wet weight), corresponding to 90 t vermicompost dry weight/ha. The height of the 1 kg soil in container was 3.5 cm.

The experiment comprised four variants.

In variant I, "living mulch with earthworms", the soil surface was covered with a 1-cm thick vermicompost layer and 30 *E. foetida* were added.

In variant II, "living mulch with grass", the soil surface was covered with a 1-cm thick vermicompost layer, into which 5 g garden cress (*Lepidium sativum*) seeds (~400 seeds/g) were incorporated.

In variant III, the vermicompost was directly incorporated into the soil.

Variant IV was the untreated control.

The incubation was carried out at constant temperature (22±2^{0}C) and soil humidity (60% of field capacity) and lasted 4 months.

After incubation, the vermicompost layer of variants I and II was removed. The soil in variant III was mixed. The soil in each variant was then sieved (< 2 mm) and submitted to physical, chemical and enzymological analyses.

Some of the results are mentioned below.

Total organic C and total N contents in the four variants showed the order: III > II ≈ I > IV.

The order of the three enzyme activities measured was the following (Fig. 5): dehydrogenase - III > IV > II ≈ I; BAA-protease and β-glucosidase - III > IV > II > I.

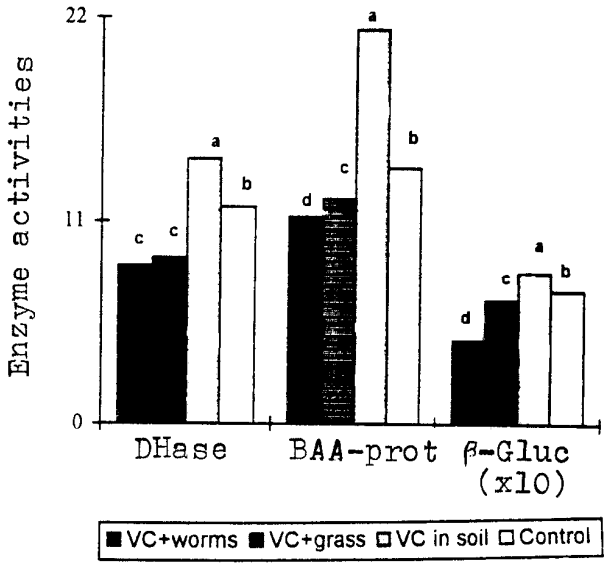


Fig. 5. *Enzyme activities after a 4-month laboratory incubation of a clayey soil treated with vermicompost (VC) or not treated (control)* [44].
Expression of enzyme activities: dehydrogenase (DHase) - μg iodonitrotetrazolium formazan/g dry soil/hour; BAA-protease (BAA-prot) - mmol NH_3/g dry soil/hour; β-glucosidase (β-Gluc) - mmol *p*-nitrophenol/g dry soil/hour.
For each enzyme activity, the same letters indicate no significant differences (at $p < 0.05$) between the experimental variants.

Thus, the soil was most enzyme-active in variant III, and it was more enzyme-active in variant II than in variant I. Although these orders would indicate that direct incorporation of vermicompost into the soil was more efficient than the two living mulch systems, and the living mulch with grass was more efficient than that with earthworms, we should take into consideration that after the 4-month incubation, but before the enzymological analysis, the vermicompost layer was removed from variants I and II and, thus, in these variants the soil alone was analysed and not the soil + vermicompost mixture as in variant III. In concordance with this viewpoint, it was found that before the laboratory experiment dehydrogenase activity expressed in μg iodonitrotetrazolium formazan/g dry matter/hour was 15.6 in vermicompost and only 1.75 in soil.

The activities significantly ($p < 0.001$) correlated with each other and with the ratio of soluble C/soluble N ($NH_4^+ + NO_3^-$). Dehydrogenase and BAA-protease activities gave similar correlations with the ratio of total organic C/total N. Correlations were also found between the enzyme activities and the area occupied on the soil surface by the cracks having medium dimensions (500-1000 μm in diameter, corresponding to pores with intermediate sizes of 50-200 μm), which create favourable conditions for circulation of air, water and nutrients.

Masciandaro *et al.* [44] performed this laboratory experiment also with a sandy loam soil, sampled from the 0-15-cm layer, in Murcia, Spain. This soil (pH 8.8) was poorer in total organic C (5.8 g/kg dry weight) and total N (0.39 g/kg dry weight) and less dehydrogenase-active (0.825 μg iodonitrotetrazolium formazan/g dry weight/hour) than the clayey soil.

The enzyme activities of the sandy loam soil presented, in the four experimental variants, the orders (Fig. 6): dehydrogenase - III > II > IV ≈ I; BAA-protease - II ≈ III > I > IV; β-glucosidase - III > II > I ≈ IV. Thus, the generalised order of activities was again: III > II > I ≥ IV.

The correlations of enzyme activities with each other and with some other soil parameters were similar to those found in the clayey soil.

Masciandaro *et al.* [45] compared the effects of vermicompost and fertirrigation treatments on some soil chemical parameters and enzyme activities. The effect of fertirrigation on plant growth was also studied.

The vermicompost used was prepared as described in [18, 44] and briefly characterised above.

The water used for fertirrigation was a partially purified wastewater (from a municipal sewage plant) amended with humic substances extracted with a neutral pyrophosphate solution from vermicompost.

The soil studied is a silty-clay loam (pH 8.2; total organic C 9.1 g and total N 2.3 g/kg dry weight; dehydrogenase activity 0.9 μg iodonitrotetrazolium formazan/g dry weight/hour). It was sampled at Matera (Contrada Serra d'Alto, Italy).

Both vermicompost and fertirrigation experiments were carried out at constant laboratory temperature and soil humidity (60% of water-holding capacity) and lasted one month. In both experiments, 1-kg soil samples were placed in vegetation pots.

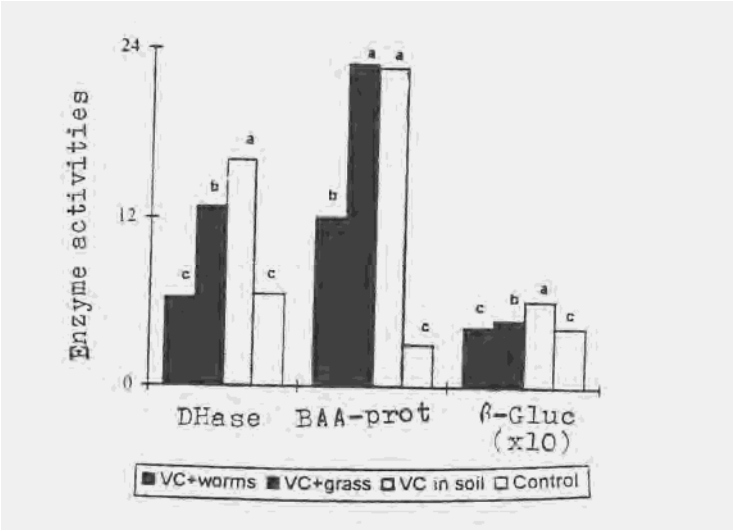


Fig. 6. *Enzyme activities after a 4-month laboratory incubation of a sandy loam soil treated with vermicompost (VC) or not treated (control)* [44].
For expression of enzyme activities and significance of differences see Fig. 5.

Vermicompost at a rate of 100 g fresh weight was directly incorporated into the soil (*variant VC*).

The humic substances (humic fraction of molecular weight > 10^4) were added to the partially purified wastewater at a rate of 50 mg humic-C/l. During the 1-month incubation, this water was added to the soil many times in a total amount of 1l/pot (*variant IH*).

The controls were: soil irrigated with the partially purified wastewater not amended with humic substances (*variant I*); soil irrigated with distilled water amended with humic substances (*variant DH*) or not amended (*variant D*); soil not treated with vermicompost and not irrigated (*variant 0*).

In the fertirrigation experiments, the soil was seeded with oats (*Avena sativa*) (~ 100 seeds/pot).

Some of the results of analyses performed after the 1-month incubation will be emphasised below.

Electrical conductivity, Cl^-,NO_3^-, SO_4^{2-}, NH_4^+, total organic C and total N contents of soil were significantly higher ($p < 0.05$) in variant VC than in the other variants. But both dehydrogenase and BAA-protease activities, like shoot, root and total weights of oat plants, were significantly highest in the soil of variant IH, whereas β-glucosidase activity exhibited no significant differences among the variants. The soil of variant DH was the significantly richest soil in water-soluble organic C, which was not significantly different in soils of variants VC and IH.

After the 1-month incubation, the soils of all variants were submitted to testing with garden cress (*Lepidium sativum*) to evaluate their nutrient contents and potential phytotoxicity. It was found that the soil in variant VC, followed by the soil of variant IH, were the best for germination of seeds and growth of shoots.

The conclusion could be drawn that vermicompost and partially purified wastewaters amended with humic substances are valuable fertilisers.

Masciandaro *et al.* [46] dealt with vermicomposting of sewage sludges directly on the soil (*in situ*).

The soil (a sandy loam) was collected from Peccioli (Pisa). Soil samples (equivalent to 1 kg dry weight) were placed into plastic containers (15 x 10 x 6 cm).

The sludges (containing about 40% dry matter) were applied in an amount of 0.5 kg (wet weight) inoculated with 10 adult *E. fetida* worms on the soil surface as an about 3-cm thick layer. The sludges applied consisted of anaerobic and aerobic sludges, respectively, in the following percent proportions: 0 + 100; 25 + 75; 50 + 50; 75 + 25; 100 + 0.

The incubation, which took place at laboratory temperature (20-25^{0}C) and at soil water content of 60% of field capacity, lasted 4 months.

After incubation, the sludge layer was removed, the soil was sieved (< 2 mm) and analysed for determination of some physical and chemical parameters. Dehydrogenase activity was also measured.

We only mention that dehydrogenase activity and its ratio to water-soluble organic C content decreased with increasing proportion of the anaerobic sludge in the sludge mixture. However, dehydrogenase activity/water-soluble organic C was considered high and the growth of garden cress plants, studied after the 4-month incubation, was promoted when the anaerobic sludge did not exceed 50% in the sludge mixture.

Masciandaro *et al.* [47] conducted field experiments to compare the effect of fertilisers on the kinetic parameters of dehydrogenase activity in a sandy-clay soil (pH 6.5; total organic C 0.95%; total N 0.085%) located in Castelvecchio di Compito (Tuscany).

The experiments comprised 4 variants, in which the fertilisers were: I. vermicompost (VC); II. ammonium phosphate (AP) + urea (U); III. VC + AP + U; IV. unfertilised control.

The experimental plots were of 100 m^2 (10 x 10 m). The test plant was maize (*Zea mays*).

Rate of fertiliser addition was: I. 8000 kg VC fresh weight/ha, giving 1240 kg C and 120 kg N dry weight/ha; II. AP + U, giving 128 kg N and 92 kg P/ha; III. 4000 kg VC fresh weight/ha, giving 620 kg C and 60 kg N dry weight/ha and AP + U, giving 64 kg N and 46 kg P/ha.

VC was incorporated into the top 15 cm of soil 4 weeks before sowing, whereas AP + U were applied to the soil surface 4 weeks after sowing.

Soil was sampled from the 0-15-cm layer of each plot 32 weeks after maize harvesting, corresponding to exactly 1 year after sowing. The soil samples were air-dried and sieved (< 2 mm), then used for determination of kinetic parameters (V_{max} and K_m) of dehydrogenase activity and also for chemical analyses.

One can deduce from Table 5 that V_{max}, which represents the "quantity" of enzymes, markedly increased in the soil fertilised with VC and VC + AP + U, indicating that the organic matter in VC caused an increase in dehydrogenase in active microbial biomass. This is why significant correlations ($p < 0.05$) were found between V_{max} and dehydrogenase activity, dehydrogenase activity/water-soluble organic C and organic matter content.

Table 5

Kinetic parameters (V_{max} and K_m) of soil dehydrogenase activity 1 year after fertilisation [47]

Fertiliser	V_{max} (nmol INTF/g soil/hour)	K_m (mM INT)
No (control)	1.06 c	3.95 b
Vermicompost	2.65 a	4.35 b
Vermicompost + ammonium phosphate + urea	1.63 b	8.70 a
Ammonium phosphate + urea	0.76 c	7.90 a

INTF: iodonitrotetrazolium formazan.
INT: 2-(*p*-iodophenyl)-3-(*p*-nitrophenyl)-5-phenyltetrazolium chloride.
Values followed by the same letter in the same column are not significanty different at $p < 0.05$.

K_m, representing enzyme-substrate affinity and/or different sources of enzyme, was similar in VC-fertilised and control soil, while it doubled when the fertilisers were VC + AP + U and AP + U. These results suggest that VC did not alter the enzyme-substrate affinity, while AP + U reduced this affinity or changed the composition and activity of soil microbiota.

Benítez *et al.* [5, 6] used olive cakes, not composted or vermicomposted, as organic mulches in a greenhouse experiment, in 1-l plastic pots, containing 500 g of a degraded, calcareous, clayed soil (pH 7.5). The test plant was pepper (*Capsicum annuum*).

Six substrates were applied as organic mulches: dry olive cake (C), dry olive cake and cattle manure mixed at a ratio of 8:1 (CM); dry olive cake and municipal biosolids (from the municipal wastewater treatment plant in Granada, Spain) used at a ratio of 8:1 (CB) and these three substrates after their previous vermicomposting with *Eisenia andrei* for 160 days (VC, VCM and VCB).

The mulches were spread evenly over the soil (depth 2 cm) at a rate of 30 g per pot. The control soil was not treated with mulch. Three pregerminated seeds of pepper were sown in each pot and a thin layer of perlite (1.5 cm) was placed over the surface.

The soil was irrigated daily to field capacity with distilled water. The pepper plants were harvested 80 days after sowing. Rhizosphere soil was then collected and analysed for determination of urease, phosphatase and dehydrogenase activities.

Urease activity of the rhizosphere was lower in five of the six mulched variants than in the rhizosphere of control. The decrease was more pronounced in the three non-vermicomposted mulches than in VC (vermicomposted cake) and VCM (vermicomposted cake-manure mixture), whereas in VCB (vermicomposted cake-biosolid mixture) urease activity exceeded, although insignificantly, the activity measured in the rhizosphere of control.

Phosphatase and dehydrogenase activities had significantly ($p < 0.05$) higher values in the rhizosphere soil of each mulched variant than in that of the control. At the same time, phosphatase activity was significantly higher in the three vermicomposted variants than in the three non-vermicomposted ones, but dehydrogenase activity did not show any significant differences between the vermicomposted and non-vermicomposted variants.

The maximum value of each activity was registered in different variants: urease activity, as already mentioned, was highest in VCB, phosphatase activity in VC and dehydrogenase activity in CB.

Leaf area (cm^2), leaf and stem weights (g dry matter) of pepper plants were highest, their growth was promoted to the largest extent in variants CB and VCM. All mulches, vermicomposted or not, increased total P and K concentrations (mg/kg) in the pepper leaves. In contrast, total N concentration was unaffected.

Based on all findings, it was suggested that dry olive cakes, alone or in mixtures with other N-rich organic wastes, should be vermicomposted prior to use in degraded soils as mulches for horticultural plants.

Herrero *et al.* [26] determined alkaline phosphatase activity in 14 organic products, including one vermicompost (briefly referred to on page 19 of our present article) and used them as fertilisers in a greenhouse experiment, which lasted 4 months.

Two-kg samples of a sandy loam soil (pH 8.37; organic matter 2.27%) were placed in 16-cm wide pots and mixed with organic fertilisers applied at rates equivalent to 25 and 50 t dry weight/ha, then sown with perennial ryegrass (*Lolium perenne*) (50 g seeds/m^2). There were also experimental variants, in which the soil was fertilised with ammonium sulphate at rates of 50, 100, 200 and 300 kg N/ha. The control soil received no fertiliser.

During the experiment, the pots were routinely watered with deionised water. The ryegrass was first cut 20 days after sowing and then every 12 days. Fresh and dry weights of plant samples were determined. Soil was sampled at the end of the experiment.

We only specify the results obtained in the control soil and in the two soils fertilised with the two rates of vermicompost. All values indicate increases in the two vermicomposted soils. Thus, fresh weight (g plant/pot) increased from 34.8 to 50.2 and 56.0; dry weight (g plant/pot) from 5.32 to 7.35 and 7.92; NH_4^+-N (mg/kg soil) from 8 to 54 and 20; NO_3^--N (mg/kg soil) from 11 to 14 and 44; alkaline phosphatase activity (μg *p*-nitrophenol/g soil/hour) from 130 to 161 and 165; dehydrogenase activity (μg triphenylformazan/g soil) from 69 to 68 and 77.

Most of the other fertilisers also exerted a positive effect on ryegrass production and soil parameters.

Albiach *et al.* [1] conducted a 5-year field experiment (1989 - 1994) on a sandy silty loam soil (pH 8.18; organic matter 1.25%) at Moncada (Valencia, Spain) to study the effect of 5 organic residues on 5 soil enzyme activities and microbial biomass-C content.

The organic residues and their rates of yearly application on 4.8 x 12-m plots were the following: municipal solid waste compost (24 t/ha); anaerobically digested sewage sludge (24 t/ha); ovine manure (24 t/ha); commercial vermicompost (2.4 t/ha) prepared from ovine manure; commercial humic acid solution (100 l/ha). Mineral fertilisers were also applied yearly to all plots; they were ammonium sulphate (250 kg N/ha), calcium superphosphate (120 kg P_2O_5/ha) and potassium sulphate (250 kg K_2O/ha).

The control plots received no fertiliser.

In the 4th and 5th years of the experiment, soil was sampled from the 0-15-cm depth for determination of urease, alkaline phosphatase, phosphodiesterase, arylsulphatase and dehydrogenase activities and microbial biomass-C content.

In both years, each enzyme activity was lower in the control soil and in the soils fertilised with the commercial products (vermicompost and humic acid solution) than in the soils fertilised with the other organic residues. The most enzyme-active soil was that fertilised with the municipal solid waste compost. The lack of activity-increasing effect of the two commercial products was probably due to the excessively low rates (only 2.4 t/ha/year and only 100 l/ha/year, respectively) their manufacturers are obliged to recommend if they want the products to be sold.

The microbial biomass-C content was more variable than were the enzyme activities, and was not increased by the two commercial products, but increased by the other organic residues.

Perucci *et al.* [55] performed a laboratory experiment for studying the effects of two herbicides and vermicompost on respiration, microbial biomass, acid and alkaline phosphatase and fluorescein-diacetate hydrolysis (FDAH) activities of a silty sandy loam soil sampled from the 0-20-cm layer (pH 7.2; organic matter 2.58%; total N 0.08%).

The herbicides were rimsulfuron and imazethapyr applied at field rate (15 and 50 g/ha, respectively) and at 10-fold field rate. The vermicompost, prepared from municipal sewage sludge, contained 57.1% organic matter and was applied at a rate equivalent to 0.25 t organic matter per ha.

Untreated (control) soil samples and samples treated only with herbicides or vermicompost served for comparison.

The incubation was carried out at 22^0C and lasted 30 days, during which the soil respiration was determined several times, whereas the microbial biomass-C and -N contents and the enzyme activities were measured after 7, 14 and 30 days of incubation.

Some of the results will be pointed out.

Mean values of soil respiration in the different treatments presented the order: rimsulfuron at 10-fold field rate < control = rimsulfuron at field rate = imazethapyr at field rate = imazethapyr at 10-fold field rate < all vermicompost treatments.

The microbial biomass-C and -N contents and acid and alkaline phosphatase activities were higher in the vermicompost-treated than in the control soil samples, whereas there was no difference in FDAH activities between the vermicompost-treated and control samples.

All these microbial and enzymatic parameters in both vermicompost-treated and non-treated soil samples were affected by the two herbicides studied. Their effects depended on their nature and rates and also on incubation time, and were, in general, negative.

Conclusions. Comparison of the present Part V of "Advances in Soil Enzymology" with our initial review article on "Soil enzyme activities as influenced by earthworms" published in 2000 [34] convincingly shows that the earthworm-related soil enzymological investigations, on which the first paper was published in 1957 [32], have largely developed in the last period.

REFERENCES

1. Albiach, R., Canet, R., Pomares, F., Ingelmo, F., *Microbial biomass content and enzymatic activities after the application of organic amendments to a horticultural soil*, "Bioresource Technol.", **75**, 2000, 43-48.
2. Andersen, R.A., Aune, T., Barstad, J.A.B., *Characteristics of cholinesterase of the earthworm* Eisenia foetida, "Comp. Biochem. Physiol.", **61 C**, 1978, 81-87.
3. Arnaud, C., Saint-Denis, M., Narbonne, J.F., Soler, P., Ribera, D., *Influences of different standardised test methods on biochemical responses in the earthworm* Eisenia fetida andrei, "Soil Biol. Biochem.", **32**, 2000, 67-73.
4. Baran, S., Furczak, J., Gostkowska, K., *Aktywnońć enzymatyczna gleby lekkiej użyżnionej odpadami organicznymi*, "Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.", No. 437, 1996, 69-77.
5. Benítez, E., Melgar, R., Sainz, H., Gómez, M., Nogales, R., *Urease and dehydrogenase activities in rhizosphere of pepper grown with olive cake mulches*, in Dick, R.P. (Ed.), *Enzymes in the Environment: Activity, Ecology and Applications, Abstr. Int. Conf.* (Granada, Spain, 1999), 1999, p. 43.
6. Benítez, E., Melgar, R., Sainz, H., Gómez, M., Nogales, R., *Enzyme activities in the rhizosphere of pepper* (Capsicum annuum *L.) grown with olive cake mulches*, "Soil Biol. Biochem.", **32**, 2000, 1829-1835.
7. Benítez, E., Nogales, R., Elvira, C., Masciandaro, G., Ceccanti, B., *Enzyme and earthworm activities during vermicomposting of carbaryl-treated sewage sludge*, "J. Environ. Qual.", **28**, 1999, 1099-1104.
8. Benítez, E., Nogales, R., Masciandaro, G., Ceccanti, B., *Isolation by isoelectric focusing of humic-urease complexes from earthworm* (Eisenia fetida)*-processed sewage sludges*, "Biol. Fert. Soils", **31**, 2000, 489-493.

9. Benítez, E., Sainz, H., Melgar, R., Nogales, R., *Monitoring enzymatic activities during olive cake vermicomposting at pilot scale*, in Dick, R.P. (Ed.), *Enzymes in the Environment: Activity, Ecology and Applications, Abstr. Int. Conf.* (Granada, Spain, 1999), 1999, p. 63.
10. Berghout, A.G., Büld, J., Wenzel, E., *The cytochrome P-450-dependent monooxygenase system of the midgut of the earthworm* Lumbricus terrestris, "Eur. J. Pharmacol.", **183**, 1990, 1885-1886.
11. Berghout, A.G., Wenzel, E., Büld, J., Netter, K.J., *Isolation, partial purification, and characterization of the cytochrome P-450-dependent monooxygenase system from the midgut of the earthworm* Lumbriculs terrestris, "Comp. Biochem. Physiol.", **100 C**, 1991, 389-396.
12. Borgeraas, J., Nilsen, K., Stenersen, J., *Methods for purification of glutathione transferases in the earthworm genus* Eisenia, *and their characterization*, "Comp. Biochem. Physiol.", **114 C**, 1996, 129-140.
13. Broll, G., Keplin, B., *Bodenökologische Untersuchungen auf städtischen Grünflächen*, "Verh. Ges. Ökol.", **24**, 1995, 385-389.
14. Buck, C., Langmaack, M., Schrader, S., *Nutrient content of earthworm casts influenced by different mulch types*, "Eur. J. Soil Biol.", **35**, 1999, 23-30.
15. Buck, C., Langmaack, M., Schrader, S., *Influence of mulch and soil compaction on earthworm cast properties*, "Appl. Soil Ecol.", **14**, 2000, 223-229.
16. Ceccanti, B., *How to improve soil fertility saving water resources*, in *Optimization of Water in Agriculture, Proc. Reg. Seminar* (Amman, Jordan, 1994), 1994, pp. 133-146.
17. Ceccanti, B., García, C., Nogales, R., Benítez, E., Masciandaro, G., *Attività e ruolo delle sostanze umiche nell'ambiante: aspetti chimico-strutturali e biochimici*, in De Nobili, M., Leita, L. (Eds.), *Dal Suolo alla Pianta, dalla Pianta al Suolo. Le Sostanze Umiche come Base della Sostenibilità, Proc. Convegno Naz. Capitolo Ital. IHSS* (Udine, 1996), 1997, pp. 1-9.
18. Ceccanti, B., Masciandaro, G., *Controllo della funzionalità biochimica di un suolo argilloso mediante interventi "living mulch": studio di laboratorio*, "Boll. Soc. Ital. Sci. Suolo, N.S.", No. 8, 1996, 221-231.
19. Engelstad, F., Stenersen, J., *Acetylesterase pattern in the earthworm genus* Eisenia (Oligochaeta, Lumbricidae): *implications for laboratory use and taxonomic status*, "Soil Biol. Biochem.", **23**, 1991, 243-247.
20. Fischer, E., Horváth, I., *Evidence of the presence of extraperoxisomal catalase in chloragogen cells of the earthworm* Lumbricus terrestris *L.*, "Histochemistry", **56**, 1978, 165-171.
21. Flegel, M., Schrader, S., *Importance of food quality on selected enzyme activities in earthworm casts* (Dendrobaena octaedra, Lumbricidae), "Soil Biol. Biochem.", **32**, 2000, 1191-1196.
22. Flegel, M., Schrader, S., Zhang, H., *Influence of food quality on the physical and chemical properties of detritivorous earthworm casts*, "Appl. Soil Ecol.", **9**, 1998, 263-269.
23. Garvin, M.H., Lattaud, C., Trigo, D., Lavelle, P., *Activity of glycolytic enzymes in the gut of* Hormogaster elisae (Oligochaeta, Hormogastridae), "Soil Biol. Biochem.", **32**, 2000, 929-934.
24. Grelle, C., Descamps, M., *Heavy metal concentration by* Eisenia fetida *and its effects on glutathione-S-transferase activity*, "Pedobiologia", **42**, 1998, 289-297.
25. Gupta, S.K., Sundararaman, V., *Correlation between burrowing capability and acetyl-cholinesterase activity in the earthworm* Pheretima posthuma *on exposure to carbaryl*, "Bull. Environ. Contam. Toxicol." **46**, 1991, 859-865.

26. Herrero, O., Canet, R., Albiach, R., Pomares, F., *Enzymatic activities and content of mineral nitrogen in soil after the application of two rates of different organic products*, "Agrochimica", **42** (6), 1998, 296-303.
27. Hønsi, T.G., Hoel, L., Stenersen, J.V., *Non-inducibility of antioxidant enzymes in the earthworms* Eisenia veneta *and* E. fetida *after exposure to heavy metals and paraquat*, "Pedobiologia", **43**, 1999, 652-657.
28. Ireland, M.P., Fischer, E., *Effect of Pb^{++} on Fe^{+++} tissue concentrations and delta-aminolevulinic acid dehydratase activity in* Lumbricus terrestris, "Acta Biol. Acad. Sci. Hung.", **29**, 1978, 395-400.
29. Jégou, D., Schrader, S, Diestel, H., Cluzeau, D., *Morphological, physical and biochemical characteristics of burrow walls formed by earthworms*, "Appl. Soil Ecol.", **17**, 2001, 165-174.
29a. Jiménez, J.J., Cepeda, A., Decaëns, T., Oberson, A., Friesen, D.K., *Phosphorus fractions and dynamics in surface earthworm casts under native and improved grasslands in a Colombian savanna Oxisol*, "Soil Biol. Biochem.", **35**, 2003, 715-727.
30. Kireeva, N.A., Novoselova, E.I., Yamaletdinova, G.F., *Aktivnost' oksidoreduktaz v neftezagryaznennykh i rekul'tiviruemykh pochvakh*, "Agrokhimiya", No. 4, 2001, 53-60.
31. Kireeva, N.A., Vodop'yanov, V.V., Miftakhova, A.M., *Biologicheskaya Aktivnost' Neftezagryaznennykh Pochv*, Izd. Gilem, Ufa, 2001.
32. Kiss, I., *A gilisztaürülék és hangyabolyföld invertázaktivitása*, "Agrokém. Talajtan", **6**, 1957, 65-68.
33. Kiss, S., *Enzymology of soils inoculated with microorganisms*, "Stud. Univ. Babeş-Bolyai, Biol.", **44** (1-2), 1999, 3-44.
34. Kiss, S., *Soil enzyme activities as influenced by earthworms*, "Stud. Univ. Babeş-Bolyai, Biol.", **45** (1), 2000, 3-38.
35. Kiss, S., *Advances in soil enzymology (Part I-III)*, "Stud. Univ. Babeş-Bolyai, Biol.", **46** (1), 2001, 3-48.
36. Kiss, S., *Advances in soil enzymology (Part IV)*, "Stud. Univ. Babeş-Bolyai, Biol.", **48** (1), 2003, 3-24.
37. Kiss, S., Paşca, D., Drăgan-Bularda, M., *Enzymology of Disturbed Soils*, Elsevier, Amsterdam, 1998.
38. Kovalev, N.G., Rabinovich, G.Yu., Tukan, B.V., *Biologicheskaya aktivnost' zaluzhaemykh pochv pri vnesenii udobrenii*, "Melior. Vodn. Khoz." (Moskva), No. 4, 1999, 38-39.
39. Labrot, F., Ribera, D., Saint-Denis, M., Narbonne, J.F., In vitro *and* in vivo *studies of potential biomarkers of lead and uranium contamination: lipid peroxidation, acetylcholinestrase, catalase and glutathione peroxidase activities in three non-mammalian species*, "Biomarkers", **1**, 1996, 21-28.
40. Lattaud, C., Locati, S., Mora, P., Rouland, C., Lavelle, P., *The diversity of digestive systems in tropical geophagous earthworms*, "Appl. Soil Ecol.", **9**, 1998, 189-195.
41. Liimatainen, A., Häninnen, O., *Occurrence of cytochrome P-450 in the earthworm* Lumbricus terrestris, in Hietanen, E., Latinen, M., Häninnen, O. (Eds.), *Cytochrome P-450. Biochemistry, Biophysics and Environmental Implications*, pp. 255-258, Elsevier, Amsterdam, 1982 (as cited in [57, 60, 70, 71]).
42. Liochev, S.I., Kuchumov, A.R., Vinogradov, S.N., Fridovich, I., *Superoxide dismutase activity in the giant hemoglobin of the earthworm*, Lumbricus terrestris, "Arch. Biochem. Biophys.", **330**, 1996, 281-284.

43. Lovas, M., Szabó, L., Matkovics, B., Fischer, E., *Seasonal antioxidant enzyme changes in earthworm* (Lumbricus terrestris) *parts*, "Comp. Biochem. Physiol.", **87 C**, 1987, 63-64.
44. Masciandaro, G., Ceccanti, B., García, C., *Changes in soil biochemical and cracking properties induced by "living mulch" systems*, "Can. J. Soil Sci.", **77**, 1997, 579-587.
45. Masciandaro, G., Ceccanti, B., García, C., *Soil agro-ecological management: fertirrigation and vermicompost treatments*, "Bioresource Technol.", **59**, 1997, 199-206.
46. Masciandaro, G., Ceccanti, B., García, C., *"In situ" vermicomposting of biological sludges and impacts on soil quality*, "Soil Biol. Biochem.", **32**, 2000, 1015-1024.
47. Masciandaro, G., Ceccanti, B., Ronchi, V., Bauer, C., *Kinetic parameters of dehydrogenase in the assessment of the response of soil to vermicompost and inorganic fertilisers*, "Biol. Fert. Soils", **32**, 2000, 474-483.
48. McInerney, M., Bolger, T., *Decomposition of* Quercus petraea *litter: influence of burial, comminution and earthworms*, "Soil Biol. Biochem.", **32**, 2000, 1989-2000.
49. Milligan, D.L., Babish, J.G., Neuhauser, E.F., *Noninducibility of cytochrome P-450 in the earthworm* Dendrobaena veneta, "Comp. Biochem. Physiol.", **85 C**, 1986, 85-87.
50. Mishra, P.C., Dash, M.C., *Digestive enzymes of some earthworms*, "Experientia", **36**, 1980, 1156-1157.
51. Moment, G.B., Tolmasoff, J.M., Cutler, R.G., *Superoxide dismutase, thermal respiratory acclimation, and growth in an earthworm*, Eisenia foetida, "Growth", **44**, 1980, 230-234.
52. Nelson, P.A., Stewart, R.R., Morelli, M.A., Nakatsugawa, T., *Aldrin epoxidation in the earthworm* Lumbricus terrestris *L.*, "Pestic. Biochem. Physiol.", **6**, 1976, 243-253.
53. Øien, N., Stenersen, J., *Esterases of earthworms. III. Electrophoresis reveals that* Eisenia fetida *(Savigny) is two species*, "Comp. Biochem. Physiol.", **78 C**, 1984, 277-282.
54. Parkin, T.B., Berry, E.C., *Microbial nitrogen transformations in earthworm burrows*, "Soil Biol. Biochem.", **31**, 1999, 1765-1771.
55. Perucci, P., Dumontet, S., Bufo, S.A., Mazzatura, A., Casucci, C., *Effects of organic amendment and herbicide treatment on soil microbial biomass*, "Biol. Fert. Soils", **32**, 2000, 17-23.
56. Prentø, P., *Cellular and intracellular localization of catalase and acid phosphatase in the midgut of* Lumbricus terrestris *L.: a cell fractionation study*, "Comp. Biochem. Physiol.", **83 B**, 1986, 385-390.
57. Ribera, D., Narbonne, J.F., Arnaud, C., Saint-Denis, M., *Biochemical responses of the earthworm* Eisenia fetida andrei *exposed to contaminated artificial soil: effects of carbaryl*, "Soil Biol. Biochem.", **33**, 2001, 1123-1130.
58. Saint-Denis, M., Labrot, F., Narbonne, J.F., Ribera, D., *Glutathione, glutathione-related enzymes and catalase activities in the worm* Eisenia fetida, "Arch. Environ. Contam. Toxicol.", **35**, 1998, 594-606.
59. Saint-Denis, M., Narbonne, J.F., Arnaud, C., Ribera, D., *Biochemical responses of the earthworm* Eisenia fetida andrei *exposed to contaminated artificial soil: effects of lead acetate*, "Soil Biol. Biochem.", **33**, 2001, 395-404.
60. Saint-Denis, M., Narbonne, J.F., Arnaud, C., Thybaud, E., Ribera, D., *Biochemical responses of the earthworm* Eisenia fetida andrei *exposed to contaminated artificial soil: effects of benzo(a)pyrene*, "Soil Biol. Biochem.", **31**, 1999, 1837-1846.
61. Scaps, P., Grelle, C., Descamps, M., *Cadmium and lead accumulation in the earthworm* Eisenia fetida (*Savigny*) *and its impact on cholinesterase and metabolic pathway enzyme activity*, "Comp. Biochem. Physiol.", **116 C**, 1997, 233-238.

62. Schrader, S., Seibel, C., *Impact of cultivation management in an agroecosystem on hot spot effects of earthworm middens*, "Eur. J. Soil Biol.", **37**, 2001, 309-313.
63. Scullion, J., Malik, A., *Earthworm activity affecting organic matter, aggregation and microbial activity in soils restored after opencast mining for coal*, "Soil Biol. Biochem.", **32**, 2000, 119-126.
64. Stehouwer, R.C., Dick, W.A., Traina, S.J., *Characteristics of earthworm burrow lining affecting atrazine sorption*, "J. Environ. Qual.", **22**, 1993, 181-185.
65. Stenersen, J., *Action of pesticides on earthworms. I. The toxicity of cholinesterase-inhibiting insecticides to earthworms as evaluated by laboratory tests*, "Pestic. Sci.", **10**, 1979, 66-74.
66. Stenersen, J., *Action of pesticides on earthworms. II. Elimination of parathion by the earthworm* Eisenia foetida (*Savigny*), "Pestic. Sci.", **10,** 1979, 104-112.
67. Stenersen, J., *Action of pesticides on earthworms. III. Inhibition and reactivation of cholinesterases in* Eisenia foetida (*Savigny*) *after treatment with cholinesterase-inhibiting insecticides*, "Pestic. Sci.", **10**, 1979, 113-122.
68. Stenersen, J., *Esterases of earthworms. I. Characterisation of the cholinesterases in* Eisenia foetida *(Savigny*) *by substrates and inhibitors*, "Comp. Biochem. Physiol.", **66 C**, 1980, 37-44.
69. Stenersen, J., *Esterases of earthworms. II. Characterisation of the cholinesterases in the earthworm* Eisenia foetida *(Savigny*) *by ion exhange chromatography and electrophoresis*, "Comp. Biochem. Physiol.", **66 C**, 1980, 45-51.
70. Stenersen, J., *Detoxication of xenobiotics by earthworms*, "Comp. Biochem. Physiol.", **78 C**, 1984, 249-252.
71. Stenersen, J., *Uptake and metabolism of xenobiotics by earthworms*, in Greig-Smith, P.W., Becker, H., Edwards, P.J., Heimbach, F. (Gen. Eds.), *Ecotoxicology of Earthworms*, pp. 129-138, Intercept Publ., Andover, UK, 1992.
72. Stenersen, J., Brekke, E., Engelstad, F., *Earthworms for toxicity testing: species differences in response towards cholinesterase-inhibiting insecticides*, "Soil Biol. Biochem.", **24**, 1992, 1761-1764.
73. Stenersen, J., Gilman, A., Vardanis, A., *Carbofuran: its toxicity to and metabolism by earthworm* (Lumbricus terrestris), "J. Agric. Food Chem.", **21**, 1973, 166-171.
74. Stenersen, J., Guthenberg, C., Mannervik, B.,*Glutathione S-transferases in earthworms* (Lumbricidae), "Biochem. J.", **181**, 1979, 47-50.
75. Stenersen, J., Kobro, S., Bjerke, M., Arend, U., *Glutathione transferases in aquatic and terrestrial animals from nine phyla*, "Comp. Biochem. Physiol.", **86 C**, 1987, 73-82.
76. Stenersen, J., Øien, N., *Glutathione S-transferases in earthworms* (Lumbricidae). *Substrate specificity, tissue and species distribution and molecular weight*, "Comp. Biochem. Physiol.", **69 C**, 1981, 243-252.
77. Stokke, K., Stenersen, J., *Non-inducibility of the glutathione transferases of the earthworm* Eisenia andrei, "Comp. Biochem. Physiol.", **106 C**, 1993, 753-756.
78. Subler, S., Kirsch, A.S., *Spring dynamics of soil carbon, nitrogen, and microbial activity in earthworm middens in a no-till cornfield*, "Biol. Fert. Soils", **26**, 1998, 243-249.
79. Terävainen, H., *Ultrastructural distribution of cholinesterase activity in the ventral nerve cord of the earthworm* Lumbricus terrestris, "Histochemie", **18**, 1969, 177-190.
80. Vigh-Teichmann, I., Goslar, H.G., *Enzymhistochemische Studien am Nervensystem. III. Das Verhalten einiger Hydrolasen im Nervensystem des Regenwurmes* (Eisenia foetida), "Histochemie", **14**, 1968, 352-365.
81. Zhang, B.-G., Li, G.-T., Shen, T.-S., Wang, J.-K., Sun, Z., *Changes in microbial biomass C, N, and P and enzyme activities in soil incubated with the earthworm* Metaphire guillelmi *or* Eisenia fetida, "Soil Biol. Biochem.", **32**, 2000, 2055-2062.

STUDIA UNIVERSITATIS BABEŞ-BOLYAI, BIOLOGIA, XLVIII, 2, 2003

ARGUMENTE AVIFAUNISTICE PENTRU EXTINDEREA REZERVAȚIEI NATURALE „CHEIA TURZII" (JUDEȚUL CLUJ, ROMÂNIA)

ALIN DAVID*

SUMMARY. – Avifaunistical Reasons for Enlargement of the Gorge of Turda Nature Reserve (Cluj County, Romania). The paper presents the results of the quantitative and qualitative analysis of the bird fauna on the northern plateau of the Gorge of Turda. Only a small part of the studied surface (approx. 145 ha) is included within the limits of the protected area, so the bird fauna from here does not benefit legal protection. We tried to demonstrate that there are sufficient reasons to enlarge the protected area in order to diminish the strong anthropic impact.To materialise our goals, we made an extensive study of bird fauna, especially on the situation of breeding birds and on the legal protective status of the identified species conferred by the laws 462/2001, 13/1993 (for Romanian adherance to the Bern Convention) and law 13/1998 (for Romanian adherance to the Bonn Convention). Also, we relied on the fact that, since 1989, the Gorge of Turda is included in I. B. A. (Important Bird Areas). We identified a number of 50 species of birds, belonging to 7 orders and 17 families, 23 of them being breeding species, 8 are sedentary, and 15 are migrant species. The dominant breeding species are *Alauda arvensis* (14.48 breeding pairs/km^2 and 1.15 kg/km^2 initial biomass), *Emberiza citrinella* (12.41 breeding pairs/km^2 and 0.49 kg/km^2), *Sylvia curruca* (11.03 breeding pairs/km^2 and 0.44 kg /km^2) and *Lanius collurio* (10.34 breeding pairs/km^2 and 0.66 kg/km^2). From the species that are non-breeding in the studied area, a number of 14 species are sedentary in the Gorge of Turda and they are breeding here; the situation is similar with the 3 migrant species; 5 species are winter visitors and other 5 species are occasional. Excepting the occasional species, for the others the northern plateau is a component part of their feeding ground. The most representative species from the non-breeding species are *Aquila chrysaetos*, *Strix aluco*, *Monticola saxatilis* and *Corvus corax*. In conformity with the Bern Convention, a number of 33 species are strictly protected and 13 species are protected. Law 462/2001 shows that the conservation of 14 species is necessary in special areas for bird protection, 29 species are strictly protected and 7 species have community importance, their gathering from nature is making the object of management measures. We consider that the extension of Nature Reserve surface is beneficial for birds and for other groups of animals and also for plants, which make possible the existence of birds.

În anul 1938, Comisia Monumentelor Naturii declara statutul de Rezervație Naturală a Cheii Turzii. Hotărârea a fost publicată în Jurnalul Comisiei de Miniştri al României nr. 645 din 1938, republicată în Buletinul Comisiei Monumentelor Naturii nr. 1–2, iunie 1938. Atunci au fost stabilite limitele şi suprafața de 175 ha a Rezervației.

* *Universitatea "Babeş-Bolyai", Catedra de Zoologie, 3400 Cluj-Napoca, România.*
E-mail: adavid@biolog.ubbcluj.ro

De asemenea, Cheia Turzii a fost înscrisă în Tabloul Monumentelor Naturale din România decretate până la data de 31 decembrie 1939. România deținea la acea dată 14 arii naturale protejate. Statutul actual al Cheii este acela de Rezervație Naturală [18], categoria I.U.C.N.: IV [1]. Pe lângă valorile de peisaj şi vegetație deosebită a Cheii, unul dintre argumentele instituirii Rezervației l-a reprezentat biodiversitatea avifaunistică.

Primele însemnări privind avifauna Cheii Turzii au fost publicate în 1922 [2]. În 1937, N y á r á d y [11] a semnalat, în "Monografia Cheia Turzii", prezența a 67 specii de păsări. După 1937, în diverse periodice au mai fost publicate sporadic date avifaunistice privind Cheia Turzii [4, 6]. Cel mai amplu şi mai complex studiu privind avifauna Cheii Turzii [15] a dus la identificarea a nu mai puțin de 111 specii de păsări.

Deşi pusă oficial sub protecție încă din 1938, Cheia Turzii a fost şi este încă agresată de numeroşi factori: turismul necontrolat, poluarea pârâului Hăşdate, exploziile puternice la carierele de piatră din apropiere sau păşunatul în interiorul zonei de protecție. În acest context dorim să aducem un argument avifaunistic, pe lângă numeroasele argumente de natură botanică, entomologică, geologică, paleontologică sau estetică în vederea extinderii suprafeței rezervației. Prin includerea sub protecție a celor două platouri marginale sau cel puțin a platoului nordic, va creşte cu siguranță atât biodiversitatea cât şi valoarea ştiințifică a rezervației.

Utilizat vreme îndelungată ca păşune, platoul nordic este în prezent acoperit cu fitocenoze aparținând asociației *Thymo comosi – Festucetum rupicolae*, asociație ce poate fi considerată ca tip "climax" şi specifică platourilor calcaroase din Transilvania.

Solul este superficial, de tip rendzină, cu pH în jurul valorii neutre şi cu frecvente roci la suprafață (calcare jurasice), ceea ce îi conferă un caracter scheletic.

Caracteristică este prezența arbuştilor care sugerează posibilitatea refacerii vegetației lemnoase, predominantă în urmă cu câteva secole. Acoperirea realizată de aceasta oscilează între 30 şi 50%. În structura fitocenozelor se constată, de asemenea, o dominare a speciilor ierboase xerofile din ordinul *Festucetalia valesiacae* de proveniență secundară şi *Stipo eriocaulis - Festucetalia pallentis* (aflată în optimul său ecologic), iar speciile lemnoase sunt caracteristice ordinului *Prunetalia spinosae* cu influențe de *Berberidion* [12].

Material şi metode. Suprafața studiată este de circa 145 ha, limitele ei fiind alese în funcție de configurația terenului şi de existența vegetației lemnoase arbustive (Fig 1).

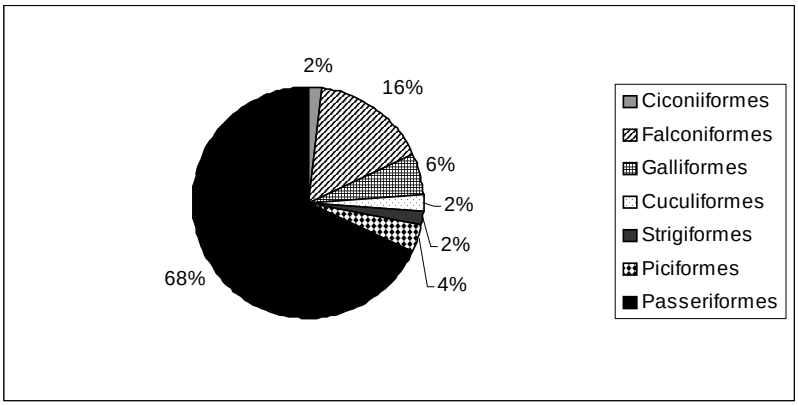
Pentru analiza avifaunei am folosit metoda pătratelor [3, 7, 9]. Am stabilit pe hartă (1:5000), limitele suprafeței studiate, după care întreaga suprafață a fost împărțită în pătrate. Pătratele au fost numerotate şi marcate în teren prin semne uşor vizibile. În anul 2001 au fost efectuate deplasări săptămânale în teren pe toată durata pasajului de primăvară şi a sezonului de reproducere (02.03.2001 – 10.08.2002). De asemenea, am efectuat 4 ieşiri pe teren în timpul pasajului de toamnă şi alte 4 deplasări iarna, pentru surprinderea tuturor fazelor fenologice.

F i g. 1. *Limitele zonei studiate de pe platoul nordic al Cheii Turzii.*

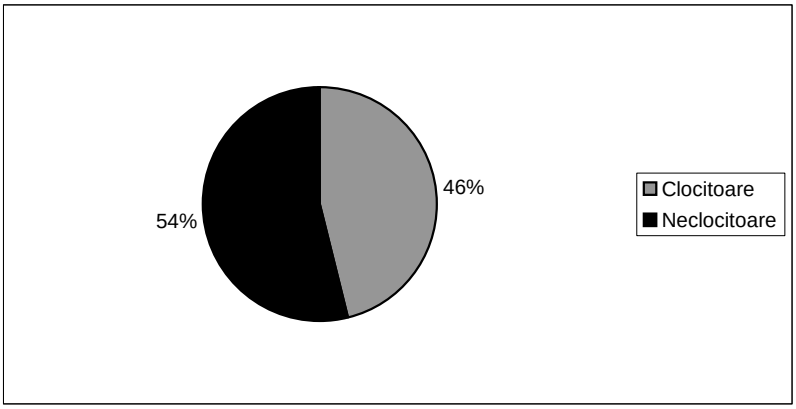
Determinarea păsărilor s-a făcut prin observație directă, cu binoclu 10X50 şi pe baza cântecului masculilor, notându-se poziția lor în interiorul fiecărui pătrat. Folosind această metodă, a fost posibilă caracterizarea cantitativă de detaliu a avifaunei clocitoare. Am estimat densitatea, biomasa inițială, dominanța individuală, dominanța în greutate şi în energie potențială [7], producția prin reproducere şi biomasa actuală [9].

Rezultate şi discuții. *Analiza calitativă a avifaunei.* Am identificat 50 specii de păsări, aparținând la 7 ordine, cel mai bine reprezentate fiind paseriformele (68%) (Fig. 2).

O importanță deosebită pentru studiul nostru o au cele 23 specii clocitoare (46% din total) (Fig. 3), întrucât ele reflectă capacitatea actuală de suport avifaunistic a platoului nordic. Speciile neclocitoare (54%) cuibăresc în habitatele învecinate platoului (pădure de foioase, pădure de conifere, stâncărie) cu excepția speciilor de pasaj şi a oaspeților de iarnă. Pentru ele platoul nordic este parte componentă a teritoriului de hrănire.



F i g. 2. *Structura pe ordine a avifaunei platoului nordic al Cheii Turzii.*

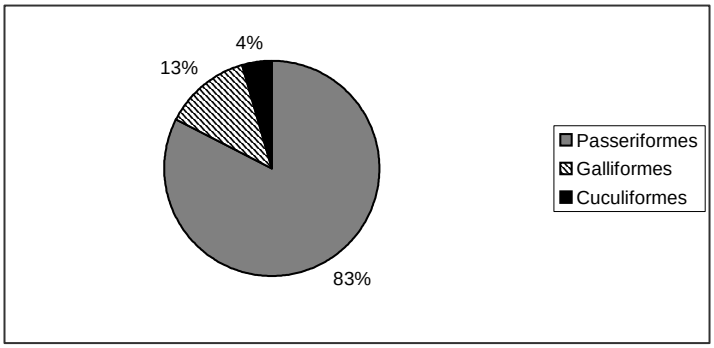


F i g. 3. *Statutul reproductiv al speciilor identificate pe platoul nordic al Cheii Turzii.*

Gradul de acoperire realizat de vegetația lemnoasă face ca platoul nordic să ofere spațiu de nidificare în special pentru paseriforme. Astfel, 19 specii clocitoare (83%) sunt paseriforme, 3 specii (13%) aparțin galiformelor şi o specie (4%) cuculiformelor (Fig. 4).

Sub aspect fenologic, 22 specii sunt sedentare pentru Cheia Turzii luată în ansamblu, 18 specii sunt oaspeți de vară, 5 specii sunt oaspeți de iarnă, alte 5 specii fiind accidentale (Tabel 1). După originea zoogeografică, speciile identificate aparțin la 9 tipuri avifaunistice din totalul de 21 tipuri prezente în România [8].

Dintre speciile sedentare pentru Cheia Turzii, 8 clocesc pe platoul nordic, celelalte 14 preferând pentru aceasta fie pădurile (*Accipiter gentilis*, *Buteo buteo*, *Picus* sp. etc.), fie stâncăria (*Aquila chrysaetos*, *Corvus corax*). Edificatorii “clocitoriei” de pe platou sunt oaspeții de vară, 15 specii din totalul de 18 cuibărind aici. Excepție fac numai *Monticola saxatilis* şi *Falco tinnunculus* care preferă stâncăria şi *Turdus torquatus*, care cuibăreşte în pădurea Mischiului.



F i g. 4. *Structura pe ordine a avifaunei clocitoare pe platoul nordic al Cheii Turzii.*

Tabel 1

Categoria fenologică şi originea zoogeografică a speciilor identificate pe platoul nordic al Cheii Turzii

Specia	**Categoria fenologică**								**Originea zoogeografică**						
	SC	**SN**	**OVC**	**OVN**	**OI**	**Ac**	**H**	**P**	**Ar**	**S**	**E**	**ET**	**M**	**Pm**	**Pxm**
Ciconia nigra						*		*							
Accipiter gentilis		*					*								
Buteo buteo		*					*								
Buteo lagopus					*				*						
Pernis apivorus						*					*				
Aquila chrysaetos		*					*								
Circus cyaneus						*	*								
Falco tinnunculus				*				*							
Falco columbarius					*		*								
Phasianus colchicus	*														
Perdix perdix	*											*			
Coturnix coturnix			*					*							
Cuculus canorus			*					*							
Strix aluco		*						*							
Picus canus		*						*							
Picus viridis		*									*				
Alauda arvensis			*					*							
Galerida cristata	*							*							
Lullula arborea			*								*				
Eremophila alpestris						*	*								
Motacilla alba			*					*							
Anthus campestris			*								*				
Erithacus rubecula	*										*				
Saxicola rubetra			*								*				
Saxicola torquata			*					*							
Oenanthe oenanthe			*					*							
Monticola saxatilis				*											*
Turdus merula		*									*				
Turdus torquatus				*										*	
Turdus pilaris					*					*					
Sylvia nisoria			*									*			
Sylvia curruca			*									*			
Aegithalos caudatus		*						*							
Parus coeruleus		*									*				
Parus major		*						*							

Tabel 1 (continuare)

Specia	Categoria fenologică							Originea zoogeografică							
	SC	SN	OVC	OVN	OI	Ac	H	P	Ar	S	E	ET	M	Pm	Pxm
Lanius collurio			*					*							
Lanius minor			*									*			
Serinus serinus						*							*		
Carduelis chloris	*											*			
Carduelis carduelis					*							*			
Acanthis cannabina			*									*			
Pyrrhula pyrrhula					*			*							
Emberiza citrinella	*							*							
Emberiza cia	*							*							
Miliaria calandra			*									*			
Corvus corax		*					*								
Corvus monedula		*						*							
Corvus frugilegus		*						*							
Garulus glandarius		*						*							
Pica pica	*							*							
Total	8	14	15	3	5	5	7	21	1	1	8	8	1	1	1

SC – sedentar clocitor. SN – sedentar neclocitor. OVC – oaspete de vară clocitor. OVN – oaspete de vară neclocitor. OI – oaspete de iarnă. Ac – accidental. H – holarctic. P – palearctic. Ar – arctic. S – siberian. E – european. ET – europeo-turkestanic. M – mediteranean. Pm – paleomontan. Pxm – paleoxeromontan.

Din totalul de 9 tipuri avifaunistice identificate, cele palearctice, europene şi europeo-turkestanice sunt clocitoare. Caracteristice pentru platoul nordic sunt speciile europeo-turkestanice, întrucât 7 specii din 8 identificate cuibăresc aici.

Analiza trofică a avifaunei. Oferta trofică de bază a platoului nordic este reprezentată de insecte [5, 13, 14], majoritatea speciilor identificate (40%) bazându-se pe un regim trofic insectivor. Dintre speciile clocitoare, mai mult de jumătate (52,17%) sunt tot insectivore. 12 specii (24%) au un regim trofic vegetarian, în timp ce speciile carnivore şi cele cu regim tofic mixt sunt reprezentate în proporție de câte 18% fiecare (Tabel 2). Nici o specie carnivoră nu cloceşte pe platoul nordic, urmare a lipsei ofertei de nidificație. Situația este asemănătoare în cazul speciilor cu regim trofic mixt, numai *Pica pica* cuibărind pe platoul nordic.

Tabel 2

Regimul trofic al speciilor identificate pe platoul nordic al Cheii Turzii

Regimul trofic	Număr de specii			% din totalul speciilor		
	C	NC	Total specii	C	NC	Total %
Insectivor	12	8	20	52,17	29,62	40
Carnivor		9	9		33,33	18
Vegetarian	10	2	12	43,50	7,43	24
Mixt	1	8	9	4,33	29,62	18

C – clocitor. NC – neclocitor.

Analiza cantitativă a avifaunei. Speciile clocitoare relizează o densitate de 168 perechi, respectiv 336 indivizi pe o suprafață de 145 ha. Rezultatele au fost prelucrate la suprafața standard de 1 km^2, astfel că densitatea realizată de clocitoare este de 115 perechi/km^2 (Tabel 3).

Tabel 3

Parametrii cantitativi ai populațiilor de păsări clocitoare pe platoul nordic al Cheii Turzii

Specia	Nr. cupluri	D/2 (kmp)	B.i. (kg)	P.r. (kg)	B.a. (kg)	D.I. (%)	D.G. (%)	D.A. (%)
Phasianus colchicus	1	0,68	1,56	6,80	8,36	0,58	14,13	5,58
Perdix perdix	1	0,68	0,61	4,59	5,20	0,58	5,52	2,98
Coturnix coturnix	2	1,36	0,30	1,50	1,80	1,17	2,71	0,23
Cuculus canorus	3	2,06	1,03	2,06	3,09	1,78	9,32	6,11
Alauda arvensis	21	14,48	1,15	2,89	4,04	12,51	10,46	12,67
Galerida cristata	7	4,82	0,43	1,20	1,63	4,16	3,89	4,56
Lullula arborea	11	7,58	0,45	1,13	1,58	6,55	4,07	5,47
Motacilla alba	3	2,06	0,13	0,30	0,43	1,78	1,17	1,31
Anthus campestris	7	4,82	0,26	0,62	0,88	4,16	2,35	3,24
Erithacus rubecula	5	3,44	0,11	0,30	0,41	2,97	0,99	1,63
Saxicola rubetra	10	6,89	0,30	0,89	1,19	5,95	2,71	4,04
Saxicola torquata	6	4,13	0,15	0,41	0,56	3,56	1,35	2,04
Oenenthe oenanthe	4	2,75	0,16	0,49	0,65	2,37	1,44	1,98
Sylvia nisoria	12	8,27	0,49	1,24	1,73	7,14	4,43	5,97
Sylvia curruca	16	11,03	0,44	1,10	1,54	9,53	3,98	6,08
Lanius collurio	15	10,34	0,66	1,65	2,31	8,93	5,97	7,79
Lanius minor	3	2,06	0,23	0,56	0,79	1,78	2,08	2,22
Carduelis chloris	3	2,06	0,12	0,37	0,49	1,78	1,08	1,48
Acanthis cannabina	5	3,44	0,13	0,38	0,51	2,97	1,17	1,83
Emberiza citrinella	18	12,41	0,49	1,24	1,73	10,72	4,43	6,84
Emberiza cia	6	4,13	0,16	0,49	0,65	3,56	1,44	2,27
Emberiza calandra	6	4,13	0,45	1,11	1,56	3,56	4,07	4,46
Pica pica	3	2,06	1,23	3,70	4,93	1,78	11,14	6,90
Total	168	115,69	11,04	35,02	46,06	100	100	100

D/2 – densitatea exprimată în număr perechi clocitoare/km^2. B.i. – biomasa inițială. P.r. – producția prin reproducere. B.a. – biomasa actuală. D.I. – dominanța individuală. D.G. – dominanța în greutate. D.A. – dominanța în energie potențială.

Cele mai mari efective le realizează populațiile speciilor sedentare, precum *Alauda arvensis* (14,48 perechi clocitoare/km^2) şi *Emberiza citrinella* (12,41 perechi clocitoare/km^2). Ambele specii au regim trofic vegetarian şi îşi fac cuibul fie pe sol (ciocârlia) la adăpostul vegetației ierboase dese, fie pe sol sau in arbuşti la mică înălțime (presura galbenă). Densități mari realizează şi populațiile de *Sylvia curruca* (11,03 perechi clocitoare/km^2) şi *Lanius collurio* (10,34 perechi clocitoare/km^2), oaspeți de vară, ale căror cerințe de nidificație sunt asemănătoare cu ale speciilor precedente, dar care sunt insectivore.

Biomasa inițială a speciilor clocitoare a fost de 11,04 kg/km^2, iar în urma unei producții prin reproducere de 35,02 kg/km^2, s-a ajuns la sfârşitul ciclului de reproducere ca biomasa actuală să crească de mai mult de 4 ori (46,06 kg/km^2). În estimarea producției prin reproducere am luat în considerare o singură pontă în cazul tuturor speciilor ca urmare a pierderilor însemnate ale paseriformelor în ce priveşte ouăle şi puii.

Statutul protectiv actual al avifaunei platoului nordic al Cheii Turzii. Urmare firească a declinului în care se află astăzi multe dintre speciile de plante şi animale, au apărut listele roşii, semnale de alarmă care arată pericolul în care se află viţuitoarele, mai ales datorită presiunii antropice crescânde. Deşi paradoxal, în România nu există o listă roşie oficială a păsărilor.

Un proiect al unei astfel de liste a fost făcut în anul 1981 [10]. Dintre speciile clocitoare pe platoul nordic al Cheii Turzii, numai *Perdix perdix* şi *Coturnix coturnix* se regăsesc pe această listă, întrucât aceasta cuprinde "specii a căror efective sunt decimate de aşa manieră încât există temeri că ele vor dispărea din fauna țării noastre" [10]. Platoul nordic este însă parte componentă a teritoriilor de hrănire a unor specii clocitoare în Cheia Turzii, precum: *Aquila chrysaetos*, *Accipiter nisus*, *Bubo bubo* şi *Monticola saxatilis*, a căror protecție nu se poate face decât prin protecția habitatelor lor.

Conform Convenției de la Berna [16] privind conservarea vieții sălbatice şi a habitatelor naturale din Europa, Convenției de la Bonn [17] privind conservarea speciilor migratoare de animale sălbatice şi Legii 462/2001 [19], toate speciile identificate pe platoul nordic beneficiază de statut protectiv (Tabel 4), acesta fiind unul dintre cele mai importante argumente în vederea punerii zonei sub protecție.

Tabel 4

Statutul protectiv al speciilor identificate pe platoul nordic al Cheii Turzii

Specia	Convenția Berna		Convenția Bonn	Legea 462 / 2001		
	A. 2	A.3	A. II	A.3	A.4	A.5
Ciconia nigra	*		*	*		
Accipiter gentilis	*		*		*	
Buteo buteo	*				*	
Buteo lagopus	*				*	
Pernis apivorus	*			*		
Aquila chrysaetos	*			*		
Circus cyaneus	*			*		
Falco tinnunculus	*		*		*	
Falco columbarius	*		*	*		
Phasianus colchicus		*				*
Perdix perdix		*				*
Coturnix coturnix		*	*			*
Cuculus canorus		*			*	
Strix aluco	*				*	
Picus canus	*			*		
Picus viridis	*				*	
Alauda arvensis		*			*	
Galerida cristata		*			*	
Lullula arborea		*		*		
Eremophila alpestris	*			*		
Motacilla alba	*				*	
Anthus campestris	*			*		
Erithacus rubecula	*				*	
Saxicola rubetra	*				*	
Saxicola torquata	*				*	
Oenanthe oenanthe	*				*	
Monticola saxatilis	*			*		
Turdus merula		*			*	
Turdus torquatus	*				*	
Turdus pilaris		*			*	
Sylvia nisoria	*			*		
Sylvia curruca	*				*	
Aegithalos caudatus	*				*	
Parus coeruleus	*				*	
Parus major	*				*	
Lanius collurio	*			*		
Lanius minor	*			*		
Serinus serinus	*				*	
Carduelis chloris	*				*	

Tabel 4 (continuare)

Specia	Convenția Berna		Convenția Bonn	Legea 462 / 2001		
	A. 2	A.3	A. II	A.3	A.4	A.5
Carduelis carduelis		*			*	
Acanthis cannabina	*				*	
Pyrrhula pyrrhula		*			*	
Emberiza citrinella	*				*	
Emberiza cia	*			*		
Miliaria calandra		*			*	
Corvus corax		*			*	
Corvus monedula						*
Corvus frugilegus						*
Garulus glandarius						*
Pica pica						*
Total	33	13	5	14	29	7

Convenția de la Berna: A.2 – (Anexa nr. 2) specii de faună strict protejate; A.3 – (Anexa nr. 3) specii de faună protejate. Convenția de la Bonn: A.II – Anexa II. Legea 462 / 2001: A.3 – (Anexa nr. 3) specii de animale, a căror protecție necesită desemnarea ariilor speciale de conservare şi a ariilor de protecție specială avifaunistică; A.4 – (Anexa nr. 4) specii de animale care necesită o protecție strictă; A.5 – (Anexa nr. 5) specii de animale de interes comunitar, a căror prelevare din natură face obiectul măsurilor de management.

Concluzii. 1. Pe platoul nordic al Cheii Turzii am identificat 50 specii de păsări, aparținând la 7 ordine, 7 familii sistematice şi 9 tipuri avifaunistice.

2. Dintre acestea, 23 specii (46%) sunt clocitoare. Pentru alte 22 specii (44%), platoul nordic reprezintă parte componentă a teritoriului de hrănire.

3. Speciile caracteristice pentru platoul nordic sunt cele de origine europeo-turkestanică, 7 dintre cele 8 specii identificate fiind clocitoare.

4. Sub aspect fenologic, 22 specii sunt sedentare pentru Cheia Turzii luată per ansamblu, 18 specii sunt oaspeți de vară, 5 specii sunt oaspeți de iarnă, iar alte 5 specii sunt accidentale. “Clocitoria” de pe platoul nordic este edificată mai ales de oaspeții de vară, 15 specii din cele 18 identificate cuibărind aici.

5. După regimul trofic, domină speciile insectivore (40% din total). Din cele 23 specii clocitoare, 12 sunt insectivore (52,17%), 10 specii (43,50%) sunt vegetariene, iar o specie (4,33%) are regim trofic mixt.

6. Densitățile cele mai mari sunt realizate de populațiile speciilor *Alauda arvensis* (14,48 perechi clocitoare/km^2), *Emberiza citrinella* (12,41 perechi clocitoare/km^2), *Sylvia curruca* (11,03 perechi clocitoare/km^2) şi *Lanius collurio* (10,34 perechi clocitoare/km^2).

7. Biomasa inițială a speciilor clocitoare a fost de 11,04 kg/km^2. Printr-o producție prin reproducere estimată la 35,02 kg/km^2, s-a ajuns la sfârşitul ciclului de reproducere ca biomasa actuală să fie de peste 4 ori mai mare (46,06 kg/km^2). Cele mai mari densități le realizează speciile adaptate la zone deschise de pajişte cu tufărişuri rare, precum *Alauda arvensis, Emberiza citrinella, Sylvia curruca, Lanius collurio.*

8. Conform Convenției de la Berna, 33 dintre speciile identificate sunt strict protejate şi 13 specii sunt protejate. 5 specii beneficiază de statutul protectiv conferit de Anexa II a Convenției de la Bonn. Conservarea a 14 specii necesită desemnarea ariilor speciale de protecție avifaunistică, 29 specii necesită protecție strictă, iar 7 specii sunt de interes comunitar, conform Legii 462 / 2001.

9. Rezultatele noastre evidențiază importanța semnificativă a platoului nordic ca argument al creşterii biodiversității avifaunistice a Rezervației Naturale Cheia Turzii. Ca atare, propunem extinderea rezervației naturale cu cel puțin cele 145 ha investigate sub aspect avifaunistic. Limitele acestei arii adiționale ar trebui să fie: Peretele Sândului (Muruna) spre E şi NE, până la Pârâul Văpii în zona Fântânelor, spre NE până la Drumul Sândului de sub Dealul Alb (marcat cu triunghi albastru), iar de aici la circa 700 m NV până la un traseul turistic (marcat cu dungă roşie) care se intersectează cu drumul ce duce de la Colțul Labirintului spre cariera de piatră şi apoi spre Tureni (dunga albastră). Includerea acestei arii adiționale sub protecție va contribui la stabilitatea biocenozelor şi va mări semnificativ valoarea ştiințifică şi de patrimoniu a Rezervației Naturale Cheia Turzii.

BIBLIOGRAFIE

1. C r i s t e a, V., *La conservation de la nature en Roumanie***,** Univ. Studi, Camerino, 1995.
2. D o b a y, L., *Der Zippamer (*Emberiza cia *L.) in Siebenbürgen***,** „Verh. Mitt. Siebenb. Verein. Naturwiss. zu Hermannstadt", **74**, 1922, 160–169.
3. F e r r y, C., F r o c h o t, B., *L'avifaune nidificatrice d'une forêt de chênes pedonculés en Bourgogne: étude de deux successions écologiques***,** „Terre Vie", **2**, 1970, 153–250.
4. K a l a b e r, L., *Lăstunul de stâncă (*Hirundo rupestris rupestris *Scop.) în Cheile Turzii***,** „Ocrot. Nat. Med. Înconj.", Nr. 5, 1978, 393–400.
5. K i s, B., *Ortopterele din Cheile Turzii,* „Bul. Inf. Soc. Lepidopterol. Rom.", **4** (1), 1993, 45–48.
6. K o h l, S., *Date ornitologice din Cheile Turzii,* „Rev. Muz.", Nr. 1, 1969, 79–80.
7. K o r o d i G à l, I., *Metode cantitative pentru studiul relațiilor numerice ale populațiilor de păsări,* „Rev. Muz.", Nr. 5, 1969, 393–400.
8. M u n t e a n u, D., *Analiza zoogeografică a avifaunei române,* "Nymphea" , Nr. 2, 1974, 27–69.
9. M u n t e a n u, D., *Abundența şi biomasa populațiilor de păsări din masivul Vlădeasa,* „Stud. Cerc. Biol., Ser. Biol. Anim.", **32** (2), 1980, 185–190.
10. M u n t e a n u, D., *Propuneri pentru o listă roşie a speciilor din avifauna R. S. România,* „Ocrot. Nat. Med. Înconj.", **28** (2), 1984, 112–115.
11. N y á r á d y, E., *Monografia Cheia Turzii,* Ed. Lyceum, Cluj, 1937.
12. N y á r á d y, E., *Enumerarea plantelor vasculare din Cheia Turzii*, Imprimeria Națională, Bucureşti, 1939.
13. P o p a, V., *Ecological studies of the cicada populations (Homoptera, Auchenorrhyncha) in the "Cheile Turzii" Nature Reserve, Romania,* „Entomol. Rom.", **5**, 2000, 91–97.
14. R á k o s y, L., *Diversität der Schmetterlinge (Lepidoptera) im Cheile Turzii Naturschutzgebiet (Siebenbürgen, Rumänien),* „Entomol. Rom.", **6**, 2001, 55–92.
15. R ă ş i n a r u, R., *Contribuții la cunoaşterea avifaunei Cheilor Turzii,* „An. Bucovinei", **2** (1), 1995, 159–165.
16. *** 1993 - *Lege nr. 13 pentru aderarea României la Convenția privind conservarea vieții sălbatice si a habitatelor naturale din Europa, adoptată la Berna la 19 septembrie 1979,* Monit. Oficial al României, **62** / 25.03.1993.
17. *** 1998 - *Lege nr. 13 pentru aderarea României la Convenția privind conservarea speciilor migratoare de animale sălbatice, adoptate la Bonn la 23 iunie 1979,* Monit. Oficial al României, **24** / 26.01.1998.
18. *** 2000 - *Lege nr. 5 privind aprobarea Planului de amenajare a teritoriului național - Secțiunea a III-a - zone protejate,* Monit. Oficial al României, **152**/12.04.2000.
19. *** 2001 - *Legea nr. 462 pentru aprobarea Ordonanței de urgență a Guvernului nr. 236/2000 privind regimul ariilor naturale protejate, conservarea habitatelor naturale, a florei şi faunei sălbatice,* Monit. Oficial, **433**, 02.08.2001.

STUDIA UNIVERSITATIS BABEŞ-BOLYAI, BIOLOGIA, XLVIII, 2, 2003

CONȚINUTUL ÎN PIGMENȚI ASIMILATORI AL PLANTULELOR CRESCUTE ÎN CONDIȚII DE ECRANARE A CÂMPULUI MAGNETIC

VICTOR BERCEA* şi CRISTINA DOBROTĂ**

SUMMARY. – The Content of Assimilatory Pigments in Plantlets Grown under Shielded Magnetic Field Conditions. In order to survey how magnetic fields affect the synthesis of the assimilatory pigments, as well as the protein content of the cells, the vegetal material was incubated under low magnetic field and also in normal geo-magnetic environment. Plantlets of bean (*Phaseolus vulgaris*) and sunflower (*Helianthus annuus*) were incubated in a magnetic shield box and in a control box for 24, 48 and 72 hours, respectively. The shielding level was about 10^{-6} of the terrestrial magnetic field. As compared to the control, the chlorophyll, carotenoid and protein biosynthesis was stimulated in bean plantlets and inhibited in sunflower ones. The results support the idea that the shielded magnetic environment induces different reactions depending on the time of exposure and on the plant species.

Pământul poate fi privit ca un dipol magnetic cu liniile de câmp ce formează magnetosfera. Câmpul magnetic este utilizat alături de radiațiile ionizante în terapia diferitelor boli, motiv pentru care majoritatea cercetărilor sunt axate în special pe celula animală. Există puține cercetări care abordează aspecte ale acțiunii câmpului magnetic asupra organismelor vegetale.

Din studiile existente este cunoscut că magnetismul terestru interacționează cu organismele vegetale la diferite niveluri de organizare, de exemplu la nivelul unor biomolecule implicate în sinteze specifice cum ar fi aminoacizii, ADN-ul şi vitaminele. Aminoacizii (cu excepția glicinei) sunt optic activi posedând stereoizomerie D şi L. Prin încorporarea lor în proteine neenzimatice şi enzimatice, aminoacizii dictează proprietățile spațiale şi biochimice ale acestora. ADN-ul prezintă o anizotropie negativă cu helixul orientat perpendicular pe liniile câmpului magnetic [6]. Recombinarea radicalilor perechi depinde de orientarea reactanților în câmpul magnetic din cauza interacțiunilor magnetice anizotrope cu radicalii individuali [3]. O serie de enzime generează, în timpul catalizei, radicali liberi intermediari care pot fi influențați de câmpul magnetic extern [5].

* *Institutul de Cercetări Biologice, str. Republicii 48, 3400 Cluj-Napoca, România. E-mail:icb@mail.dntcj.ro*

** *Universitatea "Babeş-Bolyai", Facultatea de Biologie şi Geologie, str. Kogălniceanu 1, 3400 Cluj-Napoca, România. E-mail: crisd@bioge.ubbcluj.ro*

S-a constatat, de asemenea, o intensificare a sintezei glucidice influențată de variațiile magnetismului terestru, respectiv apariția a numeroase granule de amidon la nivelul protoplasmei [2].

Au fost înregistrate modificări ale conținutul celular în elemente minerale. Astfel, se apreciază că ionul de Ca^{2+} este implicat în medierea efectelor biologice datorate câmpului magnetic [8].

Variațiile câmpului magnetic se pare că afectează procesul primar al fotosintezei. Centrul de reacție de la nivelul fotosistemelor este lipsit de acceptorii secundari, iar componenții reactivi din centrul de reacție sunt imobilizați în complexele proteice hidrofobe [3].

Materiale şi metode. Ecranarea câmpului magnetic s-a realizat cu o incintă reprezentată de două cutii cubice din permalloy (Mu metal). Al treilea strat de ecranare este reprezentat de un cilindru de folie ecranantă Fine Met FT-3M, produs de Hitachi Metals, cu următoarele caracteristici: grosime 0.2 mm, permeabilitate magnetică 100,0, densitatea fluxului magnetic 1,23 oferit de Institutul de Cercetări Spațiale şi Astronautice –Tokyo. Nivelul de ecranare al incintei este de 10^{-6} câmp magnetic terestru.

Experimentele au fost efectuate pe plantule test de fasole şi floarea soarelui obținute prin germinația semințelor menținute pe substrat de hârtie de filtru, la temperatura de 23°C şi întuneric 72 de ore, după care plantulele au fost transferate la lumină (radiație fotosintetic activă=100 $\mu mol/m^2/sec$), realizată de o instalație de tuburi fluorescente. După 24 de ore de iluminare, cele mai viguroase plantule au fost plantate în ghivece pe sol de grădină. După expunerea plantelor timp de 24, 48, respectiv 72 de ore în câmp magnetic ecranat, s-au făcut determinări ale conținutului de proteine, pigmenți clorofilieni şi carotenoidici. Pentru extragerea pigmenților asimilatori, materialul vegetal a fost mojarat în prezență de $CaCO_3$ pentru evitarea oxidărilor produse de aciditatea sucului celular. Extracția pigmenților fotosintetici s-a efectuat în acetonă. Identificarea componenților s-a făcut spectrofotometric pe baza coeficienților specifici de absorbție, utilizându-se metoda lui A r n o n [1] pentru clorofile, iar carotenoidele s-au cuantificat după G o o d w i n [4].

Materialul vegetal supus extragerii pigmenților asimilatori a fost hidrolizat la cald în 0,1 N NaOH timp de o oră, apoi s-a efectuat reacția L o w r y [7], utilizându-se extractul bazic pentru determinarea proteinelor totale. Rezultatele sunt exprimate în % față de martor, considerând martorul 100% (în tabele), respectiv în mg/g substanță proaspătă (în figuri).

Rezultate şi discuții. Modificările în conținutul pigmenților asimilatori în urma expunerii plantulelor în condiții de ecranare a câmpului magnetic extern sunt specifice tipului de plantă studiat şi sunt dependente de durata de desfăşurare a experimentului.

La plantulele de fasole (*Phaseolus vulgaris)* se evidențiază o intensificare a acumulării pigmenților asimilatori la expunerea în câmp magnetic ecranat comparativ cu martorul. Creşte cantitatea de clorofila *a* şi *b*, precum şi de carotenoide (caroten şi xantofile), mai semnificativ la o expunere de 72 ore. Aceste schimbări survenite în acumularea componenților fotosintetici se oglindesc şi în valorile raporturilor dintre aceştia (Tabel 1).

Tabel 1

Conținutul în pigmenți asimilatori (%) la plantulele de *Phaseolus vulgaris* expuse în condiții de ecranare a câmpului magnetic comparativ cu martorul (100%)

Timpul de expunere (ore)	Valori exprimate în %			a/b	clorofilă/ carotenoide	proteine (%)
	clorofila *a*	clorofila *b*	carotenoide			
24	110,04	112,70	112,90	2,75	4,99	99,17
48	122,17	114,55	114,97	2,80	5,27	222,20
72	128,20	121,05	121,23	2,67	4,88	91,26

Între valorile variantelor experimentale expuse în câmp magnetic ecranat şi martor există deosebiri importante şi anume: la durata de expunere de 48 ore se înregistrează cantități sporite de clorofila *a* şi *b*.

Relația dintre evoluția componenților fotosintetici şi timpul de desfăşurare al experimentului este prezentată în Fig. 1. Între cantitatea de clorofila *a*, *b*, carotenoide şi timpul de expunere în câmp magnetic ecranat se evidențiază o corelație negativă caracterizată printr-un coeficient de regresie (b) negativ şi un coeficient de corelație (r) sub valoarea de 0,5, ceea ce atestă o corelație scăzută între componentul fotosintetic şi timpul de expunere în condiții de ecranare a câmpului magnetic. Poziția valorilor față de linia de regresie este îndepărtată, având la bază un coeficient de determinare (r^2) de valoare scăzută. Cu toate că eroarea standard (E.S.) este redusă, probabilitatea (P) este nesemnificativă.

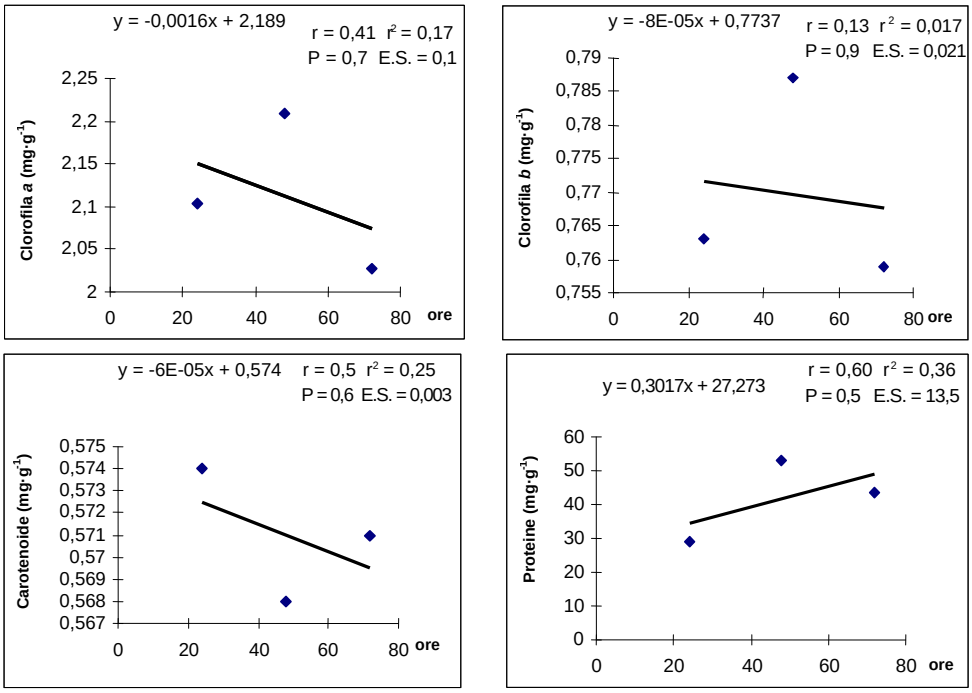
Conținutul în proteine celulare totale este scăzut în comparație cu martorul, cu deosebirea că la varianta cu expunere de 48 ore se obține o cantitate superioară de proteine. Relația dintre acumularea proteinelor în raport cu timpul de expunere la câmpul magnetic evidențiază o corelație pozitivă caracterizată printr-un coeficient de regresie pozitiv, un coeficient de corelație (r) situat la valoarea 0,6, dar cu o determinare (r^2) a valorilor scăzută în raport cu linia de regresie.

Acumularea componenților fotosintetici la plantulele de floarea soarelui (*Helianthus annuus)* expuse în câmp magnetic ecranat este redată în Tabelul 2.

Tabel 2

Conținutul în pigmenți asimilatori (%) la plantulele de *Helianthus annuus* expuse în condiții de ecranare a câmpului magnetic comparativ cu martorul (100%)

Timpul de expunere (ore)	Valori exprimate în %			a/b	clorofilă/ carotenoide	proteine (%)
	clorofila *a*	clorofila *b*	carotenoide			
24	77,27	72,72	81,15	2,94	3,98	70,15
48	96,17	96,49	92,70	2,49	4,16	75,45
72	80,80	89,45	79,21	2,35	4,22	80,30



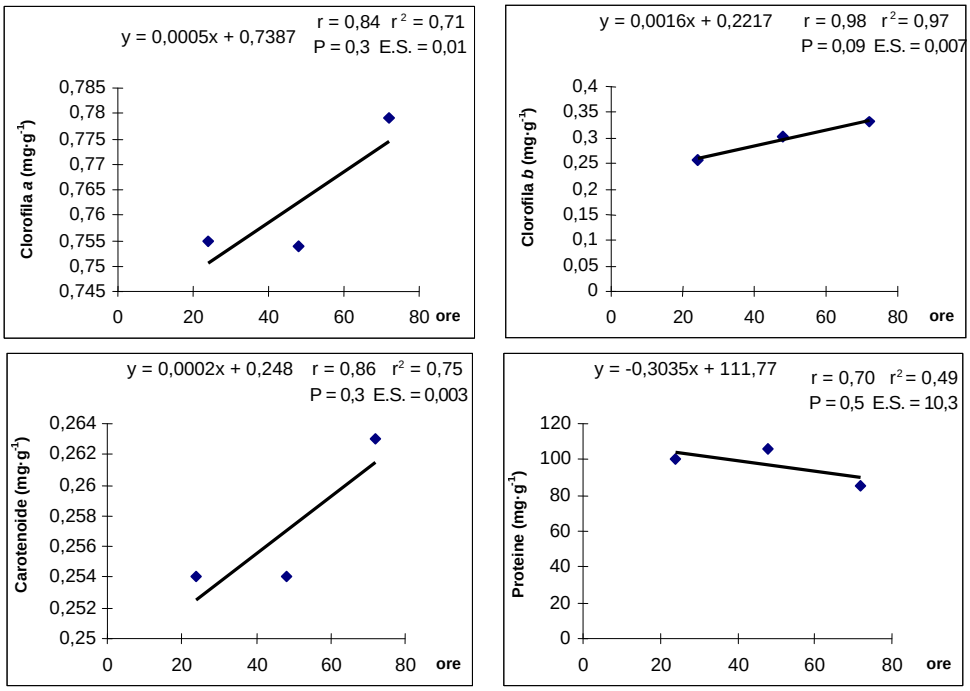
F i g. 1. *Exprimarea corelației între timpul de expunere în condiții de ecranare a câmpului magnetic şi diferiți componenți celulari la plantulele de* Phaseolus vulgaris.

Conținutul în pigmenți asimilatori la plantulele de floarea soarelui expuse în condiții de ecranare a câmpului magnetic este redus în comparație cu martorul. Cantități de clorofile şi carotenoide mai apropiate martorului se înregistrează la o expunere de 48 ore. Între variantele experimentale se înregistrează cantități diferite de clorofile şi carotenoide, remarcându-se cantitățile cele mai ridicate la un timp de expunere de 72 ore. Comparativ cu plantulele de fasole, plantulele de floarea soarelui reacționează într-un mod diferit la condițiile experimentale, sugerând o modulare a reactivității în funcție de specie, respectiv de tipul metabolic preponderent al acesteia.

Relația între acumularea pigmenților asimilatori la floarea soarelui şi timpul de expunere în condiții de ecranare magnetică este prezentată în Fig. 2. Între cantitatea de clorofile, carotenoide şi timpul de expunere există o corelație pozitivă caracterizată printr-un coeficient de regresie (b) pozitiv, un coeficient de corelație (r) situat peste valoarea de 0,8 şi cu o determinare a valorilor în raport cu linia de regresie (r^2) peste valoarea de 0,7, ceea ce atestă corelația strânsă între cele două variabile (component şi durată), corelație de natură funcțională.

Cantitatea de proteine celulare totale acumulată este scăzută în comparație cu martorul (Tabel 2) cu mențiunea că la varianta cu expunere de 48 ore se acumulează mai multe proteine. Relația dintre cantitatea de proteine şi timpul de expunere se bazează

pe o corelație negativă caracterizată printr-un coeficient de regresie (b) negativ, un coeficient de corelație (r) mărit şi o determinare scăzută a valorilor în raport cu linia de regresie (Fig. 2).



F i g. 2. *Exprimarea corelației între timpul de expunere în condiții de ecranare a câmpului magnetic şi diferiți componenți celulari la plantulele de* Helianthus annuus.

Concluzii. 1. Conținutul în pigmenți asimilatori este dependent de specie, respectiv de tipul metabolic preponderent al acesteia şi de timpul de expunere în condiții de câmp magnetic ecranat.

2. La fasole, cantitatea de pigmenți înregistrată este superioară martorului, mai semnificativ la varianta de expunere de 72 ore. Sinteza proteică este stimulată la 48 de ore.

3. La floarea soarelui, atât cantitatea de clorofile şi carotenoide (caroten, xantofile), cât şi cea de proteine totale sunt mai scăzute în condițiile experimentale comparativ cu martorul.

4. Corelațiile dintre cele două variabile (componenții celulari şi timpul de expunere) sunt diferite în funcție de specie şi variază în funcție de componentul analizat.

Cercetările au fost finanțate în cadrul contractului PNCDI Aerospațial, nr. 25/2001.

BIBLIOGRAFIE

1. A r n o n, D. I., *Copper enzymes in chloroplasts. Polyphenol oxidase in* Beta vulgaris, „Plant Physiol.”, **24**, 1949, 1-15.
2. B a r r y, P., P h i l l i p s, T., *Sowing seeds in a magnetic field*, „FirstScience”, 2003 (abstract).
3. B o x e r, S. G., C h i d s e y, C. E. D., R o e l o f s, M. G., *Dependence of the yield of a radical-pair reaction in the solid state on orientation in a magnetic field*, „J. Am. Chem. Soc.”, **104**, 1982, 2674-2675.
4. G o o d w i n, T. W., *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*, Vol. 2, Acad. Press, London, 1976.
5. G r i s s o m, C. B., *Magnetic spin effects in radical enzymatic reactions*, EMFRAPID Program (1994-1998).
6. G r i s s o m, C. B., *Magnetic field effects in biology. A survey of possible mechanisms with emphasis on radical pair recombination*, „Chem. Rev.”, **95**, 1995, 3-24.
7. L o w r y, O. H., R o s e b r o u g h, N. J., F a r r, A. L., R a n d a l l, R. J., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*, „J. Biol. Chem.”,**193**, 1951, 265-275.
8. W e y, H. E., C o n o v e r, D. P., M a t h i a s, P., T o r a a s o n, M., L o t z, W.G., *50-Hertz magnetic field and calcium transients in Jurkat cells. Results of a research and public information dissemination (RAPID) Program Study*, „Environ. Health Prospect”, **108**, 2000, 135-140.

STUDIA UNIVERSITATIS BABEŞ-BOLYAI, BIOLOGIA, XLVIII, 2, 2003

ASPECTE STRUCTURALE ŞI ULTRASTRUCTURALE ALE HEPATOTOXICITĂȚII NUROFENULUI LA ŞOBOLANUL ALB WISTAR

VICTORIA-DOINA SANDU*, CRISTINA PAŞCA*,
CONSTANTIN CRĂCIUN** şi ADINA COSTEA TURCU***

SUMMARY. – Structural and Ultrastructural Aspects of the Hepatotoxicity of Nurofen in White Wistar Rats. Hepatotoxicity represents one of the most frequently investigated side effects of the drugs because the liver is the most important organ implicated in the biotransformation, activation and elimination from the organism of the medicines, including Nurofen - an antiinflammatory product widely used in the therapy of many human diseases. The investigations reported here aimed at establishing the structural and ultrastructural changes induced in the liver of the white Wistar rat by a daily dose of 250 mg Nurofen/kg body weight, administered for 35 days. Our study showed that Nurofen had a moderate hepatotoxic effect, which increased progressively during the whole experimental period, but, fortunately, had no irreversible character, a natural recovery process being possible after the end of the treatment. By light microscopy studies, we could notice a fat degeneration of the hepatocytes, an obvious intracellular and intracanalicular stasis of the bile, the appearance of lymphohistiocyte infiltrations in the Kiernan spaces, and just a very discrete vascular congestion and blood stasis of the intralobular capillaries. Ultrastructurally, it could be observed that the hepatocytes were the most affected by the treatment, generally they having a cytoplasm full of many small lipid drops, or a few large drops of lipids. Besides, simultaneously, in many cells, a significant amount of glycogen appeared, which was spread in the whole cytoplasm. In some hepatocytes, number of the lysosomes and peroxisomes increased. The nuclei seemed to be sensitive to Nurofen, their chromatin appearing markedly condensed on the inner surface of the nuclear envelope (cortical hyperchromatosis). The mitochondria were moderately swollen, and had vacuolised and rarefied matrix and cristae. The smooth-surfaced endoplasmic reticulum had an abnormal, vesicular aspect. Also, a few number of hepatocytes could be noticed in different destructive stages, some of them being completely destroyed. Concerning the Ito cells, our investigations demonstrated that unlike hepatocytes they had no lipids in their cytoplasm.

In addition, we could observe a serious perturbation of the bile transit, both in the cells and in the intralobular canaliculi, and, simultaneously, the microvilli in the lumina of some canaliculi disappeared. The destructive processes in the liver were correlated with a discrete increase of the phagocytic activity of the Kupffer cells, the cytoplasm of which contained a large amount of included materials. Except for a very discrete collagen proliferation in the Kiernan space, no other irreversible histopathological modification could be observed at the level of the liver of the treated white Wistar rats, a fact which explains the natural recovery of the liver after the end of Nurofen administration, without any hepatoprotective or hepatoregenerative treatment.

* *Universitatea "Babeş-Bolyai", Facultatea de Biologie şi Geologie, Catedra de Zoologie, 3400 Cluj-Napoca, România. E-mail: cpasca@biolog.ubbcluj.ro*
** *Universitatea "Babeş-Bolyai", Facultatea de Biologie şi Geologie, Catedra de Fiziologie animală, 3400 Cluj-Napoca, România*
*** *Grupul Şcolar Aurel Vlaicu, 3400 Cluj-Napoca, România*

Din categoria antiinflamatoarelor nesteroidiene (AINS) face parte şi Nurofenul - produs medicamentos larg utilizat în prezent în terapia antiinflamatoare, dar şi în tratarea rapidă şi eficientă a durerilor de cap, migrenelor, durerilor dentare, durerilor menstruale, nevralgiilor, durerilor reumatice, durerilor de spate, durerilor musculare, primelor simptome de răceală sau gripă, stărilor febrile, vasospasmelor post-hemoragie subarahnoidiană anevrismală, osteoartritelor, periartritelor, artrozelor, spondilitei anchilopoietice, spondilozelor, bolilor acute musculo-scheletice (bursite, tendinite, tenosinovite, epicondilite, fibrozite, miozite), bolii Alzheimer, fibrozei cistice [4, 6, 9, 15, 17, 19, 22-25]. Mai recent el este folosit şi în prevenirea cancerului de colon [13]. Această acţiune terapeutică extrem de complexă a Nurofenului, din păcate, este asociată cu multiple reacţii adverse, dintre care unele sunt insuficient investigate sub aspectul formelor histopatologice şi ultrastructurale pe care le îmbracă şi al dinamicii lor.

În prezent, este cunoscut că atât efectul terapeutic cât şi reacţiile adverse ale tuturor antiinflamatoarelor nesteroidiene sunt strâns corelate cu farmacocinetica lor. În ceea ce priveşte Nurofenul, studiile au demonstrat că ficatul, mai exact citocromul P450 hepatic este fundamental în biotransformarea şi, implicit, în activarea medicamentului [2, 12]. Eliminarea din organism a medicamentului se face în principal pe cale renală (54-64%), atât sub formă nemodificată cât şi sub forma unor metaboliţi glucuronici conjugaţi sintetizaţi la nivel hepatic. Restul de 36-46% de medicament este excretat prin bilă şi finalmente prin fecale. Deci, din cele menţionate anterior, deducem că biotransformarea şi, implicit, activarea Nurofenului este strâns corelată cu activitatea hepatică, iar excreţia lui, ca atare sau sub forma conjugaţilor glucuronici, este dependentă în principal de funcţia renală, dar şi de cea a ficatului [10]. Aşa se explică de ce modificând farmacocinetica acestui produs medicamentos şi/sau a principiilor sale active se poate, pe de o parte, altera eficacitatea sa terapeutică şi, pe de altă parte, se pot exacerba efectele sale secundare [9]. Pornind de la aceste premize, ne-am propus ca prin cercetările noastre să surprindem o serie de aspecte inedite sau insuficient investigate legate de dinamica şi particularităţile modificărilor histopatologice şi ultrastructurale induse printr-un tratament nu foarte îndelungat cu Nurofen, administrat în doze terapeutice la şobolanul alb Wistar adult.

Material şi metodă. Cercetările s-au efectuat pe şobolani albi Wistar, adulţi, masculi, cu o greutate medie de 190 $\pm$ 10 grame. Animalele de experienţă au fost întreţinute în condiţii optime de laborator, asigurându-li-se îngrijirea şi hrana corespunzătoare şi apă *ad libitum*. S-a lucrat pe 8 loturi constituite din câte 8 indivizi:

-loturile martor M_1-M_4 – constituite din şobolani sănătoşi, netrataţi cu medicament;

-loturile T_1, T_2 şi T_3 - constituite din şobolani sănătoşi, trataţi zilnic cu o doză terapeutică de 250 mg Nurofen / kg corp, administrată *per os*, prin gavaj, în trei prize (una înainte de masă şi două după masă); şobolanii au fost sacrificaţi după 10, 20, respectiv, 35 de zile de tratament, pentru realizarea unor investigaţii structurale şi ultrastructurale;

-lotul T_4 – constituit din şobolani tratați similar loturilor T_1-T_3, doar că după cele 35 de zile de tratament a urmat o perioadă de 10 zile în care nu li s-a mai administrat nici un medicament, asigurându-li-se doar o întreținere şi o hrănire corespunzătoare.

Sacrificarea animalelor s-a făcut dimineața, la 16 ore de inaniție, după o anestezie profundă cu eter etilic, prin decapitare şi exsangvinizare. Imediat după sacrificare s-au recoltat fragmente de ficat, care au fost imediat prelucrate conform tehnicilor uzuale, astfel încât să fie posibilă realizarea în condiții optime a investigațiilor de microscopie optică şi electronică [7, 14, 18, 20].

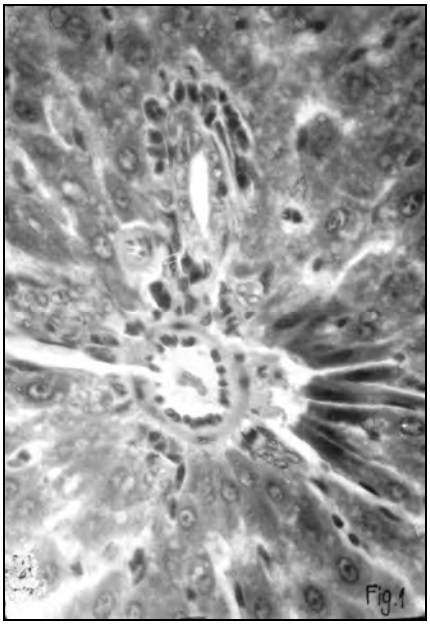
Rezultate şi discuții. Rezultatele investigațiilor noastre structurale şi ultrastructurale au condus la concluzia că Nurofenul, în condițiile experimentului nostru, exercită un efect hepatotoxic moderat, care debutează rapid, după care se accentuează în mod progresiv şi constant pe parcursul întregii perioade experimentale. Din fericire, modificările nu au un caracter generalizat, ci unul zonal şi nu îmbracă aspecte ireversibile, ceea ce face posibilă refacerea naturală, în timp a ficatului după întreruperea tratamentului. Cel mai sensibil la acțiunea acestui antiinflamator se dovedeşte a fi parenchimul hepatic şi mai puțin sensibil - sistemul de ducte biliare intra- şi interlobulare, precum şi componenta vasculară a ficatului.

Modificări structurale induse de Nurofen la nivelul ficatului

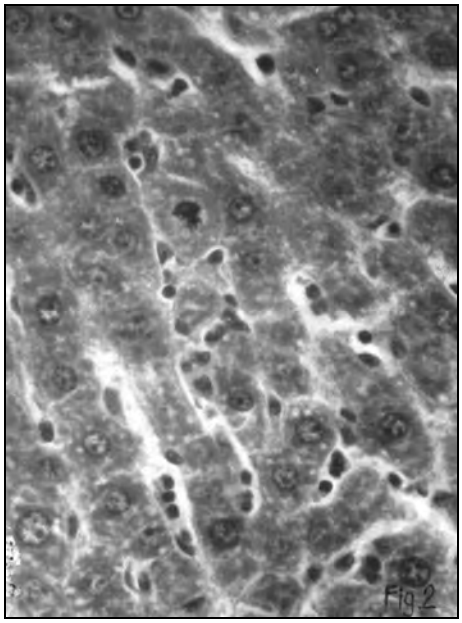
La microscopul optic, acțiunea hepatotoxică a Nurofenului a fost decelabilă după doar 10 zile de tratament când, față de lotul martor cu o structură histologică normală, a fost remarcată o discretă perturbare a tranzitului biliar, perturbare materializată în apariția câtorva celule cu colestază, dispuse preponderent concentric spațiului port Kiernan (Fig. 1). Mai mult, pe toată suprafața lobului au putut fi semnalate fenomene clare de constituire de trombi în canaliculele biliare intralobulare, care concură la inducerea unei staze biliare intraductale (Fig. 2).

După 20 de zile de tratament, efectul hepatotoxic al acestui medicament pare să se accentueze, în sensul că fenomenul de colestază intrahepatocitară apare mult mai clar exprimat şi de această dată cuprinde nu doar hepatocite izolate, ci grupuri de celule. În plus, se remarcă şi o congestie moderată a vaselor sanguine intra- şi interlobulare şi procese discrete de degenerescență granulo-vacuolară cu o dispunere zonală (Fig. 3). În unele spații porte apar infiltrate limfohistiocitare nu foarte bogat reprezentate, infiltrate care au o dispunere perivasculară şi pericanaliculară.

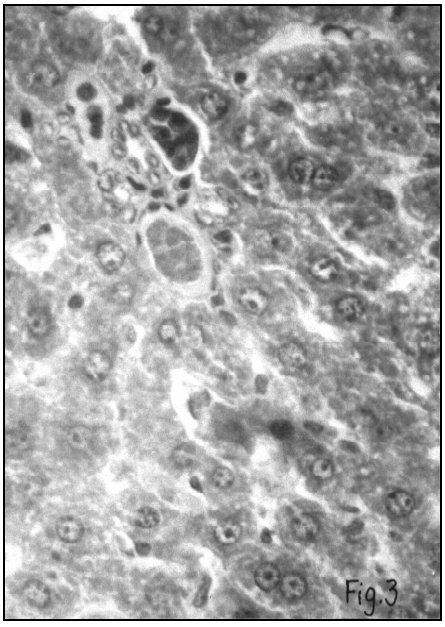
La finele celor 35 de zile de tratament, fenomenele de colestază intrahepatocitară şi intracanaliculară nu numai că persistă, dar se şi intensifică, în timp ce reacția limfohistiocitară devine mult mai evidentă, este masivă şi dispusă pericanalicular, îmbrăcând aspectele histopatologice tipice ale periangiocolitei limfohistiocitare (Fig. 4).



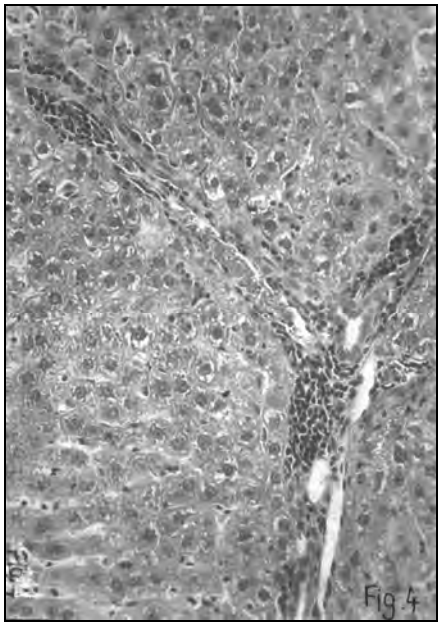
F i g. 1. *Creşterea numerică a canaliculilor biliari interlobulari;colestază intrahepatocitară concentrică spaţiului Kiernan (x 1280).*



F i g. 2. *Tromboză difuză în canaliculii biliari intralobulari (x 1280).*



F i g. 3. *Degenerescenţă granulo-vacuolară discretă, colestază intrahepatocitară zonală şi congestie moderată în vasele intra- şi interlobulare (x 1280).*



F i g. 4. *Infiltrat limfohistiocitar masiv la nivelul spaţiului interlobular Kiernan (x 512).*

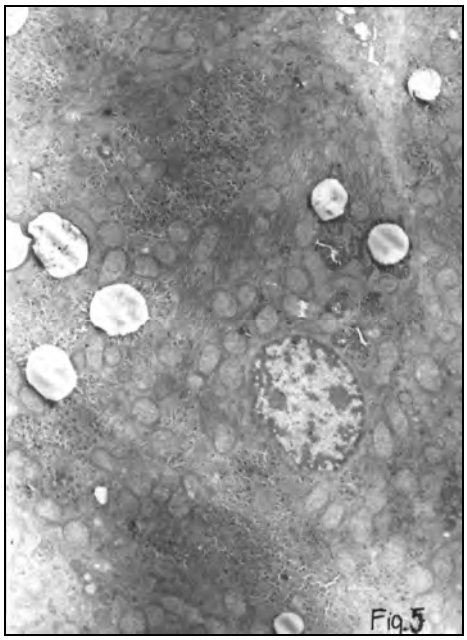
De asemenea, se constată că Nurofenul concură la inducerea unor procese dismetabolice, mai exact a unor distrofii lipidice, traduse morfologic prin apariția a numeroase hepatocite cu încărcare sau supraîncărcare grasă. Astfel, citoplasma acestor celule apare invadată de picături lipidice de dimensiuni variate. Cel mai adesea, nucleul nu pare a fi afectat de această încărcare cu picături lipidice, nici topografic şi nici structural. Zonal, distrofia evoluează către degenerescență, hepatocitele pierzându-şi conturul poligonal, dobândind o formă sferică, având citoplasma invadată de picături lipidice mari, nucleul lor apare balonizat şi cu o dispoziție uşor excentrică. Până în acest stadiu, distrofia şi degenerescența lipidică reprezintă modificări histopatologice reversibile, celula păstrându-şi încă capacitatea de a reveni la structura inițială, dacă se înlătură factorii cauzali. Însă, punctiform, pe întreaga suprafață a lobului, se constată şi apariția de hepatocite surprinse în diferite stadii de necroză sau necrobioză (citoplasmă invadată de multiple picături lipidice, nucleu cu o structură profund dezorganizată, cu hipercromatoză corticală sau cu o evidentă tendință spre picnozare).

La lotul T_4 - care după cele 35 de zile de tratament cu Nurofen a urmat o perioadă de 10 zile în care nu s-a mai intervenit cu nici un fel de medicație, s-a constatat o reducere semnificativă a proceselor alterative şi degenerative atât la nivelul parenchimului hepatic cât şi al sistemului biliar intra- şi interlobular, precum şi al componentei vasculare sanguine.

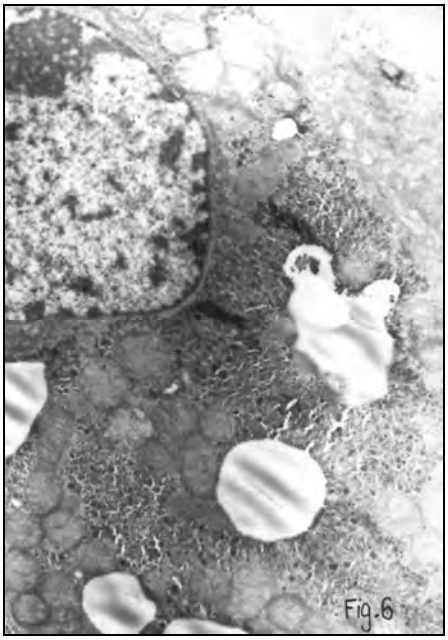
Modificări ultrastructurale induse de Nurofen la nivelul ficatului

Procesele distructive evidențiate prin investigațiile de microscopie optică apar mult mai clar pe imaginile electronomicroscopice, la nivelul cărora pot fi sesizate şi aspecte noi ale hepatotoxicității Nurofenului, care scapă investigațiilor de microscopie optică. Aspectele ultrastructurale înregistrate reflectă afectarea semnificativă a componentei celulare hepatice şi mai discretă a canaliculelor biliare, precum şi a componentei vasculare intra- şi interlobulare. Dinamica modificărilor ultrastructurale concordă cu cea a modificărilor histopatologice, în sensul că ele sunt deja decelabile electronomicroscopic după doar 10 zile de tratament, dar amploarea şi extinderea maximă o ating abia la finele celor 35 de zile de medicație cu acest antiinflamator nesteroidian. Astfel, comparativ cu lotul martor cu un aspect normal al parenchimului hepatic, la finele tratamentului se constată că majoritatea hepatocitelor prezintă o încărcare grasă (distrofie lipidică) semnificativă. Uneori picăturile lipidice au dimensiuni reduse (Fig. 5), dar alteori ele confluează şi constituie picături mari (Fig. 6), care exercită o anumită presiune asupra nucleului pe care îl deplasează către periferie. Toate acestea sunt semne precoce ale unei degenerescențe grave. Din fericire, depunerile lipidice se limitează doar la citoplasma hepatocitelor, fără a se asocia cu fenomene de rofeocitoză prin care lipidele străbat membrana nucleară şi ajung în nucleoplasmă şi chiar în nucleoli.

Subliniem că distrofia lipidică hepatocitară este corelată cu absența lipidelor la nivelul celulelor Ito, ceea ce pledează pentru o alterare certă a tranzitului de lipide din celulele hepatice.



F i g. 5. *Stadiu incipient de degenerescenţă grasă hepatocitară (x 5250).*



F i g. 6. *Stadiu avansat de degenerescenţă grasă hepatocitară (x 8400).*

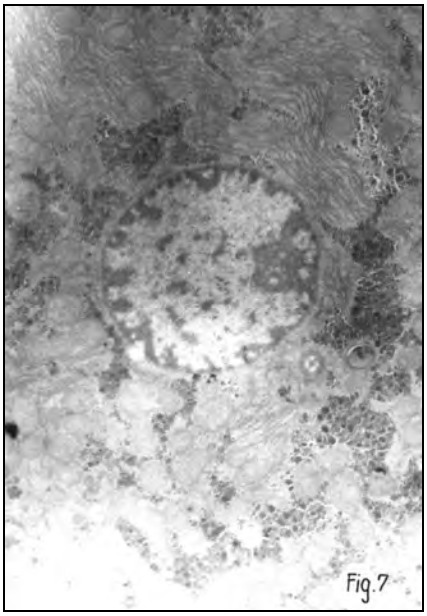
Simultan cu încărcarea grasă, în multe celule hepatice se înregistrează şi o acumulare masivă de glicogen, care apare dispus sub forma unor plaje, în mod uniform în întreaga citoplamă (Fig. 7).

Nucleul hepatocitelor se dovedeşte a fi relativ sensibil la tratamentul cu Nurofen, sensibilitate materializată într-o discretă modificare a formei sale şi într-o condensare destul de accentuată a cromatinei pe suprafaţa internă a membranei nucleare.

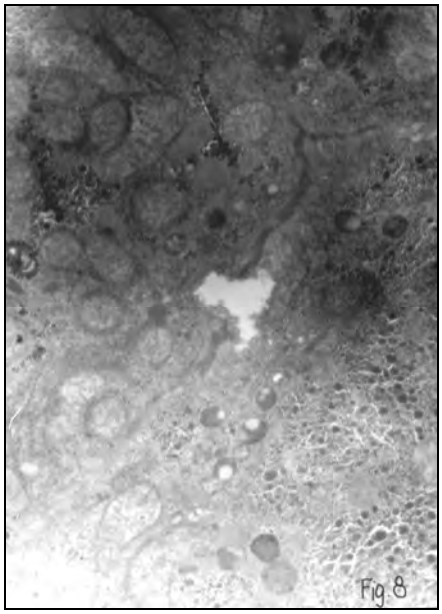
În ceea ce priveşte organitele celulare, electronomicroscopic s-a putut constata o creştere a numărului de lizosomi şi peroxisomi intrahepatocitari (Fig. 8), în paralel cu o uşoară reducere numerică a mitocondriilor, care, în plus, apar balonizate şi prezintă o matrice rarefiată şi un număr diminuat de criste (Fig. 9), ceea ce reflectă o alterare semnificativă a echilibrului energetic al celulei. Reticulul endoplasmic neted pare a fi şi el afectat de Nurofen, dobândind un aspect vezicular generalizat.

Modificările ultrastructurale ale hepatocitelor sunt asociate cu perturbări moderate ale tranzitului biliar, concretizate în instalarea colestazei intrahepatocitare (vizibilă şi la microscopul optic), materializată în apariţia a numeroşi corpi biliari intracitoplasmatici.

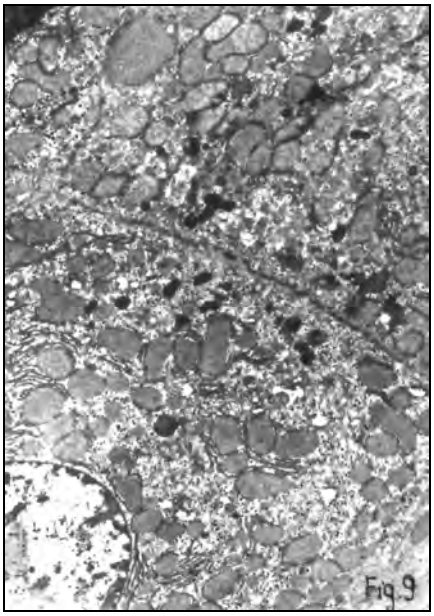
Staza biliară a fost semnalată nu numai la nivel intrahepatocitar, ci şi în canaliculele biliare intralobulare, care apar dilatate şi lipsite de microvili, consecinţă a unei alterări zonale a membranei celulelor hepatice care funcţional se va traduce printr-o perturbare a procesului de reabsorbţie a substanţelor refolosibile, utile (Fig. 8 şi 10).



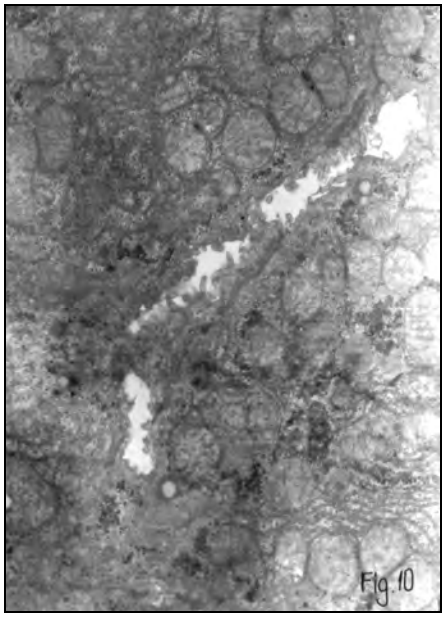
F i g. 7. *Acumulare masivă de glicogen la nivelul citoplasmei hepatocitului (x 8400).*



F i g. 8. *Dilatarea canaliculelor biliare intralobulare corelată cu alterarea semnificativă a bordurii de microvili intraductali (x 12600).*



F i g. 9. *Creşterea numărului de corpi lizosomali peribiliari; scăderea numerică şi dezorganizarea structurală a mitocondriilor hepatocitare (x 8400).*

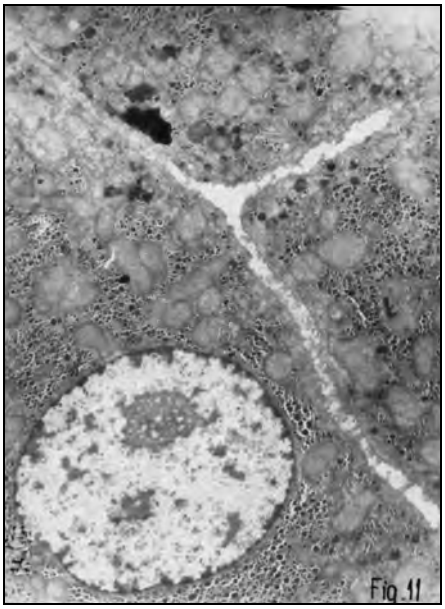


F i g. 10. *Stază biliară intracanaliculară şi distrugerea zonală a bordurii de microvili (x 12600).*

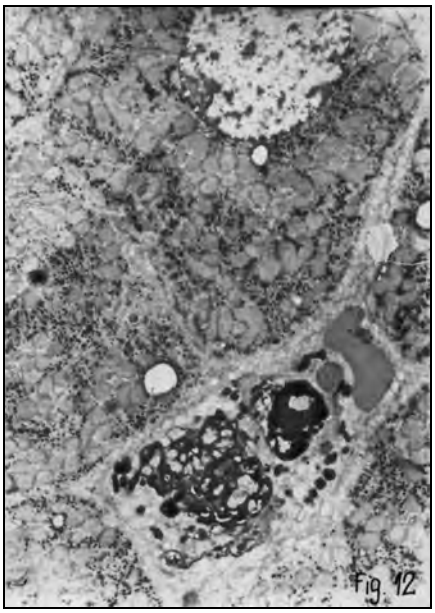
Ca urmare a formării de trombi care obturează lumenul canaliculelor biliare, presiunea în interiorul acestora creşte în mod semnificativ, fapt pentru care, zonal, se ajunge la desfacerea joncțiunilor interhepatocitare de tipul desmosomilor în aria adiacentă canaliculelor afectate, ceea ce conduce la lărgirea spațiilor interhepatocitare (Fig. 11).

Unele hepatocite sunt mai drastic afectate de tratamentul cu Nurofen, ele fiind surprinse în diferite stadii de necroză sau necrobioză.

Dacă investigațiile microscopo-optice nu ne-au permis observarea unor modificări la nivelul celulelor Kupffer din capilarele sinusoide, pe imaginile de microscopie electronică am putut sesiza o intensificare a activității lor fagocitare demonstrată de o încărcare masivă a lor cu material fagocitat surprins în diferite stadii de digestie (Fig. 12).



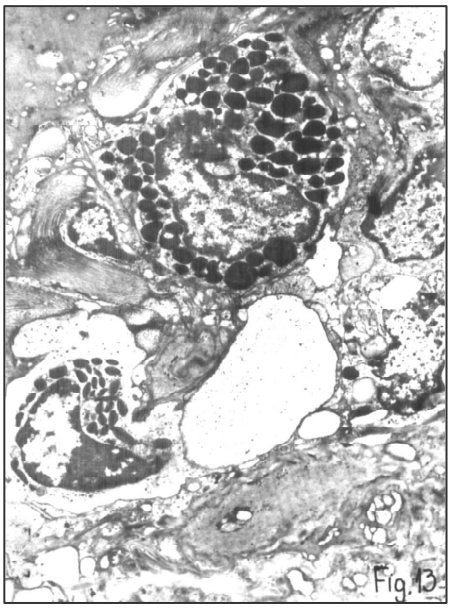
F i g. 11. *Desfacerea joncțiunilor cu lărgirea spațiilor interhepatocitare şi creşterea rezervelor glicogenice intrahepatocitare (x 8400).*



F i g. 12. *Celulă Kupffer cu intensă activitate fagocitară (x 6720).*

Reacția de hipersensibilitate imediată indusă prin tratamentul cu Nurofen la nivel hepatic este clar vizibilă la microscopul electronic, care a făcut posibilă semnalarea la nivelul multor spații porte a numeroase infiltrate limfohistiocitare abundente (decelabile şi la microscopul optic), corelate cu prezența a numeroase mastocite acompaniate de relativ numeroase eozinofile atrase la acest nivel de factorii chemotactici eozinofili eliberați de mastocite (Fig. 13).

Alături de parenchimul hepatic se constată şi o discretă afectare a componentei vasculare a ficatului concretizată într-o stază sanguină moderată la nivelul capilarelor sinusoide, mai accentuată concentric spațiului port, deci la periferia lobulilor hepatici clasici.



F i g. 13. *Infiltrat cu mastocite ¿i eozinofile ¿i discret¾ proliferare de colagen în spaßiul Kiernan (x 7220).*

În prezent, se cunoaşte că în cadrul unității „medicament-organism” se stabilesc relații de reciprocitate, întrucât medicamentele influențează organismul până la nivelul ultrastructurilor celulare, dar şi organismul la rândul său are capacitatea de a dirija “soarta” medicamentului asimilat. Cu foarte puține excepții, majoritatea medicamentelor sunt transformate la nivelul organismului prin reacții biochimice într-o serie de metaboliți, care uneori se elimină ca atare, dar, în majoritatea cazurilor, ei sunt conjugați, iar produşii rezultați reprezintă forma principală de eliminare. Acest aspect este valabil şi pentru întreaga familie de produse antiinflamatoare nesteroidiene.

Deşi biotransformarea medicamentelor este considerată ca fiind un proces de detoxifiere, există multe cazuri în care molecule inactive se transformă numai prin metabolizare în compuşi activi. Această situație este valabilă şi Nurofenului, cunoscut fiind că citocromul P450 hepatic este “instrumentul” principal implicat în biotransformarea şi, totodată, în activarea medicamentului, biotransformare care conduce la apariția a doi metaboliți majori: derivatul hidroxilic şi cel carboxilic al medicamentului [2, 12].

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

Din cele menționate anterior deducem că atât biotransformarea şi, implicit, activarea Nurofenului, cât şi excreția lui ca atare sau sub forma conjugaților glucuronici este dependentă de funcția hepatică [10]. Aşa se explică de ce modificând farmacocinetica acestui produs medicamentos şi/sau a principiilor sale active se poate, pe de o parte, altera eficacitatea terapeutică a sa şi, pe de altă parte, se pot exacerba reacțiile sale adverse [9]. Astfel, s-a constatat că disfuncțiile ficatului, în principal insuficiența hepatică poate conduce la perturbări importante ale farmacocineticii, potențialului terapeutic şi, nu în ultimul rând, ale toxicității Nurofenului [10].

Intensitatea, durata şi chiar tipul de acțiune al medicamentelor antiinflamatoare (inclusiv al Nurofenului) depind de gradul şi caracteristicile biotransformărilor, rolul determinant revenind mecanismelor biochimice de metabolizare, la baza cărora

se află activitatea enzimelor, factorul cel mai important care reglează nivelul medicamentului în organism şi, implicit, efectele farmacologic-terapeutice ale acestuia [2, 9, 10, 12].

Potrivit cercetărilor în domeniu, produsele medicamentoase antiinflamatoare nesteroidiene (inclusiv Nurofenul) au, în general, un profil toxic substanțial, deloc neglijabil, concentrate, în principal, asupra tractului gastrointestinal, rinichilor, ficatului, măduvei hematogene şi cordului. Organismele cu risc toxic crescut sunt cele mai în vârstă, cele care au suferit sau suferă de boli cardiace, renale, hepatice, ulcere şi cele predispuse la accidente hemoragipare (16).

Studiile referitoare la toxicitatea Nurofenului la nivelul aparatului digestiv demonstrează că aceasta se exercită nu numai asupra tractului digestiv, ci şi asupra glandelor sale anexe, în principal asupra ficatului. În acest sens, B e n d e l e şi colab. [5], W a r d şi colab. [27] şi B r o w n e şi colab. [8] au constatat experimental că tratamentele îndelungate, de 60-90 zile, cu doze terapeutice de Nurofen conduc la o hepatomegalie accentuată. Aceasta, potrivit investigațiilor de microscopie optică, este consecința atât a unei hipertrofii şi hiperplazii a celulelor hepatice, dar şi a unei proliferări hepatocelulare. În plus, proliferarea hepatocelulară se asociază cu apariția infiltratelor eozinofilice (semnalate şi în cadrul investigațiilor noastre) şi arareori cu aspectele histopatologice tipice unei hepatite severe [11].

Rezulatatele histologice şi ultrastructurale obținute în cadrul experimentului nostru coroborate cu cele ale altor cercetători care au abordat problema hepatotoxicității Nurofenului relevă sensibilitatea destul de accentuată a ficatului de şobolan la acțiunea acestui antiinflamator administrat în doză terapeutică, sensibilitate care în concepția toxicologilor ar reprezenta o intoxicație acută [1, 3, 26].

Leziunile hepatice înregistrate de noi la loturile tratate reflectă corelația directă existentă între doza cumulativă de medicament – dependentă de durata tratamentului şi amploarea efectului hepatotoxic. Modificările alterative şi degenerative induse de Nurofen sunt de o agresivitate variabilă, pornindu-se de la o discretă stază sanguină, colestază intrahepatocitară şi intraductală, uşoară balonizare a celulelor hepatice şi ajungându-se până la instalarea unui sindrom distrofic cu evoluție progresivă, a unor fenomene ireversibile de degenerescență şi chiar de necrobioză şi necroză zonală, punctiformă a hepatocitelor.

Alterarea sintezei proteice indusă prin tratamentul cu Nurofen ar putea reprezenta factorul determinant al apariției distrofiei grase hepatice, evidențiată atât microscopo-optic cât şi electronomicroscopic. S-ar părea că sub acțiunea acestui antiinflamator nesteroidian este perturbată sinteza proteinei apo-B, care în condiții normale are capacitatea de a se cupla cu lipidele VHD (lipide cu densitate foarte mare) de la nivelul hepatocitelor, împreună cu care formează complexe lipoproteice hidrosolubile, care facilitează descărcarea lipidelor din celulele hepatice. Blocarea sintezei acestei proteine induce acumularea progresivă a lipidelor în hepatocite [21]. Ulterior, pe măsură ce efectul toxic al Nurofenului se reduce grație eliminării sale treptate din țesuturi, sinteza acestei proteine transportatoare şi, implicit, “degresarea” hepatocitului reîncepe.

Modificările ultrastructurale ale celulelor hepatice interesează aproape toate componentele celulare: nucleul, citoplasma, anumite organite celulare (lizosomii, peroxisomii, mitocondriile şi reticulul endoplasmic), precum şi membrana celulară şi au drept consecință alterarea semnificativă a întregii activități metabolice a hepatocitelor. Aceasta influențează în mod negativ atât capacitatea ficatului de biotransformare, precum şi de eliminare din organism a produşilor de metabolizare a Nurofenului, produşi cu un potențial toxic față de anumite organe de importanță vitală. Perturbarea funcției metabolice şi de detoxifiere a ficatului va avea drept consecință o retenție mai îndelungată la nivel tisular a produşilor de metabolizare a acestui antiinflamator nesteroidian (unii dintre ei toxici), ceea ce se traduce printr-o accentuare şi extindere în timp a anumitor reacții adverse la nivelul organismului supus tratamentului.

Efectul iritativ exercitat de către Nurofen la nivelul parenchimului hepatic este clar exprimat prin prezența a numeroase infiltrate limfohistiocitare vizibile şi microscopo-optic şi electronomicroscopic, precum şi prin intensificarea activității fagocitare a celulelor Kupffer şi apariția a numeroase mastocite acompaniate de eozinofile, aspecte semnalate doar pe imaginile de microscopie electronică.

Rezultatele obținute în cadrul investigațiilor noastre denotă că deşi aspecte histopatologice şi modificări ultrastructurale clare sunt deja decelabile după doar 10 zile de tratament, că ulterior, pe întreaga durată de administrare a medicamentului, leziunile alterative şi degenerative se intensifică şi se extind în mod progresiv şi constant, acestea au doar un caracter tranzitoriu şi nu îmbracă aspecte ireversibile.

În ansamblul lor, modificările histologice şi ultrastructurale evidențiate prin investigațiile noastre de microscopie optică şi electronică relevă că Nurofenul, chiar şi în doză terapeutică şi administrat o perioadă nu foarte îndelungată, exercită un efect hepatotoxic moderat cu caracter tranzitoriu. Din fericire, leziunile induse permit refacerea naturală şi destul de rapidă a structurilor hepatice chiar şi în lipsa unei medicații adjuvante naturale sau de sinteză cu proprietăți hepatopropectoare şi/sau hepatoregeneratoare.

Rezultatele noastre confirmă şi, totodată, completează datele deja existente în literatură cu privire la efectul toxic al Nurofenului la nivelul ficatului, întrucât s-a reuşit surprinderea mai detaliată şi cu mai mare acuratețe atât a procesului lezional hepatic (sub aspectul particularităților structurale şi ultrastructurale pe care le îmbracă şi al dinamicii hepatotoxicității), cât şi a procesului reparator natural, nedirijat, care se desfăşoară după întreruperea administrării medicamentului.

Concluzii. 1. Nurofenul, în condițiile experimentului nostru, exercită un efect hepatotoxic moderat, care se instalează şi se accentuează progresiv pe întreg parcursul perioadei de tratament.

2. Modificările histopatologice şi ultrastructurale induse de acest medicament antiinflamator nesteroidian devin decelabile atât prin investigații de microscopie electronică, cât şi optică după doar 10 zile de tratament, după care se accentuează

în mod constant şi progresiv până la finele celor 35 de zile de administrare a Nurofenului, pentru ca ulterior să se reducă semnificativ sub raportul intensității şi extinderii lor.

3. Modificările histopatologice şi ultrastructurale determinate de Nurofen sunt de o intensitate variabilă, depinzând de doza cumulativă a medicamentului şi, implicit, de durata tratamentului.

4. Acest antiinflamator nesteroidian afectează preponderent parenchimul hepatic şi mai discret sistemul ductelor biliare şi componenta vasculară sanguină intralobulară.

5. Hepatocitele răspund atacului toxic al Nurofenului în mod variat, pornindu-se de la o uşoară balonizare a lor şi evoluând până la o distrofie lipidică cu caracter progresiv. Uneori s-a ajuns chiar la instalarea unor fenomene de degenerescență şi chiar necrobioză sau necroză zonală, punctiformă.

6. Ultrastructural, sensibilitatea hepatocitelor la Nurofen se materializează în instalarea unor modificări care vizează: nucleul (deformare, picnozare), citoplasma (vacuolizare, încărcare grasă şi cu glicogen), unele organite celulare: lizosomii (creştere numerică), reticulul endoplasmic (vacuolizare), mitocondriile (balonizare cu dezorganizarea matricei şi cristelor), precum şi membrana celulară (dispariția zonală a bordurii de microvili intraductali).

7. Modificările ultrastructurale ale celulei hepatice sunt corelate cu perturbarea metabolismului lor lipidic, proteic şi glucidic, tradus printr-o încărcare şi degenerescență grasă, apariția plajelor de glicogen bine reprezentate intrahepatocitar.

8. Tranzitul biliar, atât cel intrahepatocitar cât şi cel intraductal, este moderat şi tranzitoriu alterat, fapt demonstrat de instalarea colestazei intrahepatocitare şi intracanaliculare, care concură la dilacerarea parenchimului hepatic.

9. Efectul iritant exercitat de Nurofen la nivelul ficatului este clar ilustrat prin prezența a numeroase şi abundente infiltrate limfohistiocitare (preponderent în spațiile Kiernan), prin apariția a numeroase mastocite acompaniate de eozinofile, precum şi prin intensificarea activității fagocitare a celulelor Kupffer din pereții capilarelor sinusoide.

10. Leziunile alterative şi degenerative induse de Nurofen, atât la nivel structural cât şi ultrastructural, au un caracter zonal şi tranzitoriu şi nu îmbracă aspecte ireversibile, permițând desfăşurarea unor procese de refacere naturală, în timp a ficatului, fără intervenția din exterior cu vreun produs natural sau de sinteză cu potențial hepatoprotector sau hepatoregenerator.

BIBLIOGRAFIE

1. A n d e r s o n, J. R., *Muir's Textbook of Pathology*, 11th ed., Arnold, London, 1980.
2. A n t a l, E. J., W r i g h t, C. E., B r o w n, B. L., A l b e r t, K. S., A m a n, L.C., L e w i n, N. W., *The influence of hemodialysis on the pharmacokinetics of ibuprofen and its major metabolites*, "J. Clin. Pharmacol.", **26**, 1986, 184-190.

3. A v r a m, N., B e g n e s c u, R., B u c u r, E., C i o c n i t u, V., L u n g e a n u, A., M a n o l e s c u, N., P ă l t i n e a n u, D., P ă u n e s c u, G., Ş t i r b u, C., V o i c u l e s c u, I., *Citologie normală şi patologică,* Ed. Ceres, Bucureşti, 1980.
4. B a u m g a r t n e r, H., S c h w a r t z, H. A., B l u m, W., B r u h i n, A., G a l l a c h i, G., G o l d i n g e r, G., S a x e r, M., T r o s t, H., *Ibuprofen and diclofenac sodium in the treatment of osteoarthritis: a comparative trial of two once-daily sustained-release NSAIDs formulations,* "Curr. Med. Res. Opin.", **13,** 1996, 435-444.
5. B e n d e l e, A. M., H u l m a n, J. F., W h i t e, S., B r o d h e c k e r, C., B e n d e l e, R. A., *Hepatocellular proliferation in nurofen-treated mice ,"*Toxicol. Pathol.", **21**, 1993, 15-20.
6. B i l l i g m a n n, P. W., *Tolerance of ibuprofen. Controlled drug monitoring for the detection of rare side effects,* "Fortschr. Med.", **109**, 1991, 213-216.
7. B r e n d a, S. W., *A Beginner's Handbook in Biological Transmission Electron Microscopy,* Butler & Tanner, London, 1981.
8. B r o w n e, G. S., N e l s o n, C., N i g u y e n, T., E l l i s, B. A., D a y, R. O.,K e n n e t h, M. W., *Stereoselective and substrate-dependent inhibition of hepatic mitochondrial-oxidation and oxydative phosphorylation by the non-steroidal anti-inflammatory drugs ibuprofen (nurofen), flurbiprofen and ketolac,* "Biochem. Pharmacol.", **57**, 1999, 837-844.
9. B r u n e, K., B e c k, W. S., *Towards safer nonsteroidal anti-inflammatory drugs,"*Agents Actions", **32**, 1991, 13-25.
10. D a v i e s, N. M., *Clinical pharmacokinetics of Nurofen. The first 30 years,* "Clin. Pharmacokinetother.", **34**, 1998, 101-154.
11. D o b r e s c u, D., *Farmacoterapie practică,* vol. II, p. 133-145, Ed. Med., Bucureşti, 1989.
12. H a s l e r, J. A., E s t a b r o o k, R., M u r r a y, M., P i k u l e v a, I., W a t e r m a n, M., C a p d e v i l a, J., H o l l a, V., H e l v i g, C., F a l c k, J. R., F a r e l l, G., K a m i n s k y, L. S., *Human cytochromes P450,* "Molec. Aspects Med.", **20**, 1999, 131-137.
13. J o n e s, M. K., W a n g, H., P e s k a r, B. M., L e v i n, E., I a n i, R. M., S a r f e h, I. J., T a r n a w s k i, A. S., *Inhibition of angiogenesis by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: insight into mechanisms and implications for cancer growth and ulcer healing,* "Nat. Med.", **5**, 1999, 1418-1423.
14. K a y, D., *Techniques for Electron Microscopy,* Alden & Mowbray , Oxford, 1967.
15. M a x, M. B., S c h a f e r, S. C., C u l n a n e, M., D u b n e r, R., G r a c e l y, R. H., *Association of pain relief with drug side effects in postherpetic neuralgia: a single-dose study of clonidine, codeine, Nurofen, and placebo,* "Clin. Pharmacol. Ther.", **43**, 1988, 363-371.
16. M c G e t t i g a n, P., H e n r y, D., *Current problems with non-specific COX inhibitors,* "Curr. Pharmacol. Res.", **6**, 2000, 1693-1724.
17. M u n c i e, H. L., N a s r a l l a h, S. M., *Diflunisal and ibuprofen (nurofen): effects on gastric and duodenal mucosa in patients with osteoarthritis,* "Clin. Ther.", **11**, 2001, 539-544.
18. M u r e ş a n, E., G a b o r e a n u, M., B o g d a n, A. T., B a b a, A. I., *Tehnici de histologie normală şi patologică,* Ed. Ceres, Bucureşti, 1974.
19. N i e l s e n, D., *A study of naproxen and nurofen in patients with osteoarthritis seen in general practice,* "Curr. Med. Res.", **9**, 1984, 41-46.
20. P l o a i e, P. G., P e t r e, Z., *Introducere în microscopia electronică cu aplicaţii în biologia celulară şi moleculară,* Ed. Acad. Rom., Bucureşti, 1979.
21. P r e l w i t z, W., L a w r e n c e, S. H., M e i s t e r, A., *Enzymatic activity related to human serum beta-lipoproteins,* "Biol. Chem.", **243**, 1986, 140-147.

22. R o y, S., *A double-blind comparison of a propionic acid derivate (nurofen) and a fenamate (mefenamic acid) in the treatment of dysmenorrhea*, "Obstet. Gynecol.", **61**, 1983, 628-632.
23. S t r a t m a n, N. C., C a r t e r, D. B., S e t h y, V. H., *Nurofen: effect on inducible nitric oxide synthase*, "Brain Res.", **50**, 1997, 107-112.
24. T a b e e v a, G. R., L e v i n, I. I., K o r o t k o v a, S. B., K h a n u n o v, I. G., *Treatment of fibromyalgia*, "Therapy", **48**, 1998, 516-518.
25. T h a i, Q. A., O s h i r o, E. M., T a m a r g o, R. J., *Inhibition of experimental vasospasm in rats with the periadventitial administration of nurofen using controlled-release polymers*, "Stroke", **30**, 1999, 140-147.
26. T i m a r, M., *Modificări morfologice produse de substanţe hepatotoxice*, în *Bazele terapiei raţionale a ficatului*, p. 93-100, Ed. Centralei Industriale de Medicamente, Cosmetice, Coloranţi şi Lacuri, Bucureşti, 1982.
27. W a r d, P. H., M a l d o n a d o, M., R o a, J., M a n r i q u e z, V., V i v a l d i, E., *Nurofen protects rat livers from oxygen-derived free radical-mediated injury after tourniquet shock*, "Free Radic. Res.", **22**, 1995, 561-569.

STUDIA UNIVERSITATIS BABEŞ-BOLYAI, BIOLOGIA, XLVIII, 2, 2003

MODIFICĂRI STRUCTURALE ŞI ULTRASTRUCTURALE INDUSE DE NUROFEN LA NIVELUL COMPONENTELOR MUCOASEI GASTRICE LA ŞOBOLANUL ALB WISTAR

CRISTINA PAŞCA*, CONSTANTIN CRĂCIUN** şi VICTORIA-DOINA SANDU*

SUMMARY. – Structural and Ultrastructural Modifications Induced by Nurofen at the Level of the Components of Gastric Mucosa in White Wistar Rats. According to the light and electron microscopy investigations carried out by us, the dose of 250 mg Nurofen/kg body weight, administered for 35 days, has a significant toxic effect on the whole gastric mucosa of the white Wistar rats, but especially upon the body and fundic region of the stomach. Obvious modifications induced by this nonsteroidial anti- inflammatory drug could be noticed, even after 10 days of treatment, and got worse progressively and continuously until the end of the experimental period. Nurofen, a drug widely used by people in the whole world, disturbed significantly both the vascular and cellular components in the gastric mucosa, especially the mucous surface cells and the gastric gland epithelium (chief cells, parietal cells, endocrine cells, mucous neck cells and auxiliary cells). The lamina propria and muscularis mucosae were discretely affected by the treatment with Nurofen.

Ultrastructurally, the alteration of the chief cells affected principally their nuclei, which appeared pycnotic, retracted, hyperchromatic, with a peculiar disposition of the chromatin and with a swollen nuclear envelope. The oedema affected the rough-surfaced endoplasmic reticulum and mitochondria of these cells, too. As a direct consequence of all structural changes described above, there was a significant decrease of the pepsinogen secretory activity.

At the level of parietal cells we could observe the appearance of some intracytoplasmic lysis phenomena, correlated with a progressive necrosis process. The most sensitive organelles seemed to be the mitochondria, which appeared swollen and greatly alterated, having the matrix and cristae seriously affected. Besides, the secretion of HCl by these cells decreased significantly.

Among the endocrine cells of the gastric mucosa, only a few types of them seemed to be affected by Nurofen. These cells presented an obvious vacuolised cytoplasm, pycnotic nuclei, swollen mitochondria, and just a small number of secretion drops. Possibly, the cells altered by this drug were those responsible for the synthesis of serotonine. That could justify the serious alteration of the vascular component in stomachal mucosa and submucosa (vascular congestion, blood stasis and numerous microhaemorrhages), which could induce and maintain the necrosis processes.

Both the auxiliary and mucous neck cells in gastric mucosa seemed to be resistant to the treatment with this antiinflammatory medicine.

Fortunately, our investigations demonstrated that the neighbouring gastric glands had a polymorphous histological and ultrastructural aspect, demonstrating that Nurofen had no identical effect on their structure and function. In addition, generally, the alterations induced by this drug had no irreversible character, a recovery process of the gastric mucosa after the end of the treatment being thus possible.

* *Universitatea „Babeş-Bolyai”, Catedra de Zoologie, 3400 Cluj-Napoca, România. E-mail: cpasca@biolog.ubbcluj.ro*
** *Universitatea „Babeş-Bolyai”, Catedra de Fiziologie animală, 3400 Cluj-Napoca, România*

Inflamația este o reacție complexă, neurotropă, vasculară şi metabolică, declanşată de pătrunderea unor agenți patogeni străini sau produşi de degradare proprii în țesuturile sănătoase ale unui organism. Este o reacție de apărare şi are unele mecanisme comune cu infecția şi cu alergia. Inflamația este un proces dinamic, care constă în apariția unor modificări locale şi generale, expresii ale tulburărilor provocate de agentul patogen, dar şi ale reacțiilor de restabilire a funcțiilor alterate. Prin aceste modificări organismul tinde să inactiveze agentul cauzal, să înlăture produsele de degradare existente în focarul inflamator şi să refacă țesuturile lezate. În unele cazuri procesul inflamator se finalizează cu vindecarea şi restabilirea funcțiilor organismului. Alteori fenomenele inflamatorii devin o boală, se cronicizează şi se stabileşte un ciclu continuu: inflamație – distrucție tisulară – inflamație. Cauzele inflamației pot fi de natură microbiologică (bacterii, virusuri), imunologică (produşi implicați în reacții antigen-anticorp), fizică (traume, corpi străini, radiații), chimică (substanțe acide sau alcaline iritante) [4].

Medicamentele folosite pentru tratarea bolilor inflamatoare, din punct de vedere terapeutic, se grupează în: antiinflamatoare cu efect imediat, antiinflamatoare de bază, alte antiinflamatoare şi produse medicamentoase adjuvante.

Antiinflamatoarele cu efect imediat se mai numesc şi „fast acting antirheumatic drugs” şi se caracterizează printr-un efect terapeutic prompt, dar de scurtă durată, dispărând rapid după întreruperea administrării lor. Ele au o acțiune simptomatică, diminuând sau chiar înlăturând unele simptome şi semne ale inflamației în bolile reumatice cronice sau de altă natură, dar nu modifică evoluția procesului patologic. Aceste medicamente se grupează în două categorii: antiinflamatoare steroidiene (AIS) şi antiinflamatoare nesteroidiene (AINS). Din această ultimă categorie face parte şi Nurofenul - produs medicamentos larg utilizat în prezent în terapia antiinflamatoare, care are o complexă acțiune terapeutică, asociată, din păcate, şi cu multiple reacții adverse, dintre care unele insuficient investigate sub aspectul formelor histopatologice pe care le îmbracă şi al dinamicii lor în timp.

Cu toate progresele înregistrate în domeniul terapiei antireumatismale, administrarea unor doze eficiente de produse medicamentoase antiinflamatoare steroidiene şi nesteroidiene este încă însoțită de multiple şi semnificative insuccese datorate efectelor secundare exercitate asupra organismului gazdă. Acestea se materializează în apariția unor leziuni reversibile sau chiar ireversibile la nivelul unor organe vitale, care pot compromite viața individului supus tratamentului. Aceste considerente explică interesul deosebit manifestat la ora actuală pe plan mondial pentru cercetarea vastă a reacțiilor adverse ale terapiei cu medicamente antiinflamatoare, care au un spectru terapeutic extrem de larg şi diversificat.

În acest context se încadrează şi cercetările noastre, care au urmărit depistarea unor aspecte inedite referitoare la intensitatea, gravitatea şi particularitățile modificărilor structurale şi ultrastructurale induse de Nurofen (antiinflamator nesteroidian larg utilizat într-o gamă foarte largă de afecțiuni cu o mare incidență la ora actuală) la nivelul mucoasei gastrice la şobolanul alb Wistar.

Material şi metodă. Cercetările s-au efectuat pe şobolani albi Wistar, adulți, masculi, cu o greutate medie de 190 ±10 grame. Animalele de experiență au fost întreținute în condiții optime de laborator, asigurându-li-se îngrijirea şi hrana corespunzătoare şi apă *ad libitum.* S-a lucrat pe 6 loturi constituite din câte 8 indivizi:

-loturile martor M_1-M_3 – constituite din şobolani sănătoşi, netratați cu medicament;

-loturile T_1, T_2 şi T_3 - constituite din şobolani sănătoşi, tratați zilnic cu o doză terapeutică de 250 mg Nurofen/kg corp, administrată *per os*, prin gavaj, în trei prize (una înainte de masă şi două după masă); şobolanii au fost sacrificați după 10, 20, respectiv, 35 de zile de tratament, pentru realizarea unor investigații structurale şi ultrastructurale.

Sacrificarea animalelor s-a făcut dimineața, la 16 ore de inaniție, după o anestezie profundă cu eter etilic, prin decapitare şi exsangvinizare. Imediat după sacrificare s-au recoltat fragmente de stomac din regiunea: fundică, a corpului, a antrumului şi a canalului piloric. Fragmentele recoltate au fost imediat prelucrate corespunzător, conform tehnicilor uzuale, astfel încât să fie posibilă realizarea în condiții optime a investigațiilor de microscopie optică şi electronică [2, 10, 16, 19].

Rezultate şi discuții. Investigațiile de microscopie optică şi electronică au condus la concluzia că acest antiinflamator, în condițiile experimentului nostru, exercită o acțiune toxică semnificativă asupra întregii mucoase gastrice, ea fiind însă ceva mai accentuată în regiunea fundului şi corpului stomacal.

Modificări structurale induse de Nurofen la nivelul mucoasei gastrice. Studiile histologice reflectă că Nurofenul cauzează leziuni histopatologice vizibile la microscopul optic deja după doar 10 zile de tratament, când, față de lotul de control cu un perete stomacal cu o structură normală, au putut fi semnalate: o uşoară stază sanguină şi un edem discret în zona superficială a mucoasei gastrice, fără însă ca acesta să fie corelat cu alterarea integrității epiteliului superficial.

După 20 zile de tratament, alterarea componentei vasculare gastrice pare a fi marcat accentuată şi se materializează în prezența unei staze sanguine şi a unei congestii clare, ce interesează aproape întreaga grosime a mucoasei gastrice, dar mai puternic jumătatea superioară a acesteia. Pe fondul acestor perturbări de hemodinamică se remarcă şi prezența unui edem extins în toată grosimea mucoasei, care se asociază cu descuamări celulare punctiforme, ce interesează atât epiteliul de suprafață cât şi epiteliul glandular.

În regiunea fundului şi corpului stomacului, edemul moderat al mucoasei gastrice şi necroza zonală a epiteliului superficial sunt ceva mai accentuate şi corelate cu o stază uşoară la nivelul glandelor gastrice. În plus, apare semnificativ perturbată nu doar componenta vasculară a mucoasei, ci şi cea a submucoasei, în sensul că la acest nivel, multe vase apar în mod vizibil congestionate.

La finele celor 35 de zile ale experimentului nostru, investigațile de microscopie optică denotă că efectul gastrotoxic al Nurofenului s-a accentuat atât sub raportul extinderii cât şi al gravității leziunilor histopatologice induse. Astfel, necroza zonală a celulelor de la suprafața mucoasei corelată cu denudarea focală are un caracter generalizat şi interesează grupuri de celule şi nu doar celule izolate. Aceste fenomene distructive la nivelul antrumului piloric se asociază zonal şi cu apariția unor microhemoragii pe fondul unei congestii vasculare în capilarele din zona superficială a mucoasei. Celulele epiteliului gastric detaşate de pe membrana bazală împreună cu sângele mai mult sau mai puțin proaspăt extravazat din capilare concură la constituirea în interiorul lumenului stomacal a unui detritus destul de bine reprezentat cantitativ. Multe dintre hematii au un aspect normal şi manifestă o afinitate pentru coloranți asemănătoare cu hematiile neextravazate, aflate încă în lumenul vascular, ceea ce sugerează că microhemoragiile au fost recente sau chiar sunt surprinse în plin proces de desfăşurare.

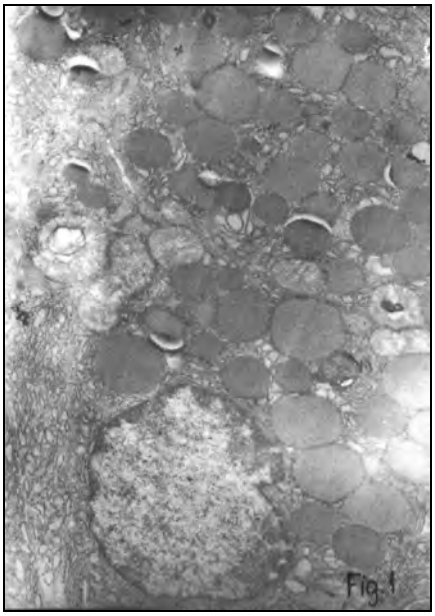
Modificări ultrastructurale induse de Nurofen la nivelul mucoasei gastrice. Procesele degenerative şi alterative ale mucoasei gastrice evidențiate prin studii de microscopie optică apar şi mai evidente pe imaginile de microscopie electronică. Acestea reflectă clar faptul că leziunile interesează atât componenta vasculară cât şi pe cea celulară, dar în principal pe aceasta din urmă, fiind posibil ca tulburările hemodinamice induse de Nurofen să contribuie la declanşarea, menținerea şi agravarea progresivă a modificărilor structurale semnalate la nivelul stomacului şobolanului alb Wistar.

Acțiunea Nurofenului la nivelul componentei celulare a mucoasei gastrice. Cercetările electronomicroscopice ale componentei celulare a mucoasei gastrice au reflectat clar că Nurofenul afectează structura majorității celulelor atât ale epiteliului glandular cât şi celui superficial, mai exact a celulelor: principale, parietale, endocrine şi mucoase.

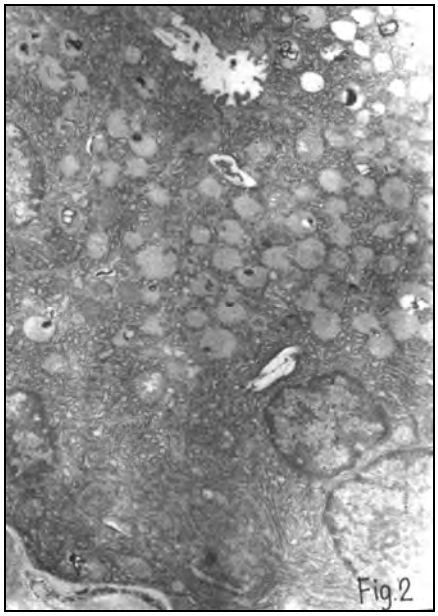
Celulele principale (adelomorfe, bazofile, zimogene), prezente preponderent în regiunea terminală a glandelor, dar şi în corpul acestora, intercalate printre celulele parietale, la lotul de control se constată că au un aspect normal: formă nedefinită, citoplasma bogată în ribosomi, ergastoplasmă, incluziuni riboproteice, sporadic şi incluziuni de glicogen şi granule de secreție deplin formate sau în curs de formare şi un nucleu sărac în cromatină [13] (Fig. 1 şi 2).

În condițiile unui tratament îndelungat cu Nurofen, celulele principale par a fi profund afectate, în sensul că în absolut toate celulele RER apare dilatat, în principal sub forma unor cisterne (mai ales în cripta şi gâtul glandei). Mitocondriile prezintă un uşor polimorfism şi sunt moderat balonizate având o matrice şi criste rarefiate şi zonal apar aprope complet lipsite de criste (Fig. 3 şi 4).

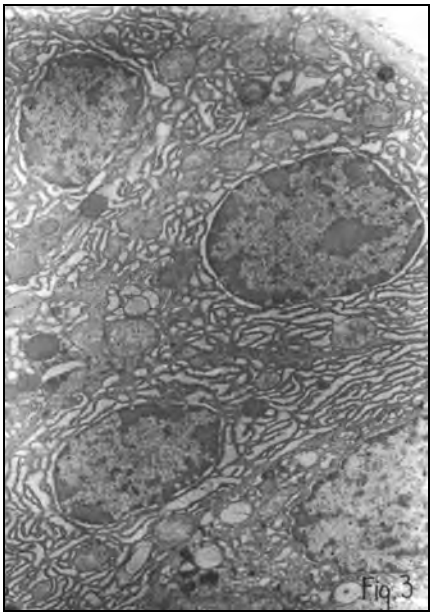
În citoplasma multor celule adelomorfe se constată apariția unor figuri mielinice care sunt nişte lizosomi terțiari formați în urma unor fenomene de autofagie intracelulară a unor organite celulare sau porțiuni de citoplasmă (Fig. 5).



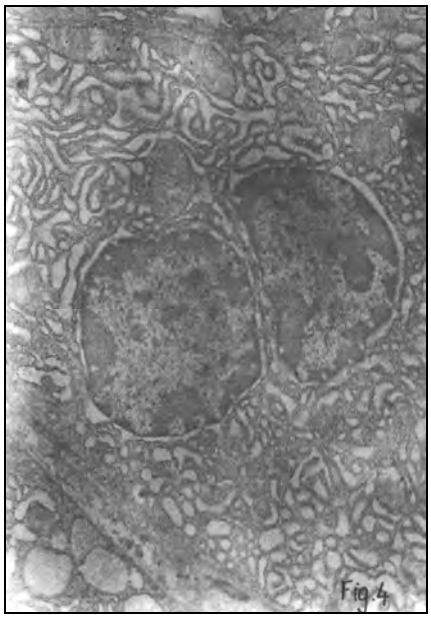
F i g. 1. *Aspectul ultrastructural al celulelor principale la lotul martor, cu numeroase granule de secreție deplin formate (x 12600).*



F i g. 2. *Aspectul ultrastructural al celulelor principale la lotul martor, cu numeroase granule de secreție în curs de formare (x 7770).*

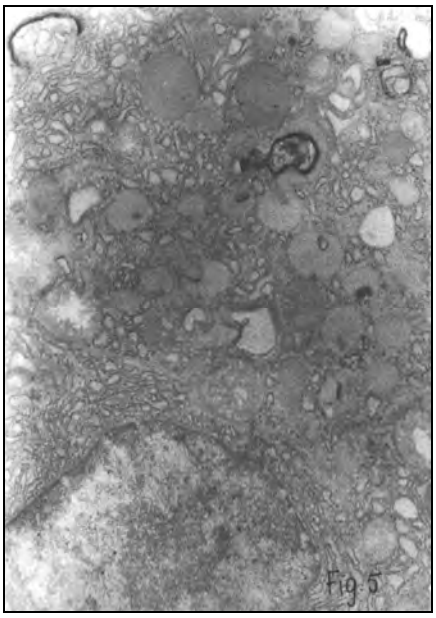


F i g. 3. *Dilatarea RER, edemațierea spațiului intermembranar nuclear şi uşor polimorfism mitocondrial în celulele principale (x 8400).*

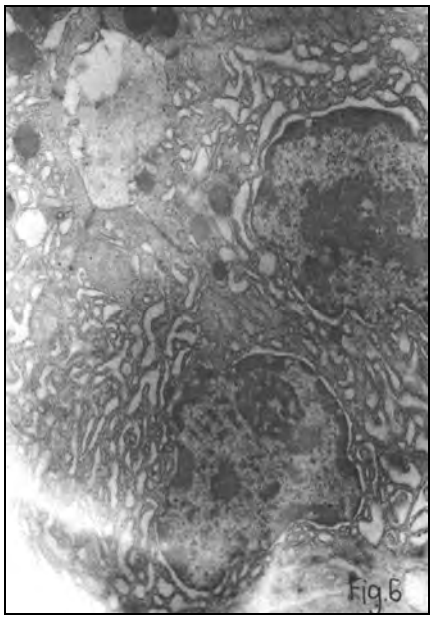


F i g. 4. *Dezorganizarea structurală a RER, mitocondriilor şi edemațierea spațiului inermembranar nuclear la celulele principale (x 12600).*

Nucleul celulelor principale pare a fi extrem de sensibil la acțiunea acestui medicament antiinflamator. În multe celule conturul nuclear este neregular, nucleul devine hipercrom, având o structură mai densă (o rețea de cromatină dezorganizată, heterocromatina mai bine reprezentată cantitativ şi o nucleoplasmă mai densă) (Fig. 3 şi 6). În toate celulele principale spațiul intermembranar nuclear apare puternic edemațiat, dilatat (Fig. 3 şi 7). Uneori nucleii devin chiar picnotici.



F i g. 5. *Figuri mielinice multiple în citoplasma celulelor principale (x 16800).*



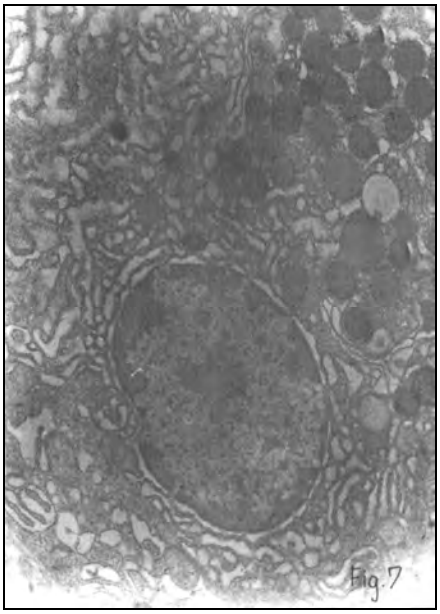
F i g. 6. *Dezorganizarea ultrastructurală a nucleului celulelor principale (x 12600).*

Consecință a tuturor acestor alterări ultrastructurale, elaborarea granulelor de zimogen este diminuată într-o mai mare sau mai mică măsură (Fig. 8 şi 9).

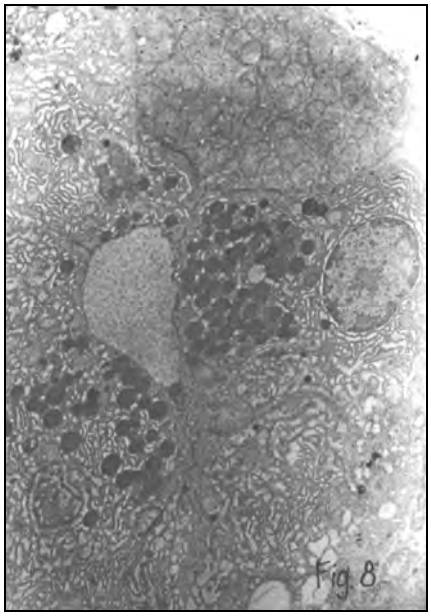
De asemenea, se constată şi o dilatare progresivă, gradată a spațiilor intercelulare, în principal la limita dintre celulele principale, dar şi între celulele principale şi cele parietale, contactul intercelular păstrându-se doar la nivelul desmosomilor. Datorită edemațierii mai accentuate sau mai discrete a spațiilor intercelulare, parenchimul glandular capătă un aspect dilacerat generalizat (Fig. 10 şi 11).

Zonal, între celulele zimogene şi cele parietale se constată apariția unor mici infiltrate de colagen tânăr, dovadă a instalării unor procese distructive cu caracter ireversibil, dar punctiforme.

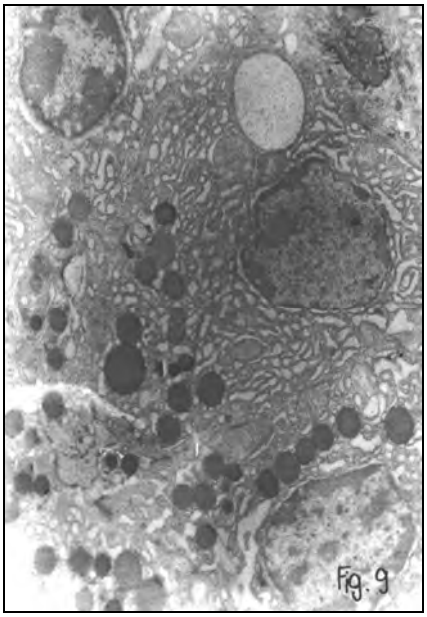
Celulele parietale (bordante, delomorfe, marginale, oxifile, oxintice, acidofile) prezente preponderent în porțiunea mijlocie (corpul) glandei, la lotul martor au un aspect normal, sunt mari, poligonale şi prezintă o citoplasmă bogată în mitocondrii, REN, glicogen, mucopolizaharide acide şi lipide şi au un nucleu sferic [13] (Fig. 12).



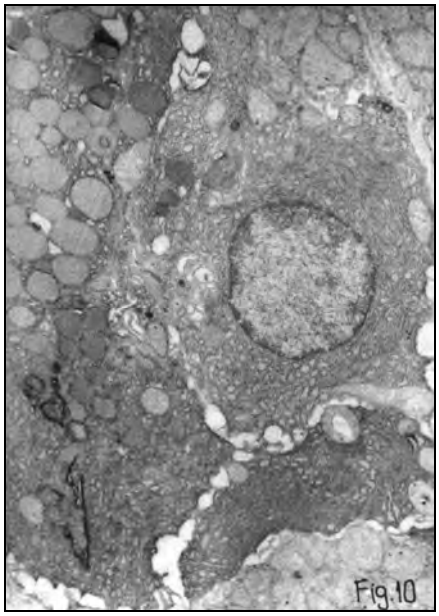
F i g. 7. *Edemaţierea spaţiului intermembanar nuclear şi dilatarea RER (x 12600).*



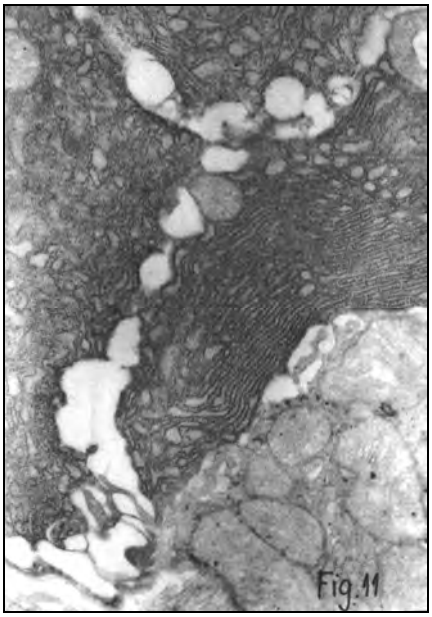
F i g. 8. *Activitate secretorie diminuată a celulelor principale (x 5250).*



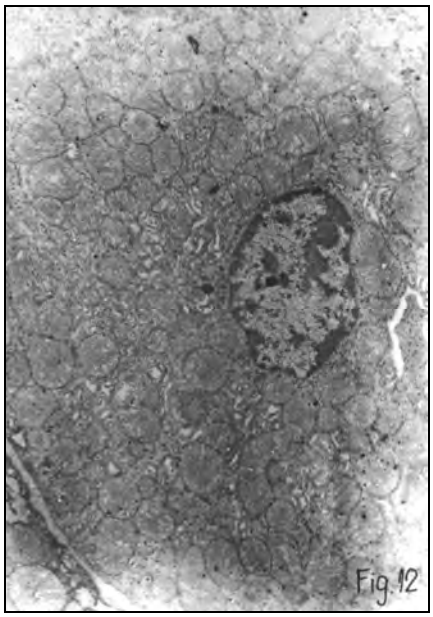
F i g. 9. *Activitate secretorie diminuată a celulelor principale (x 8400).*



F i g. 10. *Spaţiu intercelular edemaţiat la nivelul glandei gastrice (x 8400).*



F i g. 11. *Spațiu intercelular edemațiat la nivelul glandei gastrice – detaliu (x 21000).*



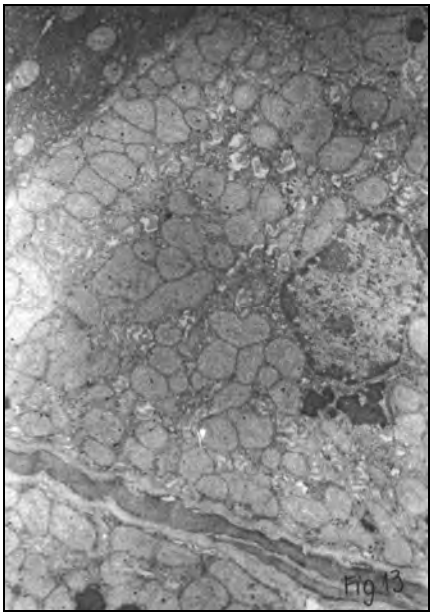
F i g. 12. *Aspectul electronomicroscopic al celulelor parietale de la lotul martor (x 8400).*

Față de martor, la lotul tratat celulele secretoare de HCl apar profund dezorganizate, la nivelul lor fiind semnalate desfășurarea unor procese de liză intracitoplasmatică cu necrozarea progresivă a lor. Ca rezultat al alterărilor intracitoplasmatice apar multiple formațiuni reziduale lizosomale, în număr relativ mare, prezente în întreaga celulă, dar concentrate mai ales perinuclear. Extrem de evident este polimorfismul mitocondrial indus prin tratamentul cu Nurofen, cu apariția multor forme aberante. Aceste organite apar balonizate şi au matricea şi cristele rarefiate; zonal, în mitocondriile puternic balonizate, cristele sunt complet distruse. Aceste aspecte sunt înregistrate în majoritatea celulelor parietale, dar mai ales în cele din regiunea fundică a glandelor.

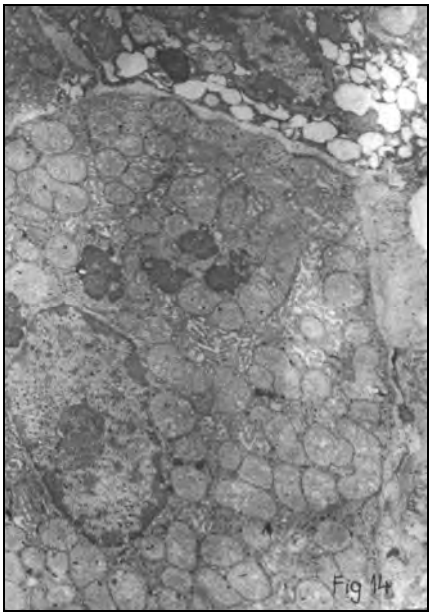
Nucleul pare a fi şi el afectat de Nurofen, dar mai puțin decât mitocondriile, el modificându-şi adesea conturul şi manifestând clar tendința de a deveni hipercromatic (Fig. 13-15).

Deci, la nivel celulelor parietale acest medicament induce certe modificări ultrastructurale, corelate cu alterarea funcției de producere a acidului clorhidric, alterare care îşi va pune ulterior amprenta asupra capacității de digestie a sucului gastric produs de aceste animale aflate sub tratament antiinflamator.

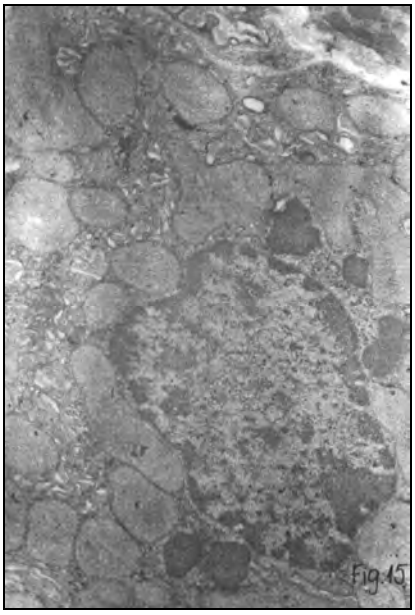
Celulele cromargentafine (endocrine), amplasate între plasmalema bazală a celulelor principale sau parietale şi membrana bazală a epiteliului glandular, au un aspect tipic, normal la lotul de control (Fig. 16).



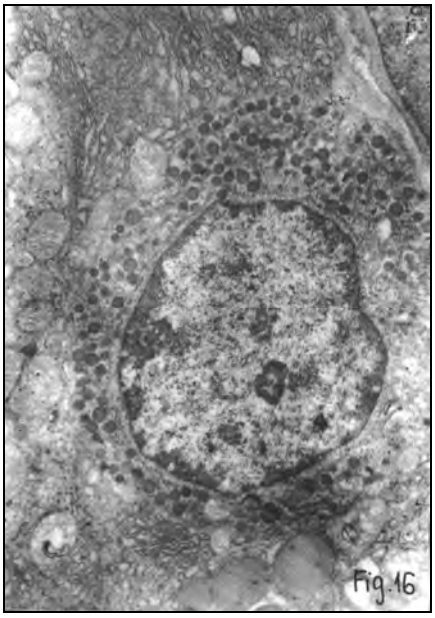
F i g. 13. *Contur nuclear modificat, polimorfism mitocondrial şi prezenţa de formaţiuni reziduale lizosomale în celulele parietale (x 8400).*



F i g. 14. *Contur nuclear modificat, polimorfism mitocondrial şi prezenţa de formaţiuni reziduale lizosomale în celulele parietale (x 8400).*



F i g. 15. *Contur nuclear modificat, polimorfism mitocondrial şi prezenţa de formaţiuni reziduale lizosomale în celulele parietale (x 16800).*



F i g. 16. *Ultrastructura unui tip de celulă cromargentafină de la lotul martor (x 12600).*

Raportându-ne la martor, la loturile tratate, dar numai către finele perioadei experimentale, se constată că un anume tip de celule endocrine prezintă o citoplasmă încărcată cu granule de secreţie de dimensiuni variate, ceea ce ar putea fi ori consecinţa unei stimulări a procesului secretor, ori a inducerii unei staze intracelulare a produşilor de secreţie (Fig. 17).

Alte tipuri de celule endocrine, însă, par a fi blocate sub aspectul activităţii secretoare, lor lipsindu-le complet granulele de secreţie. În plus, se remarcă şi o hipercromatoză corticală, o rarefiere a matricei citoplasmatice şi o "sărăcire" în organite celulare, toate acestea pledând pentru o inducere a unei hiposecreţii profunde sau chiar stoparea procesului secretor (Fig. 18).

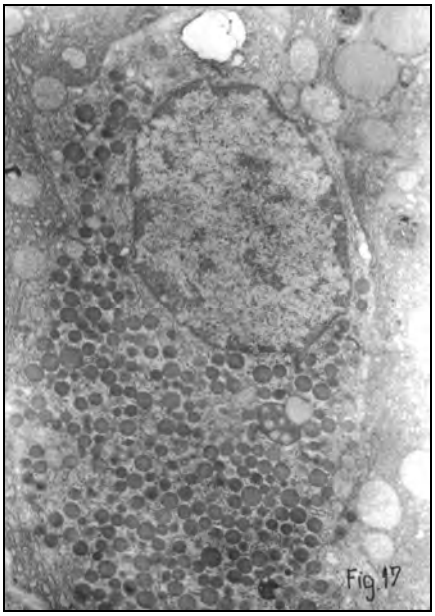
Un alt tip de celule endocrine răspund la tratamentul cu Nurofen printr-o vacuolizare, cu dezorganizarea pronunţată a citoplasmei, prin balonizarea şi vacuolizarea mitocondriilor, prin picnozarea nucleului pe fondul lipsei granulelor de secreţie. Toate acestea atestă desfăşurarea unor procese de blocare a activităţii de sinteză, urmate de atrofierea şi, finalmente, de necrozarea acestor celule endocrine (Fig. 19 şi 20).

Celulele mucoase, prezente la suprafaţa mucoasei gastrice, nu "scapă" nici ele atacului Nurofenului, prezentând adesea o vacuolizare citoplasmatică evidentă, corelată cu existenţa unui RER cu aspect vezicular şi nu canalicular normal, iar uneori nucleul prezintă o cromatină dezorganizată. Unele celule mucigene par a fi stimulate, având o activitate secretorie intensificată.

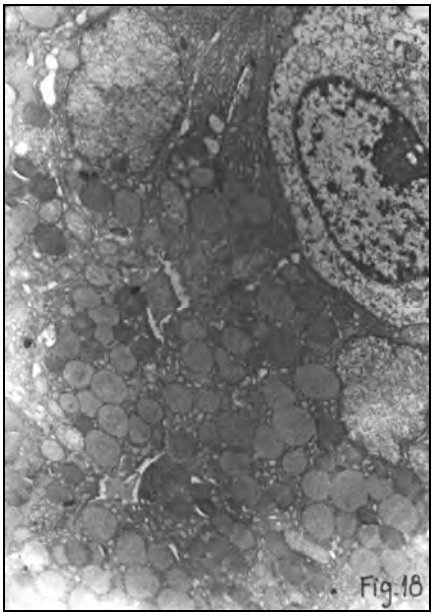
Un aspect interesant de semnalat ar fi acela că glandele gastrice vecine prezintă un aspect şi o structură a celulelor constitutive diferite, ceea ce ne duce cu gândul la inducerea de către tratamentul cronic cu Nurofen a unui polimorfism funcţional al acestora.

Celulele auxiliare (de înlocuire, mucopeptidice) din regiunea gâtului glandelor gastrice nu par a fi alterate structural prin administrarea acestui medicament, în condiţiile experimentului nostru neputându-se remarca prezenţa unor modificări decelabile prin investigaţii electronomicroscopice. Ele apar mici, au un nucleu turtit, citoplasma încărcată cu numeroşi ribosomi, RER şi complex Golgi bine dezvoltat şi multiple incluziuni de glicogen, mucopolizaharide şi riboproteine. Conservarea structurală a lor constituie un mare avantaj, cunoscut fiind faptul că, prin diviziune şi metaplaziere, ele înlocuiesc celulele îmbătrânite sau distruse atât ale epiteliului glandular cât şi ale celui superficial. În condiţiile tratamentului cu acest medicament antiinflamator când ambele componente epiteliale sunt alterate sub raportul integrităţii lor, conservarea capacităţii de refacere are o însemnătate deosebită şi chiar vitală. În plus, un alt mare avantaj ar fi acela că se păstrează secreţia lor mucoasă, care, prin absorbţie, fixează enzimele proteolitice, împiedicând acţiunea lor distructivă.

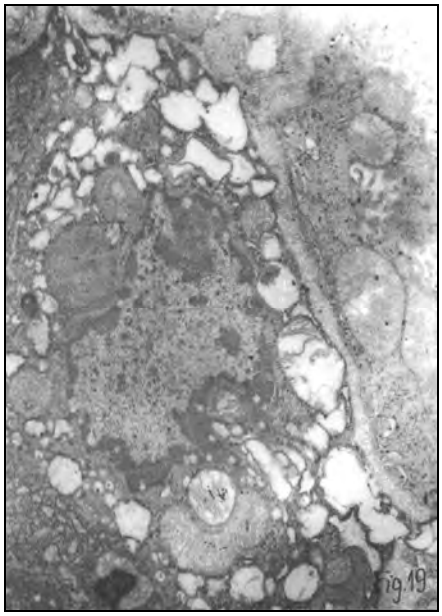
Componenta vasculară a mucoasei gastrice. Din literatură este cunoscut că unele celule endocrine ale epiteliului gastric au ca funcţie sinteza serotoninei cu acţiune vasoconstrictoare la nivelul mucoasei şi submucoasei stomacale. Posibil ca acest tip celular să fie inhibat prin administrarea îndelungată a Nurofenului, fapt care ar justifica congestia vasculară şi staza sanguină tipică tuturor capilarelor mucoasei stomacale decelabile atât prin investigaţiile de microscopie electronică cât şi optică.



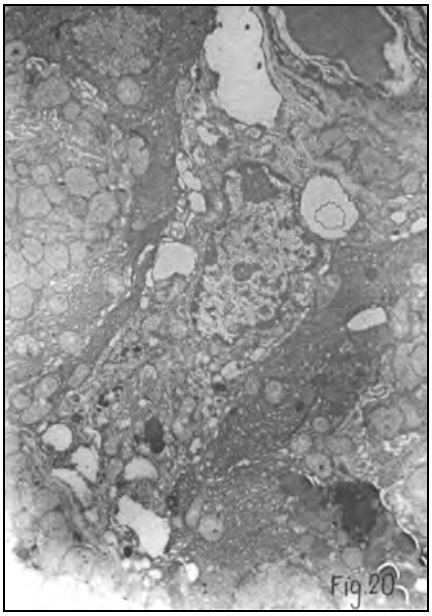
F i g. 17. *Aspectul ultrastructural al unui tip de celulă cromargentafină consecutiv administrării de Nurofen (x 12600).*



F i g. 18. *Diminuarea activității secretorii a unui tip de celulă cromargentafină (x 7140).*



F i g. 19. *Dezorganizarea ultrastructurală avansată a unui tip de celule endocrine din mucoasa gastrică (x 16800).*



F i g. 20. *Necrozarea unui tip de celule endocrine din mucoasa gastrică (x 6300).*

Rezultatele investigaţiilor noastre sunt în deplină concordanţă cu datele din literatură, potrivit cărora toate antiinflamatoarele nesteroidiene, inclusiv Nurofenul, au multiple efecte adverse gastrointestinale: greţuri, vărsături, epigastralgii, gastrită hemoragică, ulcer gastroduodenal, uneori cu perforaţie, ulcer esofagian, ulceraţii ale mucoasei bucale, diaree, toate acestea apărând cu o frecvenţă mai mare la vârstnici [4].

Se pare că tratamentul de mai lungă durată cu Nurofen cauzează reacţii adverse digestive concretizate cel mai adesea în apariţia: durerilor şi arsurilor stomacale, crampelor abdominale moderate şi tranzitorii, greţurilor, indigestiei şi constipaţiei. Uneori, toxicitatea gastrointestinală se poate materializa şi în apariţia unor ulceraţii la nivelul mucoasei digestive, a infarctelor, necrozei, atrofiei grase, necrozei musculare profunde, hemoragiilor, perforaţiilor şi obstrucţiilor mucoasei [1, 5, 8, 15, 23]. Partea proximală a tractului gastrointestinal (stomacul şi duodenul) pare a fi mult mai sensibilă la acţiunea Nurofenului comparativ cu restul tubului digestiv [5, 7, 14, 20, 22].

Hemoragiile digestive explică apariţia destul de frecventă a melenei – adică prezenţa în fecale a sângelui digerat [1, 9, 14, 18]. Investigaţiile endoscopice au arătat că Nurofenul determină destul de frecvent apariţia unor eroziuni de gradul I şi II ale mucoasei gastrice, chiar şi în condiţiile unui tratament nu foarte îndelungat, de aproximativ 14 zile [7, 9, 18]. Investigaţiile întreprinse în cadrul experimentului nostru reflectă clar că Nurofenul cauzează eroziuni semnificative ale mucoasei gastrice (în principal la nivelul epiteliului superficial şi mai discret la nivelul celui glandular), eroziuni corelate cu apariţia unor microhemoragii zonale şi punctiforme.

Este exclusă din start posibilitatea ca leziunile gastrice semnalate de către noi să fie influenţate de calea de administrare aleasă (*per os* prin gavaj), întrucât studii întreprinse în acest domeniu [3, 11] au demonstrat că toxicitatea gastrointestinală a Nurofenului este independentă de calea de administrare a medicamentului, toxicitatea digestivă a acestuia fiind o consecinţă a acţiunii sistemice şi nu a acţiunii locale, aşa cum se întâmplă în cazul altor antiinflamatoare (de tipul aspirinei).

S-ar părea că toxicitatea gastrointestinală a acestui medicament este corelată cu perturbarea producerii de prostaglandine, dar şi a unor mecanisme celulare independente de sinteza acestora [3, 6, 17, 21]. Cum sinteza prostaglandinelor este în foarte strânsă legătură cu activitatea ciclooxigenazelor, asocierea Nurofenului cu diverşi inhibitori ai ciclooxigenazelor poate contribui în mod semnificativ la reducerea toxicităţii digestive a acestui medicament [5, 23].

Potrivit studiilor anterioare [3, 12], gastrotoxicitatea ibuprofenului – substanţa activă din Nurofen, este datorată într-o mai mică măsură acţiunii iritative directe exercitate asupra mucoasei stomacale, cât mai ales acţiunii indirecte, sistemice, prin inhibarea sintezei de prostaglandine la acest nivel. Scăderea pH-ului gastric, ca de altfel şi scăderea temperaturii s-ar părea că au un efect stimulator asupra activităţii celulelor parietale din structura glandelor gastrice şi transformării metabolice a medicamentului administrat oral [3]. Potrivit unor studii anterioare, secreţia pepsinogenului de către celulele principale ale glandelor gastrice nu pare a fi modificată de către Nurofen nici chiar în condiţiile unui tratament de mai lungă durată [12].

Coroborând datele obținute de noi cu cele deja existente în literatura studiată putem concluziona că atât aspectele histopatologice, dar mai ales cele ultrastructurale înregistrate în cadrul experimentului nostru vin să completeze informațiile existente cu privire la formele şi dinamica alterărilor induse de Nurofen la nivelul mucoasei gastrice la şobolanul alb Wistar.

Concluzii. 1. Nurofenul, în condițiile experimentului nostru, exercită o acțiune toxică moderată asupra întregii mucoase gastrice a şobolanului alb Wistar.

2. Modificările induse de acest medicament antiinflamator nesteroidian au putut fi semnalate încă de la 10 zile de tratament, după care s-au accentuat în mod progresiv şi constant până la finele perioadei experimentale.

3. Acest produs medicamentos alterează atât componenta vasculară, dar în principal pe cea celulară a epiteliului gastric glandular şi superficial (celulele principale, parietale, auxiliare şi mucoase) şi într-o extrem de mică măsură corionul şi musculara mucoasei stomacale.

4. Alterarea ultrastructurală a celulelor principale interesează în principal nucleul (care apare hipercromatic, cu un contur neregulat şi cu spațiul intermembranar edemațiat), RER (care este dilatat), mitocondriile (uşor balonizate, cu matricea şi cristele rarefiate).

5. Consecință a modificărilor ultrastructurale, activitatea secretorie a celulelor principale este semnificativ diminuată.

6. Nurofenul induce fenomene de liză intracitoplasmatică cu necrozarea progresivă a celulelor parietale. Cele mai sensibile organite ale lor par a fi mitocondriile care sunt puternic polimorfe şi cu o matrice şi criste profund dezorganizate.

7. Perturbarea ultrastructurală a celulelor parietale este corelată cu reducerea secreției de acid clorhidric şi, implicit, a potențialului digestiv al sucului gastric.

8. Dintre celulele cromargentafine, doar unele par a fi sensibile la acțiunea toxică a Nurofenului, ele prezentând o citoplasmă puternic vacuolizată, mitocondrii balonizate şi nuclei picnotici, pe fondul unui număr extrem de scăzut de granule de secreție.

9. Posibil ca printre celulele endocrine afectate să se numere şi cele răspunzătoare de secreția serotoninei, cu efect vasoconstrictor local, ceea ce ar justifica alterarea componentei vasculare a mucoasei gastrice, consecutiv tratamentului cu acest antiinflamator nesteroidian.

10. Celulele mucoase din întreg epiteliul mucoasei stomacale par a fi destul de rezistente la acțiunea Nurofenului.

11. Celulele auxiliare glandulare sunt insensibile la tratamentul cu acest medicament, ceea ce reprezintă un mare avantaj în condițiile în care ele sunt responsabile de menținerea integrității sructurale a întregului epiteliu al mucoasei gastrice.

12. Glandele gastrice vecine prezintă un aspect şi o structură a celulelor constitutive diferite, ceea ce ne conduce la ideea că tratamentul cu Nurofen induce un polimorfism funcțional al acestora.

13. Alterarea componentei vasculare interesează capilarele din întreaga grosime a mucoasei şi chiar submucoasei stomacale şi se materializează prin instalarea: congestiei vasculare, stazei sanguine şi zonal chiar a unor microhemoragii punctiforme.

14. Modificările histopatologice şi ultrastructurale induse de Nurofen nu îmbracă un caracter ireversibil (cu excepţia unor proliferări punctiforme şi discrete de colagen), permiţând refacerea integrităţii structurale şi, implicit, funcţionale a mucoasei gastrice.

BIBLIOGRAFIE

1. Baumgartner, H., Schwartz, H. A., Blum, W., Bruhin, A., Gallachi, G., Goldinger, G., Saxer, M., Trost, H., *Ibuprofen and diclofenac sodium in the treatment of osteoarthritis: a comparative trial of two once-daily sustained-release NSAIDs formulations,* "Curr. Med. Res. Opin.", **13,** 1996, 435-444.
2. Brenda, S. W., *A Beginner's Handbook in Biological Transmission Electron Microscopy,* Butler & Tanner, London, 1981.
3. Deninger, M. J., Schoenwald, R. D., *Uptake of ibuprofen, indomethacin and ketoprofen into isolated rabbit parietal cells,* "J. Pharm. Pharmacol.", **52**, 2000, 501-509.
4. Dobrescu, D., *Farmacoterapie practică,* vol. II, p. 133-145, Ed. Med., Bucureşti, 1989.
5. Hawkey, C., Laine, L., Simon, T., Beaulieu, A., Maldonado – Cocco, J., Acevedo, E., Shahane, A., Quan, H., Bolognese, J., Mortensen, E., *Comparison of the effect of rofecoxid (a cyclooxygenase-2 inhibitor), ibuprofen, and placebo on the gastroduodenal mucosa of patients with osteoarthritis: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial,* "Arthritis Rheum.", **43**, 2000, 370-377.
6. Huskisson, E. C., Woolf, D. L., Balme, H. W., Scott, J., Franklin, S., *Four new anti-inflammatory drugs: responses and variations,*" Brit. Med. J.", Nr. 1, 1976, 1048-1049.
7. Ilkjaer, S., Nielsen, P. A., Bach, L. F., Wernberg, M., Dahl, J. B., *The effect of dextromethorphan, aslone or in combination with nurofen, on postoperative pain after minor gynaecological surgery,* "Acta Anaesthesiol. Scand.", **44**, 2000, 873-877.
8. Jones, R. H., Tait, C. L., *Gastrointestinal side-effects of NSAIDs in the community,* "Brit. J. Clin. Pract.", **49**, 2001, 67-70.
9. Katzka, D. A., Sunshine, A. G., Cohen, S., *The effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on upper gastrointestinal tract symptoms and mucosal integrity,* "J. Clin. Gastroenterol.", **9**, 1987, 142-148.
10. Kay, D., *Techniques for Electron Microscopy,* Alden & Mowbray , Oxford, 1967.
11. Khazaeinia, T., Jamali, F., *Evaluation of gastrointestinal toxicity of ibuprofen (nurofen) using surrogate markers in rats: effect of formulation and route of administration,* "Clin. Exp. Rheumatol.", **18**, 2001, 187-192.
12. Kullich, W., Wallner, H., Klein, G., *Determination of serum pepsinogen I and II for assessment of gastroduodenal tolerance of S (+) ibuprofen,* "Wien. Klin. Wochenschr.", **106**, 1994, 208-211.
13. Leeson, C. R., Leeson, T. S., Paparo, A. A., *Textbook of Histology,* Saunders, Philadelphia, 1985.

14. M a n n, J. F., G o e r i g, M., B r u n e, K., L u f t, F. C., *Nurofen as an over-counter drug: is there a risk for renal injury?,* "Clin. Nephrol.", **39,** 1993, 1-6.
15. M c G e t t i g a n, P., H e n r y, D., *Current problems with non-specific COX inhibitors,* "Curr. Pharmacol. Res.", **6**, 2000, 1693-1724.
16. M u r e ş a n, E., G a b o r e a n u, M., B o g d a n, A. T., B a b a, A. I., *Tehnici de histologie normală şi patologică,* Ed. Ceres, Bucureşti, 1974.
17. N a k a t s u g i, S., T e r a d a, N., Y o s h i m u r a, T., H o r i e, Y., F u r u k a w a, M., *Effects of nimesulide, a preferential cyclooxygenase-2 inhibitor, on carrageenan-induced pleurisy and stress-induced gastric lesions in rats,* "J. Pharmacokinet. Biopharmacol.", **55**, 1996, 395-402.
18. N i e l s e n, D., *A study of naproxen and nurofen in patients with osteoarthritis seen in general practice,* "Curr. Med. Res.", **9**, 1984, 41-46.
19. P l o a i e, P. G., P e t r e, Z., *Introducere în microscopia electronică cu aplicații în biologia celulară şi moleculară,* Ed. Acad. Rom., Bucureşti, 1979.
20. P o h j o l a i e n, T., J e k u n e n, A., L a u t i o, L., V u o r e l a, H., *Treatment of acute low back pain with the COX-2-selective anti-inflammatory drug nimesulide: results of a randomized, double-blind comparative trial versus ibuprofen (nurofen),* "Spine", **25**, 2000, 1579-1585.
21. R a i n s f o r d, K. D., *Profile and mechanisms of gastrointestinal and other side effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs),* "Am. J. Med.", **107**, 1999, 27-36.
22. S a l c i d o, R., D o n o f r i o, J. C., F i s h e r, S. B., L e G r a n d, E. K., C a r n e y, J. M., S c h o s s e r, R., R o d g e r s, J., L i a n g, R., *Evaluation of ibuprofen for pressure ulcer prevention, application of a rat pressure ulcer model,* "Adv. Wound Care", **8**, 2001, 30-40.
23. Z u i n, M., P o d d a, M., S e l m i, C., G i o r g i n i, A., Z e r m i a n i, P., M a n d e l l i, G., S a c c h e t t a, A. C., C a n d i a n i, C., *Gastrointestinal tolerability of nurofen administered in two pharmaceutical formulations,* "Arzneimittelforschung", **50**, 2000, 837-842.

STUDIA UNIVERSITATIS BABEŞ-BOLYAI, BIOLOGIA, XLVIII, 2, 2003

ATENUAREA MODIFICĂRILOR GRAVIMETRICE INDUSE DE TRATAMENTUL CU FLUOCINOLON-ACETONID N PRIN ADMINISTRAREA DE PROPRANOLOL

ERIKA KIS* şi CONSTANTIN CRĂCIUN**

SUMMARY. – Attenuation of the Fluocinolone-acetonid N-Induced Gravimetric Disorders by Propranolol. Our results, in compliance with those from the literature, show that the epicutaneously absorbed dermocorticoids in rats cause a glucocorticoid excess, specific to the state of steroid-diabetes, manifested by hyperglycemia, hepatic and thymic glucose overproduction, elevated serum lipids. All these metabolic disorders are based on endocrine modifications due to the alteration of the functioning of hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. Some of these endocrino-metabolic disorders and HPA structural alterations, according to our recent observations, are reducible by *in vivo* β-adrenoreceptor blockage with Propranolol. Experimental data point to the fact that the action of dermocorticoids is facilitated by the presence of β-adrenoreceptors in epidermis, in keratocytes and Langerhans cells of its basic layer.

β-Adrenoreceptors stimulate the epicutaneous absorption of glucocorticoids as well as their accumulation in organism, which explains the appearance of systemic secondary side-effects. The alterations inferred by the epicutaneous absorption of dermocorticoids are more obvious in the young organism, due to the fact that the epidermis is thinner, thus facilitating the absorption of glucocorticoids. The epicutaneous treatment with Fluocinolone-acetonid N determines, under conditions of our experiments, thymolysis, adrenal and spleen atrophy, associated with a reduced growth rate of the individuals. When daily dermocorticosteroid treatment for three days was associated with Propranolol administration (50 μg s.c./100 g b.w/day) in rats, the above-mentioned alteration in gravimetric parameters were significantly attenuated, as compared to the corresponding dermocorticosteroid-treated group. It is concluded that β-adrenoreceptor stimulation significantly participates in glucocorticoid excess-induced metabolic and gravimetric alterations.

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

Atât rezultatele noastre anterioare [6], cât si cele din literatură [2, 4, 10-14] arată că dermocorticoidul Fluocinolon-acetonid N absorbit transcutan produce la şobolani un exces glucocorticoidic caracteristic stării de diabet steroidic, manifestat prin creşterea glicemiei, a lipemiei şi, respectiv, a colesterolemiei. Aceste modificări metabolice au la bază modificări endocrine accentuate, datorate alterării structurale şi funcționale a axului hipotalamo-hipofizo-corticosuprarenalian (HHC).

* *Universitatea "Babeş-Bolyai", Catedra de Zoologie, 3400 Cluj-Napoca, România. E-mail: ekis@hasdeu.ubbcluj.ro*

** *Universitatea "Babeş-Bolyai", Catedra de Fiziologie Animală, 3400 Cluj-Napoca, România. E-mail: ccraciun@hasdeu.ubbcluj.ro*

Excesul glucocorticoidic de origine exogenă, paralel cu modificările structurale şi metabolice, determină la animalele prepubere şi pubere modificări gravimetrice accentuate, manifestate prin scăderea ritmului de creştere şi dezvoltare al organismului. Scăderea ritmului de creştere are la bază intensificarea catabolismului proteic. Rezultatele noastre anterioare [7] demonstrează că excesul glucocorticoidic afectează grav structura şi ultra-structura celulelor somatotrope şi gonadotrope, celule cu rol deosebit de important în creşterea şi dezvoltarea organismului tânăr. Aceste observaţii, privind alterarea ultra-structurii celulelor hipofizare, sunt în concordanţă cu observaţiile lui O z a w a şi colab. [15] care arată că excesul glucocorticoidic, provocat de administrarea de glucocorticoizi, reduce semnificativ concentraţia sangvină a hormonilor adenohipofizari: somatotrop (STH) şi gonadotrop (GTP).

Pornind de la aceste date, precum şi de la rezultatele cercetărilor noastre recente [6, 8, 9], conform cărora asocierea tratamentului fluocinolonic cu propranolol reduce semnificativ modificările morfologice şi metabolice induse de excesul glucocorticoidic, în lucrarea de faţă ne-am propus investigarea efectului tratamentului cu propranolol asupra modificărilor gravimetrice, provocate de tratamentul fluocinolonic. În această lucrare am urmărit comparativ: greutatea relativă a timusului, suprarenalelor şi splinei, precum şi ritmul de creştere în greutate corporală a indivizilor. Am utilizat loturi de şobolani de vârste diferite în următoarele condiţii, normale şi de tratament: cu Fluocinolon-acetonid N şi cu Fluocinolon-acetonid N pe fondul blocării receptorilor β-adrenergici cu propranolol.

Material şi metode. Experienţele au fost efectuate pe şobolani Wistar prepuberi (30 de zile) şi puberi (60 de zile) care au fost trataţi timp de 3 zile consecutive cu unguentul Fluocinolon-acetonid N pe fondul blocării receptorilor β-adrenergici. Doza zilnică de 50 mg unguent/100 g g.c. a fost aplicată prin ungerea pielii in zona inguinală pe o suprafaţă de 1,5 cm^2. Blocarea receptorilor β-adrenergici s-a efectuat cu o soluţie farmaceutică de propranolol, administrată subcutan în doză zilnică de 50 μg/100 g g.c., concomitent cu tratamentul fluocinolonic.

Animalele de experienţă au fost repartizate în următoarele loturi:

lotul M_1–animale prepubere netratate-martor;

lotul M_2 –animale pubere netratate-martor;

lotul FC_1–animale prepubere tratate cu Fluocinolon-acetonid N;

lotul FC_2–animale pubere tratate cu Fluocinolon-acetonid N;

lotul PR+FC_1–animale prepubere tratate cu Fluocinolon-acetonid N pe fondul administrării de propranolol;

lotul PR+FC_2–animale pubere tratate cu Fluocinolon-acetonid N pe fondul administrării de propranolol.

Animalele au fost sacrificate la 24 ore de la sistarea tratamentului, odată cu martorii corespunzători, după o inaniţie de 16-18 ore.

De la fiecare animal s-au prelevat următoarele organe: timus, suprarenală şi splină – care au fost cântărite rapid cu o balanţă de torsiune. S-a determinat apoi greutatea relativă a timusului, suprarenalei şi splinei, care a fost exprimată în mg/100 g animal.

Dinamica ritmului de reştere în greutate corporală a indivizilor a fost evaluată procentual (în g%) pe baza modificării faţă de iniţial (prima zi de tratament) a greutăţii corporale înregistrate la 24 de ore după sistarea tratamentelor cu FC, respectiv cu PR+FC.

Rezultate şi discuţii. Dinamica greutăţii relative a suprarenalelor, timusului şi splinei (Tabel 1) demonstrează că excesul glucocorticoidic realizat prin absorbţia transcutană a Fluocinolon-acetonid N, la loturile de animale prepubere şi pubere determină scăderea semnificativă a greutăţii relative a organelor luate în studiu. La prepuberi greutatea relativă a timusului scade cu 64,4%, iar la puberi cu 47,31% faţă de martori.

Tabel 1

Greutatea relativă a timusului (GRT), suprarenalelor (GRSR) şi splinei (GRS) la şobolanii prepuberi şi puberi în condiţii normale şi de tratament

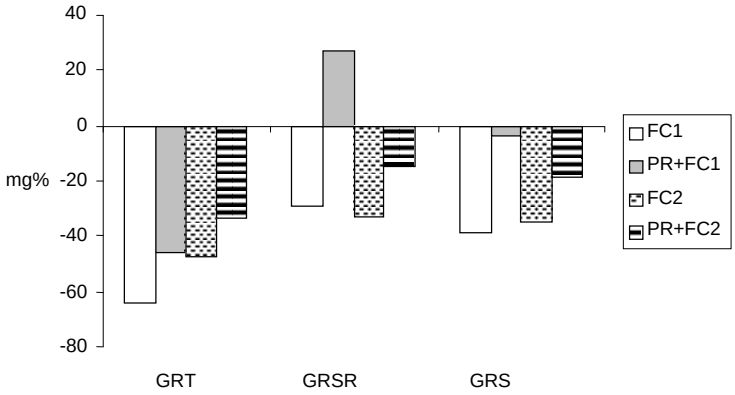
Loturi	GRT mg%	GRSR mg%	GRS mg%
M_1	346,05 ± 11,70	29,10 ± 1,09	459,1 ± 16,89
FC_1	123,17 ± 4,48	20,63 ± 1,04	280,78 ± 12,60
a	- 64,40%**	-29,11%**	-38,83%**
$PR+FC_1$	186,00 ± 9,86	36,87 ± 1,71	442,10 ± 14,73
a	- 46,24%**	26,70%*	-3,70%
b	51,88%**	78,72%**	57,46%**
M_2	186,09 ± 3,16	23,51 ±1,50	562,9 ± 28,02
FC_2	98,02 ± 5,40	15,75 ± 1,01	366,8 ± 36,63
a	-47,31%**	-33,01%**	-34,84%**
$PR+FC_2$	124,69 ± 3,99	19,94 ± 0,32	458,4 ± 35,15
a	-33,31%**	-15,18%*	-18,58%*
c	27,21%* *	26,60%*	24,95%

a–Valori raportate la loturile martor.
b–Modificări ale lotului PR+ FC_1 raportate la lotul FC_1.
c–Modificări ale lotului PR+ FC_2 raportate la lotul FC_2.
* Valori semnificative (P<0,05).
** Valori foarte semnificative (P<0,001).

Din aceste rezultate reiese că scăderea marcantă a greutăţii relative a timusului la şobolanii prepuberi şi puberi demonstrează potenţa timolitică ridicată a acestui dermo-corticoid, indicând, în acelaşi timp, scăderea capacităţii imunologice a organismului tânăr, timusul fiind organizatorul multor reacţii imune specifice şi nespecifice. Rezultatele noastre în consens cu cele din literatură [1, 2, 4, 5,10-13] arată că timusul este un organ ţintă al excesului glucocorticoidic endogen şi exogen. Atrofia timică în condiţiile experimentului nostru poate fi considerată un indiciu al excesului glucocorticoidic. Rezultatele cercetărilor experimentale arată că atrofierea timusului este asociată cu scăderea numărului de timocite atât la prepuberi, cât şi la puberi [1, 2, 4, 5]. Observaţiile structurale şi ultrastructurale la nivelul timusului relevă că marea majoritate a timocitelor prezintă citoplasmă hipertrofiată asociată cu rarefierea ribozomilor. Un număr mare de timocite suferă o vacuolizare intensă. Paralel cu aceste fenomene de degenerescenţă se observă apariţia macrofagelor, precum şi o acumulare a lipidelor în timocitele existente.

Asocierea tratamentului fluocinolonic cu propranolol reduce semnificativ efectul timolitic al unguentului, la prepuberi cu 51,88% şi la puberi cu 27,21% (Fig. 1).

Atrofierea suprarenalei la prepuberi este în proporţie de 29,11%, iar la puberi de 33% faţă de martori. De asemenea, am înregistrat o scădere semnificativă a greutăţii splinei atât la prepuberi, cât şi la puberi, astfel în primul caz se observă o reducere de 38,83%, iar în al doilea caz de 34,84%.



F i g. 1. *Histograma variaţiei procentuale a greutăţii relative a timusului, suprarenalelor şi splinei în condiţii normale şi de tratament.*

Scăderea dependentă de vârstă a greutăţii relative a suprarenalelor este în conformitate cu rezultatele noastre anterioare [3], care arată că excesul glucocorticoidic determină reducerea volumului zonei fasciculate a corticosuprarenalei, ceea ce evidenţiază de asemenea prezenţa unui exces glucocorticoidic de origine exogenă, care direct sau indirect inhibă biosinteza corticosteronului, blocând simultan secreţia de STH şi a hormonului hipotalamic de eliberare a somatotropului. În acest context este de menţionat că insulina şi STH acţionează anabolizant asupra biosintezei de proteine, iar excesul glucocorticoidic prin efecte directe şi indirecte antiinsulinice şi antisomatotrope mobilizează proteinele celulare stimulând gluconeogeneza hepatică pe seama aminoacizilor gluco-formatori. Aceste aspecte sunt în deplină concordanţă cu observaţiile noastre referitoare la întârzierea procesului de creştere a şobolanilor prepuberi şi puberi, precum şi cu structura profund alterată a celulelor STH, GTH, evidenţiată prin studii ultrastructurale [7].

Efectul atrofiant al excesului glucocorticoid asupra suprarenalei, în condiţiile experimentului nostru, este redus semnificativ de tratamentul concomitent cu propranolol, cu 78,72% la prepuberi şi cu 26,60% la puberi. Splenoreducţia indusă de Fluocinolon-acetonid N prin tratamentul cu propranolol se micşorează cu 57,46% la prepuberi şi cu 24,50% la puberi (Fig. 1).

Ritmul de creştere în greutate corporală a indivizilor (Tabel 2) arată că tratamentul cu Fluocinolon-acetonid N reduce substanţial sporul greutăţii corporale. În cazul animalelor martor de 30 de zile, sporul greutăţii corporale faţă de valoarea iniţială (prima zi de tratament) este de 11,27%; sub efectul tratamentului fluocinolonic valoarea acestui parametru se reduce cu 3,53% faţă de valoarea iniţială din prima zi de tratament.

Sub acţiunea propranololului greutatea corporală se reduce cu 2,51%. La lotul martor de 60 de zile, sporul greutăţii corporale a indivizilor faţă de valoarea iniţială din prima zi de tratament este de 0,90%. Sub efectul tratamentului valoarea acestuia scade semnificativ cu 14,56%, în timp ce sub efectul propranololului stagnează, fiind cu 5,03% sub nivelul înregistrat la începutul tratamentului.

Rezultatele noastre gravimetrice sunt în concordanţă cu rezultatele din literatură [1-5, 10-14] care demonstrează că excesul glucocorticoidic determinat fie de acţiunea factorilor de stres, fie de tratamentele cu glucocorticoizi sintetici provoacă atrofierea timusului, suprarenalelor şi, respectiv, a splinei.

Tabel 2

Dinamica greutății corporale în condiții normale şi de tratament

Loturi	Greutatea corporală (g) a indivizilor			
	a 1	2	3	4
M_1	57,1 ± 1,2	60,3 ± 1,4	63,8 ±1,6	63,6 ±1,6
b		5,58%	11,71%	11,27%**
FC_1	56,6 ± 1	57,1 ± 0,9	56,6 ± 1	54,6 ± 1,1
b		0,79%	0%	-3,53%
$PR+FC_1$	59,7 ±0,9	60,6 ± 0,9	60,9 ± 0,8	58,2 ± 0,9
b		1,45%	1,87%	-2,51%
M_2	181,7 ± 3,8	187,5 ± 3,9	188,6 ± 3,5	183,3 ± 3,9
b		3,17%	3,82%	0,90%
FC_2	148,3 ±4,5	145,1 ± 4,1	137,8 ± 4,1	126,7 ± 4,9
b		-2,15%	-7,09%	-14,56%*
$PR+FC_2$	190 ± 6,31	201,5 ± 6,5	195,7 ± 5,8	189,5 ± 5,8
b		-1,28%	-1,62%	-5,03%

a– Perioada de tratament.
b–Sporul greutății corporale față de prima zi de tratament.
* Valori semnificative (P<0,01).
** Valori foarte semnificative (P<0,001).

Scăderea greutății relative a suprarenalei şi timusului se poate explica şi prin faptul că glucocorticoizii, având acțiune catabolică puternică asupra proteinelor, determină accelerarea degradării lor în aminoacizi. Intensificarea activității enzimelor ASAT şi ALAT serice, dependentă de vârsta indivizilor, paralel cu exacerbarea activității hepatice a acestor enzime [6, 14] sub influența tratamentului fluocinolonic, demonstrează că excesul GC indus prin absorbția transcutană a dermocorticoidului Fluocinolon-acetonid N la nivelul ficatului, activează sinteza *de novo* a enzimelor participante la procesele de transaminare a aminoacizilor glucoformatori mobilizați din țesuturi şi de transformare a acestora în rezerve glucidice disponibile pentru producția hepatică de glucoză prin stimularea activității G-6-P-azei hepatice [14].

Concluzii. 1. Atrofierea organelor luate în studiu, precum şi scăderea ritmului de creştere a organismului animal sub acțiunea tratamentului cu Fluocinolon-acetonid N sugerează efectul antisomatotrop al excesului glucocorticoidic.

2. Propranololul reduce semnificativ efectul antisomatotrop al excesului glucocorticoidic.

3. În reducerea acțiunii adverse sistemice a dermocorticoidului Fluocinolon-acetonid N de către propranolol, vârsta şobolanilor joacă un rol condiționant major.

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

1. C r ă c i u n, C., A r d e l e a n, A., M a d a r, I., T a r b a, C., Ş i l d a n, N., C r ă c i u n, V., F ă r c a ş, T., *Ultrastructural studies of the secondary effects induced at the level of thymus by topic application of Fluocinolone-acetonid N in prepubertal rats*, în C r ă c i u n, C., A r d e l e a n, A. (Eds.), *Current Problems and Technique in Cellular and Molecular Biology*, p.176-186, Mirton, Timişoara, 1997.

2. C r ă c i u n, C., F r ă ţ i l ă, S., A r d e l e a n, A., M a d a r, I., C r ă c i u n, V., *Ultrastructural and biochemical studies concerning the action of some topical dermocorticoids on prepubertal rat thymus, before and simultaneously with the β-adrenoreceptors blocking*, în C r ă c i u n, C., A r d e l e a n, A. (Eds.), *Current Problems in Cellular and Molecular Biology*, p. 209-248, Risoprint, Cluj-Napoca, 1999.
3. C r ă c i u n, C., K i s, E., S a n d u, V.-D., Pa ş c a, C., P u i c ă, C., C r ă c i u n, V., M a d a r, I., *Comparative studies of the adrenal cortex structure and ultrastructure in mature rats treated with topical dermocorticosteroids*, "Stud. Univ. Babeş-Bolyai, Biol.", **46** (1), 2001, 91-98.
4. C r ă c i u n, C., M i c l ă u ş, V., C r ă c i u n, V., *Comparative study of thymus ultrastructure, thymolysis and blood-serum lipids in prepubertal rats, treated with topical corticosteroids*, în C r ă c i u n, C., A r d e l e a n, A. (Eds.), *Current Problems in Cellular and Molecular Biology*, p. 200-217, Risoprint, Cluj-Napoca, 1998.
5. F r ă ţ i l ă, S., M i c l ă u ş, V., C r ă c i u n, C., B e n e d e k, F., C r ă c i u n, V., C u p a r e n c u, B., *Histopatological and ultrastructural changes of the rat thymus induced by short treatment with topical glucocorticoids*, în C r ă c i u n, C., A r d e l e a n, A. (Eds.), *Current Problems in Cellular and Molecular Biology*, p. 243-253, Risoprint, Cluj-Napoca, 1998.
6. K i s, E., C r ă c i u n, C., *Atenuarea modificărilor structurale şi metabolice induse de excesul glucocorticoidic prin administrarea de propranolol*, "Stud. Univ. Babeş-Bolyai, Biol.", **48** (1), 2003, 67-79.
7. K i s, E., C r ă c i u n, C., P a ş c a, C., S a n d u, V.-D., C r ă c i u n, V., M a d a r, I., *Comparative studies of the ultrastructure of somatotrope, gonadotrope and corticotrope cells in mature rats treated with topical dermocorticosteroids*, "Stud. Univ. Babeş-Bolyai, Biol.", **46** (1), 2001, 99-109.
8. K i s, E., P u i c ă, C., P a ş c a, C., S a n d u, V.-D., M a d a r, I., *Attenuation of the Fluocinolone-acetonid N induced histological alteration of hypothalamic-pituitary-adrenal axis by Propranolol in white Wistar rats*, "Stud. Univ. Babeş-Bolyai, Biol.", **44** (1-2), 1999, 127-134.
9. K i s, E., S a n d u, V.-D., P a ş c a, C., C r ă c i u n, C., *Efectul antiglucocorticoid al Propranololului*, "Stud. Univ. Babeş-Bolyai, Biol.", **46** (2), 2001, 83-97.
10. M a d a r, I., G i u r g e a, R., B o r d a, D., R a m o n a, I., B o r ş a, M., *Comparative data on the "in vivo" effects of Hydrocortison-17-butyrate and Clobetasol-propionate upon the thymus in prepubertal young rats*, în C r ă c i u n, C., A r d e l e a n, A. (Eds.), *Current Problems in Cellular and Molecular Biology*, p.221-225, Risoprint, Cluj-Napoca, 1997.
11. M a d a r, I., G i u r g e a, R., R a m o n a, I., B o r d a, D., *Age-related role of beta-adrenoreceptor activity during Clobetasol-induced thymolysis in male young rats*, în C r ă c i u n, C., A r d e l e a n, A. (Eds.), *Current Problems in Cellular and Molecular Biology*, p. 254-262, Risoprint, Cluj-Napoca, 1998.
12. M a d a r, I., R u s u, V. M., Ş i l d a n, N., I l o n c a, A., *Attenuation of the stress-induced hyperglycemia, thymolysis, adrenal hypertrophy and liver adenylate-cyclase activity by Propranolol in immature and mature young rats*, "Rev. Roum. Biol., Biol. Anim.", **34** (1), 1989, 15-19.
13. M a d a r, I., Ş i l d a n, N., I l y é s, I., C r ă c i u n, C., F r ă ţ i l ă, S., G ă v a n, N., C r ă c i u n, A. R., *Age-related thymolytic and hyperglycemic effects of some percutaneously absorbed topical corticosteroids in rats*, în C r ă c i u n, C., A r d e l e a n, A. (Eds.), *Current Problems and Technique in Cellular and Molecular Biology*, p.305-310, Mirton, Timişoara, 1996.
14. M a d a r, I., Ş i l d a n, N., M a g h i a r, F., C r ă c i u n, C., I l y é s, I., B o r ş a, M., F r e c u ş, G., C r ă c i u n, A. R., *Schimbări endocrino-metabolice induse de tratamentul topic cu Fluocinolon-acetonid N la diferite grupe de vârstă a şobolanilor tineri*, „Rev. Med. Orădeană", **2** (2), 1995, 165-170.
15. O z a w a, H., T a k a o, I., I k n o, O., M i t s u h i r o, K., *Cellular localization and distribution of glucocorticoid receptor immunoreactivity and the expression of glucocorticoid receptor messenger RNA in rat pituitary gland: A combined double immunohistochemistry study and in situ hybridization histochemical analysis*, "Cell Tissue Res.", **295** (2), 1999, 207-214.

STUDIA UNIVERSITATIS BABEŞ-BOLYAI, BIOLOGIA, XLVIII, 2, 2003

EFECTE STRUCTURALE ŞI ULTRASTRUCTURALE DETERMINATE DE VENINUL DE ALBINE ÎN MIOCARD

ADRIAN FLOREA*, CONSTANTIN PUICĂ**, MARIUS C. OPREA*[1], PANTE GHERGHEL*** şi CONSTANTIN CRĂCIUN***

SUMMARY. – Structural and Ultrastructural Effects Produced by the Honey Bee Venom in Myocardium. The honey bee (*Apis mellifera L.*) venom has been reported to cause very powerful effects on the heart muscle. Even when it is subcutaneously injected, the bee venom is able to cross (or to break) the vascular endothelium and to get, through the systemic circulation, in the heart. We investigated the histological and ultrastructural modifications induced in the rat myocardium after experimental administrations of the water-soluble fraction of the crystallised bee venom. The results indicate severe and dose-dependent alterations in the structure of the cardiac tissue, with oedema and haemorrhages and zonal necrosis. Alterations also occur in the fine ultrastructure of the blood vessels and, most importantly, of the myocardium cells. The nucleus, mitochondria and the sarcoplasmic reticulum strongly respond to the bee venom and important disturbances could also be noted in the pattern of sarcomeres.

Ţintele predilecte asupra cărora acţionează veninul de albine sunt pielea şi apoi aparatul cardiovascular, prin intermediul căruia ajunge la toate organele şi ţesuturile. În literatura de specialitate sunt descrise modificări importante, în special fiziologice, induse de veninul de albine la nivelul inimii, lipsind în mare măsură descrierea substratului structural al acestor efecte. Scopul studiului nostru a fost de a evidenţia unele corelări între aceste date şi eventuale alterări structurale şi ultrastructurale produse de administrarea veninului de albine în diferite condiţii experimentale.

Materiale şi metode. *Animale.* Experimentele s-au realizat în mai multe etape pe loturi de *şobolani albi Wistar* (în total 36 animale), crescuţi în biobaza U.M.F. "Iuliu Haţieganu", Cluj-Napoca, respectiv în biobaza Facultăţii de Biologie, U.B.B., Cluj-Napoca, fără restricţii în ce priveşte hrana sau apa.

*****Universitatea de Medicină şi Farmacie "Iuliu Haţieganu", Facultatea de Medicină, Catedra de Biologie Celulară şi Moleculară, 3400 Cluj-Napoca, România. E-mail: aflorea@personal.ro*

[1]Universitatea de Medicină şi Farmacie "Iuliu Haţieganu", Facultatea de Medicină, student an VI, 3400 Cluj-Napoca, România*

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

*******Universitatea "Babeş-Bolyai", Facultatea de Biologie şi Geologie, Catedra de Fiziologie Animală, 3400 Cluj-Napoca, România*

Veninul de albine. Am utilizat venin de albine pur cristalizat, recoltat de noi prin metoda stimulării abinelor cu impulsuri electrice [14, 27]. În vederea injectării veninul a fost resuspendat într-o soluție izotonă (150 mM NaCl, 5,5 mM glucoză, 5 mM HEPES, la pH 7,4) şi păstrat la frigider, ferit de acțiunea luminii. În cazul tratamentului subcronic soluția injectabilă s-a preparat în câte 3 etape, de fiecare dată doar pentru câte 10 zile, pentru a preveni eventuala alterare a veninului.

Tratament. Animalelor li s-a injectat dorso-lateral posterior, subcutan veninul de albine în diluții diferite. Două loturi de şobolani – TS1 şi TS2 (6, respectiv 12 animale), au fost tratate subcronic, timp de 30 de zile cu o doză zilnică, echivalentă unei înțepături de albină, comparabilă cu doza terapeutică pentru om (400 μg/kg corp/zi). La sfârşitul perioadei de tratament s-au recoltat organele şi s-a realizat prelucrarea lor corespunzător tehnicilor histologice (pentru primul lot) şi pentru microscopia electronică de transmisie (animalele din celălalt lot). Animalele din alte două loturi – TL1 şi TL2 (câte 3 animale fiecare), au fost injectate cu o doză mare de venin de albine (DL_{50} – letală pentru 50% din subiecți), echivalentă cu cantitatea eliberată la un număr de 100 înțepături de albine (62 mg/kg corp), probele de țesut recoltate fiind prelucrate atât pentru realizarea de preparate histologice cât şi pentru microscopie electronică. Doza letală a fost stabilită în jurul valorii de 60 mg venin/kg corp pe baza datelor din literatură [17, 18]. Pentru evidențierea eventualelor efecte, în paralel s-au recoltat şi prelucrat probele hepatice de la loturi martor (MS1, MS2, ML1, ML2 – câte 3 şobolani), corespunzător fiecărui lot de animale tratate.

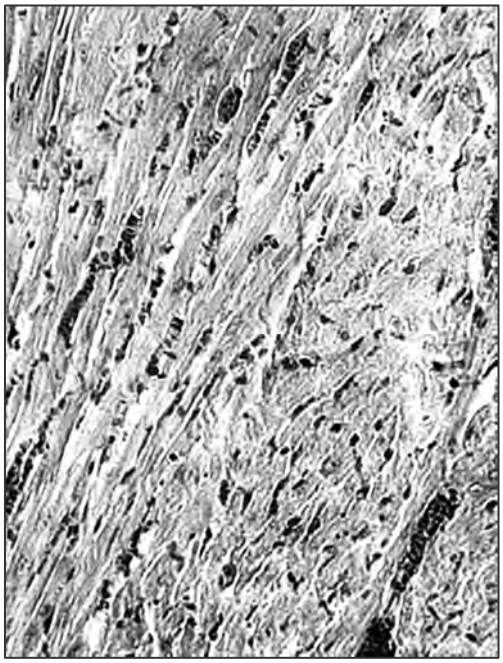
Histologie. Pentru realizarea preparatelor histologice, probele hepatice recoltate au fost fixate în fixator Bouin, deshidratate, incluse în parafină şi apoi secționate la microtom. După etalarea pe lame şi deparafinare, colorarea s-a făcut prin metoda Hurduc (pe bază de orange G, albastru de metil, xilidină şi acid acetic glacial) [19]. Examinarea s-a realizat la un microscop Olympus BX51.

Microscopie electronică de transmisie. Probele hepatice recoltate în vederea studierii la microscopul electronic de transmisie au fost prefixate în soluție de glutaraldehidă 2,7%, postfixate în acid osmic 2%, spălate şi deshidratate în acetonă, apoi incluse în Epon 812 şi secționate la un ultramicrotom LKB-III. Secțiunile preluate pe grile electrolitice au fost contrastate cu acetat de uranil şi apoi cu citrat de plumb [26]. Examinarea s-a realizat la un microscop electronic de transmisie Jeol JEM 1010.

Rezultate. Examinarea microscopică şi electronomicroscopică a miocardului la loturile martor a relevat structura normală a țesutului contractil, dar şi a endoteliului capilar ce delimitează vasele sanguine mici [4, 6, 28, 29, 33].

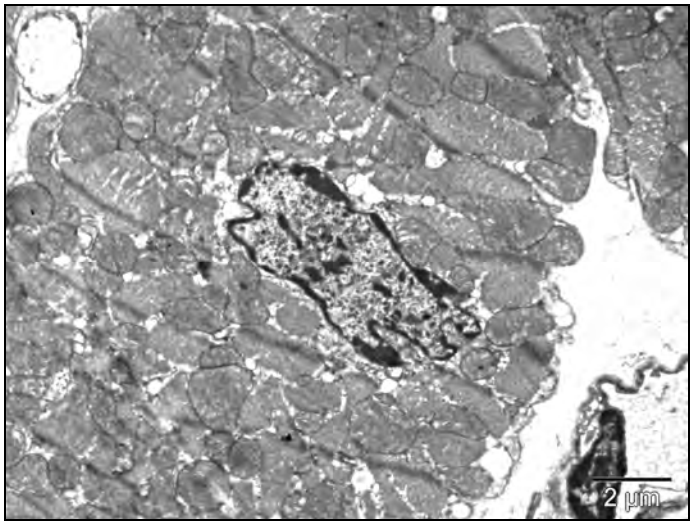
Administrarea subcronică a veninului de albine la *lotul TS1* a determinat modificări structurale manifestate prin zone de tumefiere şi degenerare a fibrelor musculare, cu pierderea în parte a striațiilor, ceea ce a dus la un aspect de omogenizare a structurilor (Fig. 1). Se mai remarcă un fenomen de degenerescență granulară, toate acestea fiind asociate cu fragmentări zonale ale fibrelor muşchiului cardiac. Interstițiul este sediul unui edem cu proliferare fibroblastică. Are loc şi o dilatare a capilarelor, fiind evidențiate infiltrate cu elemente sanguine.

Examinarea secțiunilor ultrafine arată la *lotul TS2* apariția de modificări importante ale celulelor miocardului, a căror intensitate maximă este observată în special în apropierea zonei vasculare. În majoritatea celulelor se observă o dilatare pronunțată a reticulului endoplasmic neted şi rarefierea matricei mitocondriale. Nucleii apar având contur puternic neregulat, cu o cantitate uşor crescută de heterocromatină (Fig. 2).

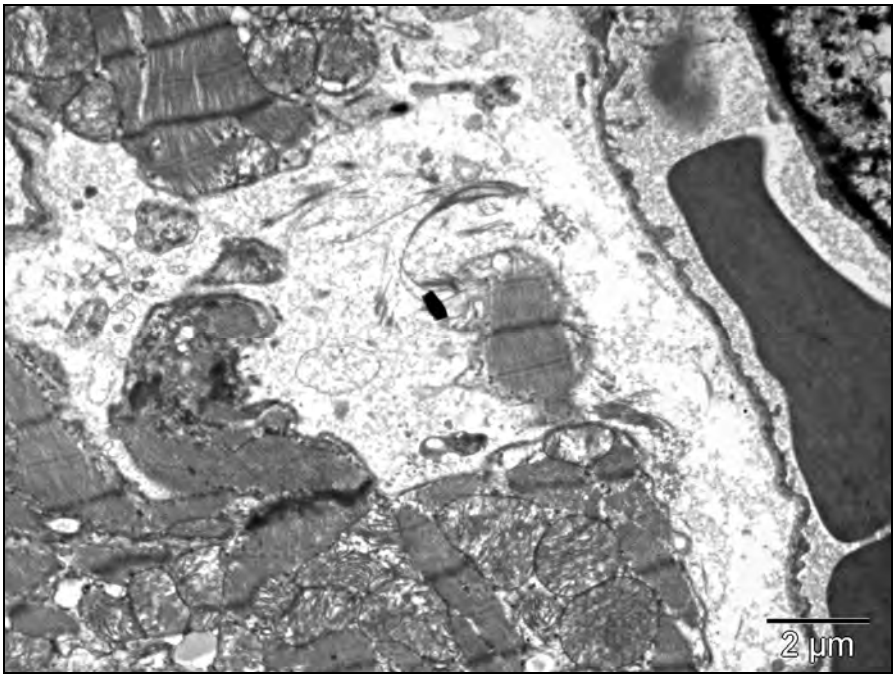


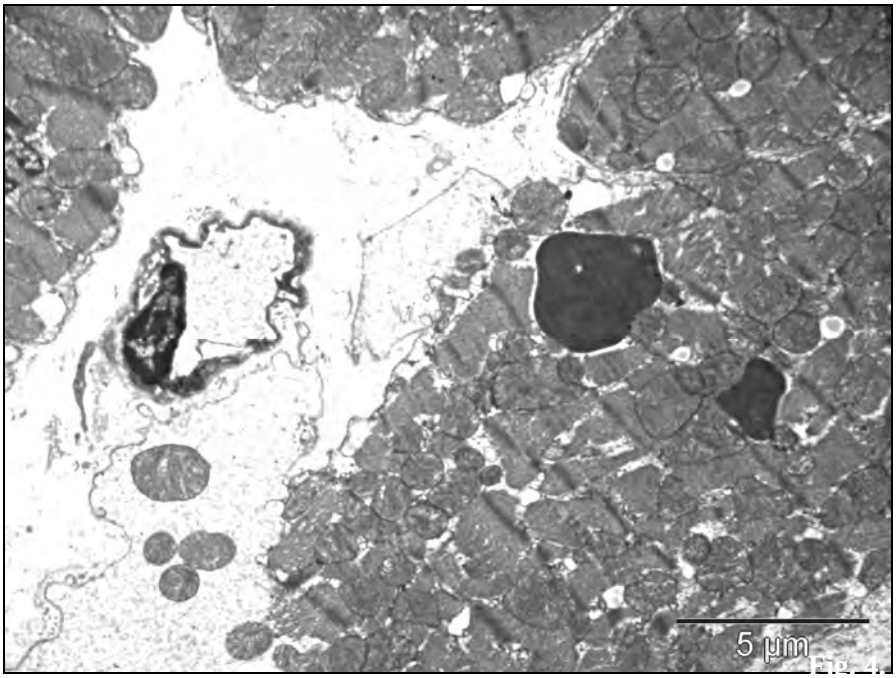
F i g. 1. *Miocard – lotul TS1* (ob. 20×).

În unele situații este evidentă şi o tendință de pierdere a coeziunii între miofibrile, care culminează, în anumite zone, cu dezorganizarea completă a acestor structuri (Fig. 3). Consecința o constituie, desigur, alterarea funcționării miocardului, cu afectarea ritmului cardiac. Capilarele sanguine suferă şi ele modificări importante, care merg de la subțierea endoteliului şi alterarea transportului de vezicule prin acesta (Fig. 2), până la distrugerea zonală sau totală a endoteliului, asociată cu extravazarea hematiilor (Fig. 4), respectiv cu afectarea sarcolemei şi a structurilor miofibrilare din imediata apropiere. Un aspect frecvent întâlnit îl reprezintă disocierea mitocondriilor, cu dispersarea lor în zonele de balonizare a sarcolemei (Fig. 4) sau chiar în spațiul intercelular, în urma distrugerii complete a unor celule musculare.



F i g. 2. *Miocard – lotul TS2*.



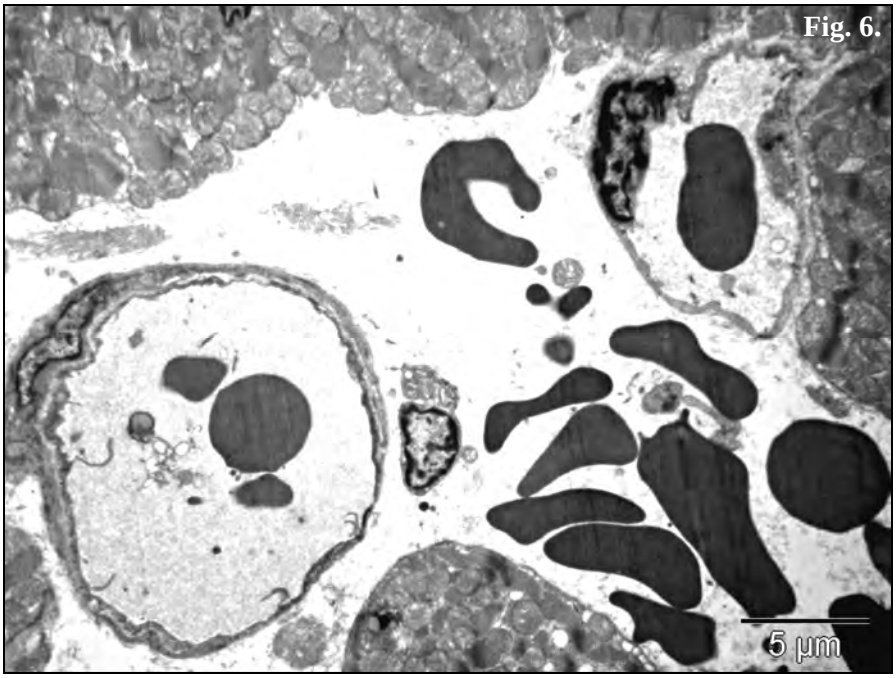


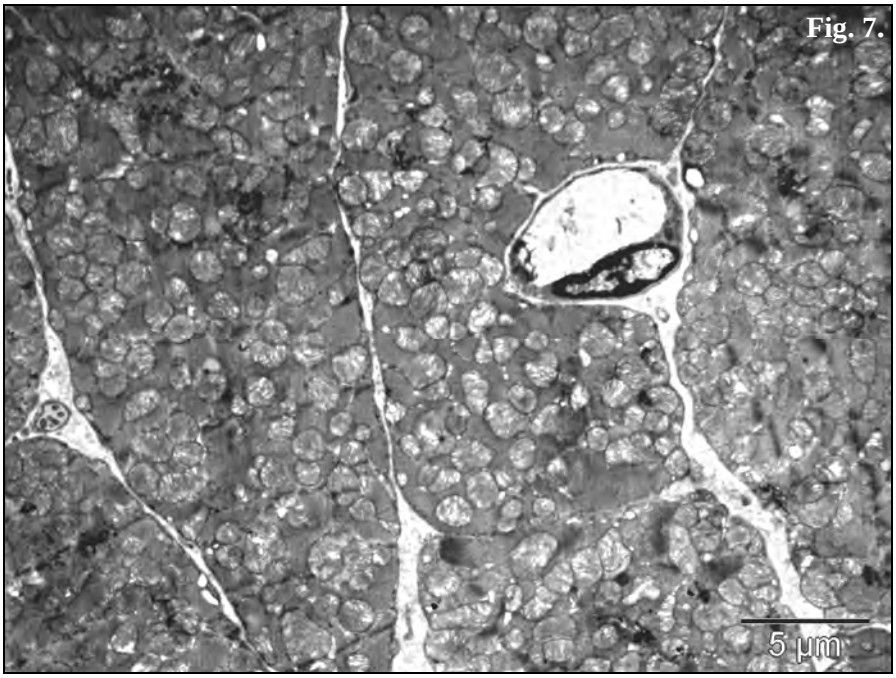
F i g. 3-4. *Miocard – lotul TS2*.

F i g. 5. *Miocard – lotul TL1* (ob. 20×).

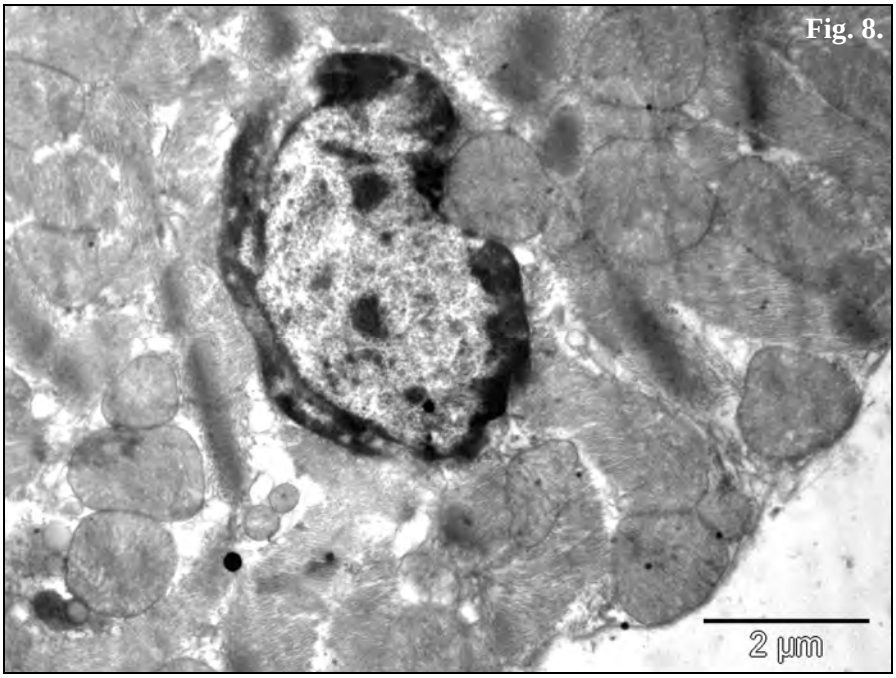
La *lotul TL1* modificările morfostructurale ale țesutului muscular cardiac se caracterizează, în special, prin dilatări pronunțate ale vaselor de sânge (Fig. 5). Degenerarea fibrelor musculare se accentuează comparativ cu cea evidențiată la lotul TS1, fiind însoțită de dispariția aproape totală a aspectului striat caracteristic.

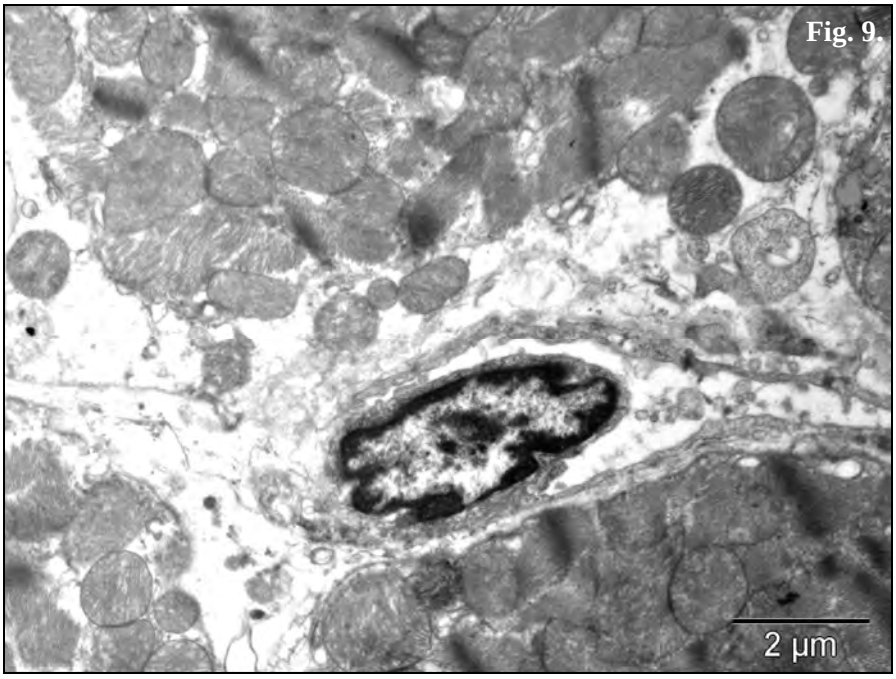
La examinarea *secțiunilor ultrafine* efectuate prin probele de miocard recoltate de la *lotul TL2* se observă că, pe lângă dilatările vaselor de sânge, apar congestii datorate leziunilor unor capilare, fapt ce are drept consecință şi acumularea masivă de elemente figurate ale sângelui în zonele interstițiale – edem perivascular (Fig. 6). Imaginile de ansamblu ale celulelor musculare cardiace (Fig. 7) arată un aspect particular al miofibrilelor, caracterizat prin dispariția, aproape în întregime a striațiilor sarcomerice. Totodată şi mitocondriille sunt modificate sub acțiunea dozei mari de venin de albine, prezentând forme sferice sau apropiate şi matricea puternic rarefiată (Fig. 6). Pe alocuri membranele unor mitocondrii apar distruse, iar structura crestelor, profund alterată. La puteri de mărire superioare se poate observa alterarea structurii sarcomerelor (Fig. 8, 9), cu distrugerea în multe regiuni a filamentelor de miozină şi actină. Aceste aspecte nu sunt însă caracteristice întregului țesut, putând fi observate regiuni în care miofibrilele apar normale. Lumenul reticulului endoplasmic neted apare şi în aceste condiții experimentale puternic dilatat. În multe cazuri se poate observa structura aparent neafectată a discului intercalar, prezentând doar o uşoară creştare a spațiului intermembranar, ceea ce înseamnă că dispariția aspectului striat se datorează în parte dezorganizării sarcomerelor, dar este posibil ca o altă cauză complementară să fie reprezentată de hipercontracția indusă de venin, în special de fosfolipaza A_2 şi melitină [21]. Dozele mari de venin de albine au produs modificări semnificative şi la nivelul endoteliului capilarelor, care constau în reducerea în grosime a acestuia, anularea în unele vase a transportului de vezicule prin transcitoză, sau distrugerea în întregime a structurii peretelui endotelial, cu eliberarea de detritusuri celulare în lumen şi extravazarea elementelor figurate. Există şi situații (Fig. 9) în care distrugerea





F i g. 6-7. *Miocard – lotul TL2*.





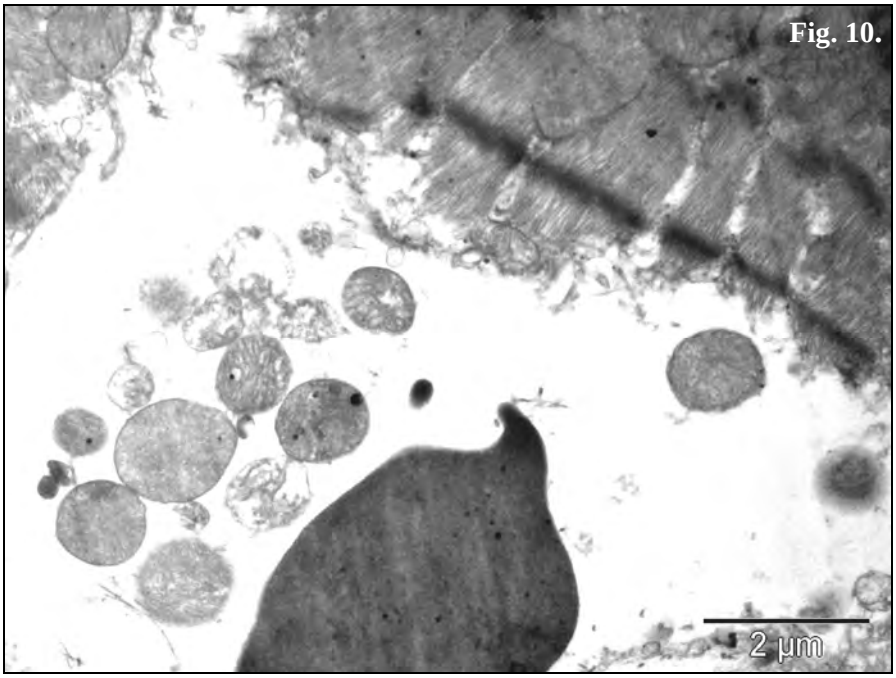
F i g. 8-9. *Miocard – lotul TL2*.

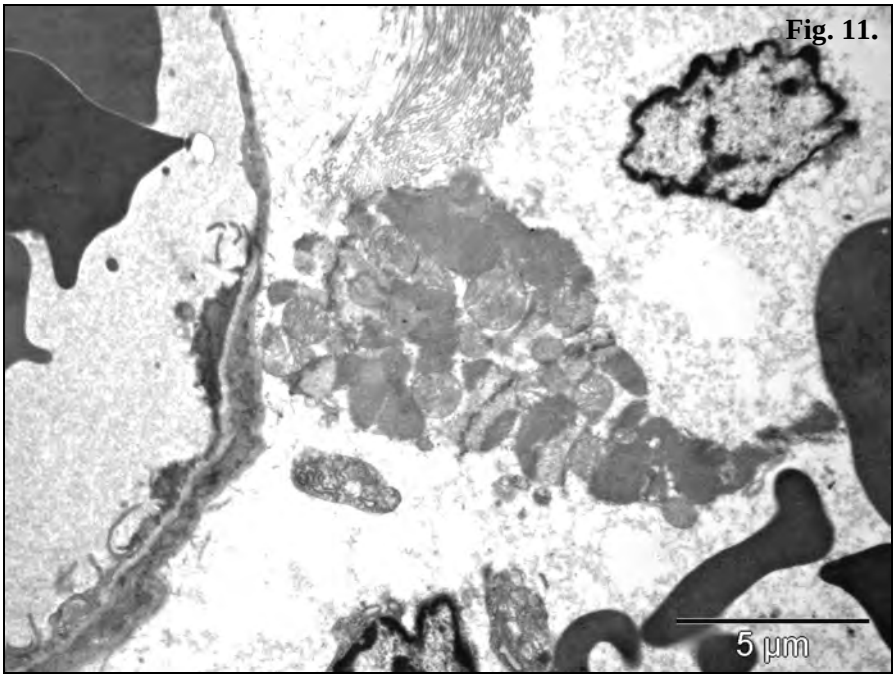
membranei celulelor endoteliale este urmată de eliberarea veziculelor surprinse în citoplasmă (în momentul acțiunii veninului) în spațiul intercelular, sau chiar în lumenul capilar. În regiunile miocardului în care aceste capilare sunt profund afectate, se constată şi alterări importante ale celulelor contractile. Astfel, plasmalema acestora apare fragmentată, iar matricea sarcoplasmatică din imediata vecinătate, mult rarefiată; mitocondriile se desprind de miofibrile şi pot ajunge chiar în spațiul intercelular, iar în cazurile în care întreaga celulă este distrusă (Fig. 6, 10, 11), pot fi observați chiar şi nucleii eliberați printre hematiile din acest spațiu intercelular.

Discuții. În urma injectării veninului, acesta ajunge în sânge difuzând prin țesut (activitate promovată de hialuronidaza conținută), trecând rapid în capilarele fine ale hipodermului şi ale structurilor subiacente. Administrat subcronic, în doze zilnice, aproximativ în aceeaşi regiune, sau în doza letală, veninul de albine produce unele modificări la nivelul capilarelor din zona de injectare, concretizate prin creşterea permeabilității lor pentru venin [2] şi, astfel, cantități importante din acesta ajung apoi în venule şi venele mari. După ce intră în inimă, are capacitatea de a ajunge, prin fluxul sanguin, la toate celelalte organe şi țesuturi, unde va produce diverse manifestări.

În mod evident, administrarea experimentală a veninului de albine la şobolanii de laborator a fost urmată de efecte morfologice structurale şi ultrastructurale semnificative la nivelul miocardului. În situațiile experimentale descrise de noi, efectul veninului nu a fost exercitat însă în mod direct, pentru a ajunge în miocard atacând endocardul, ci acesta s-a manifestat doar ca urmare a lezării capilarelor miocardice, unde concentrația veninului este totuşi mult scăzută. Oricum, nu putem exclude ipoteza (neconfirmată experimental în cazul de față) că veninul a reuşit totuşi să străbată în unele zone endocardul şi să se infiltreze pe calea spațiilor intercelulare până în profunzimea miocardului. Această ipoteză este bazată pe rezultatele examinării efectelor veninului de albine la nivelul aortei (date în curs de publicare), putându-se considera că veninul de albine poate acționa similar şi la nivelul inimii.

La administrarea subcronică apar modificări generalizate în miocard, fapt ce sugerează că repetarea administrării dozelor relativ mari, pentru o perioadă mai lungă de timp, fără pauze, depăşeşte capacitatea de apărare a organismului. Modificările instalate ca urmare a acțiunii veninului privesc ansamblul țesutului – dovedind infiltrarea treptată a componentelor veninului, de la endoteliul capilarelor a cărui barieră este depăşită, prin lichidul interstițial, până la nivelul celulelor. Poate fi luat în considerare şi un efect de avalanşă, caracteristic proceselor de necroză tisulară, în care activitatea toxică, directă a hialuronidazei, fosfolipazei A_2 sau a melitinei, este însoțită de acțiunea enzimelor eliberate din lizosomii celulelor a căror integritate a fost compromisă. Efectele fiziologice raportate în urma administrării dozelor mari de venin se datorează în parte şi perturbării funcționării normale a mitocondriilor. Astfel, în experimentul nostru, unul dintre efectele importante ale veninului se manifestă la nivelul membranelor mitocondriale. Sub acțiunea componentelor veninului, membranele





F i g. 10-11. *Miocard – lotul TL2*.

mitocondriale îşi pierd capacitatea de barieră şi, respectiv, de transport selectiv al substanţelor, intrând astfel o cantitate mare de apă în matricea acestor organite [5, 34]. Rezultatul îl constiuie umflarea matricei şi, în unele situaţii, ruperea membranelor mitocondriale. Constatarea, în condiţiile noastre experimentale, a unor niveluri serice crescute ale ASAT [11] reprezintă confirmarea biochimică a acestor leziuni. La efectul direct al veninului se mai poate adăuga şi efectul unei uşoare hipoxii [15] înregistrată în urma scăderii numărului de hematii şi a cantităţii de hemoglobină [11], dar şi acela al activităţii enzimelor lizosomale eliberate. Acest fenomen descris la nivelul mitocondriilor nu este particular, specific numai pentru miocard, ci a fost întâlnit şi la alte ţesuturi studiate de noi [9, 10], principala consecinţă constituind-o alterarea sintezei de ATP, cu toate implicaţiile ce decurg din aceasta şi în special disfuncţii ale Na^+-K^+ATP-azei (care conduc la acumularea de apă în celule). Fără a cunoaşte mecanismul molecular implicat, Virchow a descris pentru prima dată acest fenomen, ca răspuns al celulelor la stresul toxic; ulterior au fost raportate situaţii similare – inclusiv umflarea/vezicularea mitocondriilor în diverse situaţii patologice [15] sau, mai recent, la administrarea experimentală a unor medicamente [24, 25].

Tratamentul subcronic cu venin de albine a afectat în mare măsură morfologia şi funcţiile inimii, ca urmare a perturbării structurale a miofibrilelor cardice, dar şi a leziunilor grave suferite de multe dintre celulele contractile. Un rol cheie în dezvoltarea acestor efecte îl deţine endoteliul capilarelor, care în multe cazuri nu a rezistat acţiunii veninului, apărând distrus, alterându-se astfel schimburile normale dintre celulele musculare şi sânge. Chiar şi acolo unde endoteliul apare încă intact, totuşi el este mult redus ca dimensiuni, iar transportul de vezicule prin transcitoză este compromis. Şi dilatările pronunţate ale capilarelor (în special în cazul administrării dozei letale), asociate cu fenomenele de extravazare, pot fi implicate în aprovizionarea deficitară a ţesuturilor, unul dintre rezultate fiind în final reducerea metabolismului energetic pe ansamblul organismului, ceea ce este ilustrat şi de evoluţia descrescătoare a masei animalelor în timpul tratamentului subcronic (date în curs de publicare).

Dozele foarte mari de venin de albine, administrate în cealaltă variantă experimentală descrisă, manifestă în principal un efect citolitic la nivelul miocardului, veninul ajungând în cantităţi mari în proximitatea celulelor contractile ca urmare a dilatărilor de amploare ale capilarelor, proces însoţit de diminuarea fluxului sanguin, respectiv de stagnarea sângelui în aceste zone. Importante sunt, mai ales, efectele distructive exercitate asupra ultrastructurii sarcomerice, implicate direct în disfuncţionalităţile cardiace, care, împreună cu modificările produse în alte organe vitale [8-10, 13], pot duce la moartea organismului. Efecte citolitice similare, manifestate prin apariţia de focare de necroză subendocardială, au fost descrise şi în urma unor observaţii clinice de către França *et al.* [13], în special în apexul cardiac, fiind totodată asociate cu infiltrări de neutrofile. Şi Ownby *et al.* [21] descriu unele modificări similare produse în urma injectării veninului intramuscular, în muşchii scheletici la animale de laborator. Determinările histoenzimatice demonstrează inactivarea enzimelor respiratorii, precum şi hiperactivitatea monoamin-oxidazei în zonele perilezionale şi a fosfatazei acide din leucocite [3, 7].

Devierile traseelor eclectrocardiogramelor în diferite condiții experimentale, raportate de numeroşi autori [1, 2, 7, 8, 17, 20], au deci un substrat structural important în leziunile induse de venin la nivel celular şi subcelular. Pe de altă parte, este însă posibil ca veninul de albine să exercite influențe asupra activității cardiace şi prin intermediul centrilor automatismului cardiac [16]. Important de menționat este şi faptul că dacă veninul este administrat intern, activitatea inimii este puternic disturbată, spre deosebire de cazul administrării intradermice (cazul nostru), când modificările sunt totuşi de o amploare mai mică.

Deşi literatura de specialitate şi mai ales adepții metodelor naturiste în terapie recomandă utilizarea veninului de albine în numeroase situații [12, 22, 23, 30, 31, 32], aceasta trebuie făcută însă cu mare atenție şi numai sub stricta supraveghere a unui specialist. Repetarea timp îndelungat a unor doze relativ mari prezintă efecte adverse importante, producând modificări structurale la nivelul miocardului. Acestea vor conduce la disfuncționalități în activitatea cardiacă şi, implicit, în neasigurarea unui flux sanguin la parametri optimi, fenomen însoțit de modificări în irigarea cu sânge a întregului organism (ce presupune aprovizionarea, dar şi eliminarea produşilor de catabolism). Pe de altă parte, dozele foarte mari de venin care pot ajunge accidental în organism – în general în urma atacurilor de către un număr mare de albine sunt însă mult mai periculoase datorită leziunilor profunde pe care le pot produce. Modificările importante, dependente de doză, survenite la nivelul întregului sistem cardiovascular, inclusiv al sângelui [11] se vor reflecta şi ele, pe lângă acțiunea directă a veninului, în morfologia şi fiziologia celorlalte țesuturi, fiind, în unele situații, responsabile pentru colapsul organismului.

Concluzii. În urma analizei rezultatelor obținute, putem afirma că acțiunea veninului de albine influențează semnificativ structura şi ultrastructura miocardului, leziunile majore provocate de componentele acestuia la nivelul celulelor contractile reprezentând substratul material al disfuncționalităților cardiace. Ca şi în cazul altor țesuturi studiate de noi, consecutive administrării experimentale de venin de albine, efectele veninului la nivelul miocardului sunt direct dependente de doză.

Rezultatele prezentate de noi sunt în concordanță cu cele raportate de alți cercetători care au abordat studiul efectelor veninului de albine, prin alte metode sau tehnici de investigare [1, 2, 3, 16]. De asemenea, rezultatele noastre experimentale concordă cu cele raportate în cazul unor accidente soldate cu multiple înțepături de albine în urma cărora s-au efectuat variate investigații clinice, inclusiv examinarea unor preparate prin microscopie electronică de transmisie [13, 20, 21, 24, 25, 33].

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

1. Artemov, N. M., *Veninul de albine ca produs al apiculturii*, în *XX Congr. Apimond.*, p. 467, 1965.
2. Artemov, N. M., *Efectul veninului de albine asupra permeabilității capilarelor şi asupra cantității albuminelor din sânge*, în *XXII Congr. Apimond.*, p. 361-365, 1969.

3. Azevedo-Marques, M. M., Cupo, P., Hering, S. E., Costa, R., Ferreira, D. B., *Clinical-laboratory and therapeutic aspects of envenomation caused by africanized bees*, "J. Ven. Anim. Tox.", **5** (2), 2001, 154-171.
4. Bloom, W., Fawcett, D. W., *A Textbook of Histology*. 10th ed., Saunders, Philadelphia, 1975.
5. Diaz-Achirica, P., *Permeabilization of the mitochondrial inner membrane by short cecropin-A-melittin hybrid peptides*, "Eur. J. Biochem.", **224**, 1994, 257-263.
6. Eliséiev, V. G., Afanásiev, Y. A., Kotovski, E. F., *Atlas de la estructura microscópica y ultramicroscópica de las células, tejidos y órganos*, Ed. Mir, Moscú, 1987.
7. Ferreira, D. B., *Experimentally-induced cardiotoxicity by africanized honeybee venom in Wistar rats*, "J. Ven. Anim. Tox.", **1** (1), 1995, 40.
8. Florea, A., *Modificări fiziologice, morfologice şi ultrastructurale determinate la nivelul sistemului cardiovascular de veninul de albine în doze mari*, în "Zilele U.M.F. Iuliu Haţieganu", Cluj-Napoca, 1999, 151.
9. Florea, A., Crăciun, C., Puică, C., Gherghel, P., Oprea, M. C., *Hepatotoxicitatea veninului de albine. Studiu histologic şi ultrastructural*, "Stud. Univ. Babeş-Bolyai, Biol.", **48** (1), 2003, 49-66.
10. Florea, A., Puică, C., Crăciun, C., Gherghel, P., Oprea, M. C., *Modificări histologice şi ultrastructurale induse experimental la nivelul rinichiului prin administrarea veninului de albine în diferite doze*, "An. Soc. Naţ. Biol. Cel.", **7 (**1), 2002, 327-341.
11. Florea, A., Pure, D., Oprea, M. C., Gherghel, P., Crăciun, C., *Blood changes in experimental subchronic rat envenomation with honey bee (*Apis mellifera L.*) venom*, "Bull. Mol. Med.", **15-17**, 2003, 19-26.
12. Forster, K. A., *Chimie, pharmacologie et effet thérapeutique du venom d'abeille*, în *Al XXII-lea Congres al Apimondiei*, p.403, Apimondia, Bucureşti, 1969.
13. França, F. O. S., Benvenuti, L. A., Fan, H. W., Dos Santos, D. R., Hain, S. H., Picchi-Martins, F. R., Cardoso, J. L. C., Kamiguti, A. S., Theakston, R. D. G., Warrell, D. A., *Severe and fatal mass attacks by "killer" bees (Africanized honey bees –* Apis mellifera scutellata*) in Brazil: clinicopathological studies with measurement of serum venom concentration*, "Quart. J. Med.", **87,** 1994, 269-282.
14. Gelderblom, R., *Collecting bee venom – The other way*, "Hivelights", **13** (4), 1997, 12-13.
15. Ghadially, F. N., *Ultrastructural Pathology of the Cell. A Text and Atlas of Physiological and Pathological Alterations in Cell Fine Structure*, Butterworths, London, 1978.
16. Ghelasvili, D. B., Orlov, B. N., *Proprietăţile neurotrope ale veninului de albine şi ale fracţiilor sale*, II Int. Simp. Apither., p. 107-109, Ed. Apimondia, Bucureşti 1976.
17. Habermann, E., *Chimie, pharmacologie et toxicologie du venin*, în Chauvin, R. (Ed.), *Traité de biologie de l'abeille*, p.363-387, Masson, Paris, 1968.
18. Habermann, E., *Bee and wasp venoms. The biochemistry and pharmacology of their peptides and enzymes are reviewed*, "Science", **177**, 1972, 314-322.
19. Mureşan, E., Gaboreanu, M., Bogdan, A. T., Baba, A. I., *Tehnici de histologie normală şi patologică*, Ed. Ceres, Bucureşti, 1974.
20. Nabil, Z. I., Hussein, A. A., Zalat, S. M., Rahka, M. K., *Mechanism of action of honey bee* (Apis mellifera) *venom on different types of muscles*, "Hum. Exp. Toxicol.", **17** (3), 1998, 185-190.

21. Ownby, C. L., Powel, J. R., Jiang, M. S., Fletcher, J. E., *Melittin and phospholipase A2 from bee (*Apis mellifera*) venom cause necrosis of murine skeletal muscle in vivo*, "Toxicon", **35**, 1997, 67-80.
22. Partheniu, A., *Veninul de albine în tratamentul reumatismului, astmului bronşic, urticării şi altor boli. I*, "Apic. România", **3**, 1957, 26.
23. Partheniu, A., *Veninul de albine în tratamenul reumatismului, astmului bronşic, urticării şi altor boli. II*, "Apic. România", **3**, 1957, 27-32.
24. Paşca, C., Crăciun, C., Ardelean, A., *Efecte secundare ale unor citostatice asupra organismului*, Ed. Risoprint, Cluj-Napoca, 2000.
25. Paşca, C., Miclăuş, V., Crăciun, C., Kis, E., Sandu, V.-D., Papuc, I., Crăciun, V., *Histological and ultrastructural aspects of the myocardium of rats treated with an anthracycline antibiotic – Epirubicin*, "Stud. Univ. Babeş-Bolyai, Biol.", **46** (1), 2001, 111-117.
26. Ploaie, P. G., Petre, Z., *Introducere în microscopia electronică cu aplicații în biologia celulară şi moleculară*. Ed. Acad. Rom., Bucureşti, 1979.
27. Popescu, N., *Unele măsuri necesare pentru menținerea purității şi calității veninului de albine*. "Apic. România", **1**, 1990, 13-14.
28. Rîmniceanu, C., Miclea, C., Dincă, C., Drăgan, M., Litvac, E., Tudor, L., *Histologie*, Ed. Did. şi Pedag., Bucureşti, 1965.
29. Ross, M. H., Romrell, L. J., Kaye, G. I., *Histology – A Text and Atlas.*, Williams & Wilkins, Baltimore, 1995.
30. Rothfeld, G., *Bee venom therapy*. *htttp//:www.2shore.net/…/apitherapy.html*, 2001.
31. Rothfeld, G., *About bee venom therapy*. *htttp//:*www.naturodoc.com/library/bee_venom.html, 2002.
32. Schmidt, J. O., *Bee products: Chemical composition and application*, în Mizrahi, A., Lensky, Y. (Eds.), *Bee Products*, p. 15-26, Plenum Press, New York, 1996.
33. Stevens, A., Lowe, J. S., *Human Histology*, Ed. Mosby, Baltimore, 1997.
34. Valente, R. H., Novello, J.C., Marangoni, S., Oliveira, B., Pereira Da Silva, L., Macedo, D. V., *Mitochondrial swelling and oxygen consumption during respiratory state 4 induced by phospholipase A2 isoforms isolated from the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) venom*, "Toxicon", **36**, 1998, 901-913.

STUDIA UNIVERSITATIS BABEŞ-BOLYAI, BIOLOGIA, XLVIII, 2, 2003

REACŢII ALE ORGANISMULUI LA VENINUL DE ALBINE ŞI TOXICITATEA ACESTUIA

ADRIAN FLOREA* Şi CONSTANTIN CRĂCIUN**

SUMMARY. – Reactions of the Organism to the Honey Bee Venom and Its Toxicity. Despite the fact that it has been used from ancient times in the folk medicine and, in the last few decades, many important applications in the modern medicine were reported, the venom still remains, over millions of years, an efficient, basic and very potent defensive weapon of bees. In different organisms which come in contact – in different circumstances – with the bee venom, a series of modifications can occur. The magnitude of these modifications depends, of course, on the dose and the frequency of stings (or on the therapeutical/experimental administration). However, the reactions may range from the local, painful and irritating reactions, to systemic, severe toxic reactions. In special cases, when the immune system does not respond properly in the presence of the venom, the allergy or even the anaphylactic shock may evolve. Because of its importance, both as a medicine and basic research tool, the bee venom became recently a subject for extensive studies which include, among other topics, the determination of toxicity levels of the venom and also of each of its major constituents.

Veninul de albine este o eficientă armă, care serveşte la apărarea albinei, dar mai ales la protecţia familiei. Eficienţa sa rezultă din compoziţia complexă, dar mai ales din reacţiile pe care veninul le produce; deoarece provoacă durere şi iritaţie, scopul utilizării sale în natură este atins prin utilizarea unor cantităţi foarte mici. Există însă şi situaţii extreme, rare, în care veninul de albine poate ajunge în organismul omului sau animalelor în cantităţi apreciabile (de exemplu în cazul atacurilor efectuate de albine în număr foarte mare, sau în unele condiţii experimentale). O persoană care ajunge în contact cu veninul de albine poate dezvolta o reacţie considerată normală sau una anormală – alergia. Unii oameni – un mic procent – sunt total imuni la veninul de albine. În cazul celor afectaţi într-o măsură mai mare sau mai mică, manifestările observate sunt rezultatul acţiunii simultane şi complementare a tuturor componentelor veninului.

*****Universitatea de Medicină şi Farmacie "Iuliu Haţieganu", Facultatea de Medicină, Catedra de Biologie Celulară şi Moleculară, 3400 Cluj-Napoca, România. E-mail: aflorea@personal.ro*

******Universitatea "Babeş-Bolyai", Facultatea de Biologie şi Geologie, Catedra de Fiziologie Animală, 3400 Cluj-Napoca, România*

Reacția normală apare după un număr mic de înțepături şi este de obicei locală. Expresia dermatologică tipică a veninului de albine în urma înțepăturilor albinei variază în funcție de cantitatea de venin, calitatea veninului (dependentă de vârsta albinei, rasa şi resursele de hrană, mod de recoltare etc.), zona de înțepare şi, nu în ultimul rând, de sensibilitatea organismului. Înțepăturile albinelor sunt în general diagnosticate prin prezența acului detaşat care rămâne în rană până la îndepărtare.

Persoanele care nu sunt hipersensibile la veninul albinelor pot tolera de la una la 20-25 înțepături odată. Acestea sunt urmate de simptome locale minime, care apar la câteva secunde în urma pătrunderii veninului de albine în organism: apariția pe piele şi creşterea în diametru a unei pete albe (până la aproximativ 10 mm), având în centru un punct roşu. Se menține pentru circa 20 minute, pielea rămânând însă şi după aceea iritată. Mai apar edemul cu uşoara întărire a zonei şi pruritul. Aceste manifestări sunt inofensive, cu excepția situației în care umflăturile se produc în regiuni în care pot crea dificultăți mecanice [6, 44]. Simptomele, în special edemul, sunt mult mai pronunțate când înțepătura a fost în zona feței sau gâtului. Pe de altă parte, dacă veninul de albine este introdus în organism în apropierea unor nervi periferici, rezultă pierderea temporară a sensibilității [2, 30]. Înțepătura albinei este întotdeauna dureroasă, reprezentând de fapt un factor descurajant pentru prădători. Chiar dacă anumite persoane au dezvoltat o rezistență la veninul de albine, totuşi durerea înțepăturii este resimțită imediat. Durerea intensă, inițială, durează doar câteva zeci de secunde pentru ca să dispară treptat, transformându-se în senzație de căldură – apărută ca urmare a vasodilatației periferice – ce persistă circa o oră [16, 22], fiind înlocuită treptat de senzația de mâncărime. Probabil că în acest fel, prin stimularea reflexului de scărpinare este favorizată răspândirea veninului în organism. Dar în acelaşi timp, prin apariția de fisuri mai mari sau mai mici în epiderma zonelor sensibilizate, este favorizată intrarea bacteriilor în organism şi dezvoltarea ulterioară a infecțiilor. În caz că aceasta nu se întâmplă, majoritatea simptomelor dispar după o zi, umflătura retrăgându-se în întregime în câteva zile [24, 37, 38]. După modelul propus de Matzinger [27], aceste efecte sunt rezultatul răspunsului sistemului imunitar al organismului atacat, nu atât la veninul propriu-zis, cât mai ales la leziunile provocate de componentele acestuia. Determinările imunologice au evidențiat creşterea nivelului interleukinei 10 (IL-10), care are rol inhibitor al reacțiilor alergice – induce o scădere pe termen lung a răspunsului alergen-specific al limfocitelor T CD4+, determină scăderea numărului mastocitelor şi inhibă proliferarea eozinofilelor [20].

În unele cazuri s-au observat histologic zone de necroză circumscrise locului înțepăturii, datorate coagulării şi, implicit, sistării irigației cu sânge; de asemenea, pot apărea infiltrări granulocitare sau limfocitare [16].

Subiecții sensibilizați în urma unor înțepături anterioare pot prezenta reacții locale mai extinse, inclusiv umflături edematoase de 10-50 cm, hipersensibile, ce se formează la un interval de 4-12 ore după înțepare şi pot persista 3-4 zile. Multe victime consideră aceste simptome ca semne ale alergiei, dar trebuie ştiut că sunt doar reacții locale, tipice, de răspuns la acțiunea veninului de albine. Ocazional pot apărea însă reacții similare extinse şi în alte zone neadiacente locului de înțepare. Acestea sunt însă considerate mai degrabă reacții sistemice decât locale [44].

Întrucât persoanele care vin cel mai adesea în contact cu veninul de albine sunt apicultorii, s-a încercat estimarea ponderii efectelor veninului asupra acestora, luându-se în studiu un număr de 191 apicultori din Finlanda [1]. Dintre aceştia, 73 (un procent de 38%) au prezentat cel puțin o dată reacții locale extinse la veninul de albine, iar un număr de 50 (26%) au prezentat reacții sistemice. Este interesant de menționat că subiecții din cea de-a doua categorie au fost mai tineri decât ceilalți apicultori luați în studiu şi au practicat creşterea albinelor o perioadă mai scurtă de timp.

Alergia la veninul de albine. Şocul anafilactic. La unele persoane veninul de albine poate avea efecte toxice puternice, răspunsul organismului fiind mult mai complex, luând forma a ceea ce este cunoscut sub numele de **alergie** (hipersensibilitate). Termenul de alergie a fost introdus la începutul secolului XX de către von Pirquet, care definea prin acesta reacția organismului față de o substanță străină specifică, ce nu duce la creşterea rezistenței, ci dimpotrivă, determină lezarea propriilor structuri [14]. Apare în cazul în care mecanismele de apărare ale organismului nu funcționează în mod fiziologic normal, respectiv apare o hiperexprimare a funcțiilor sistemului imun. Activitatea excesivă a sistemului imun în cazul răspunsului la diferiți alergeni, inclusiv la veninul de albine este de tip cantitativ, ceea ce înseamnă că se produc în exces anticorpi şi celule imune, depăşind necesitățile unei apărări obişnuite, cu producerea de alterări ale propriilor structuri. Este importantă şi localizarea zonei de contact cu substanța străină, întrucât diferitele țesuturi au receptori pentru diferiți mediatori.

Această formă de reacție este cunoscută din antichitate: cea mai veche consemnare îl reprezintă pe faraonul egiptean Menes care a murit în anul 2640 î.Ch. în urma unei înțepături de insectă; Hipocrat şi Galen au descris acest fenomen complex de răspuns la diferiți factori din mediul extern. În prezent se estimează un procent de 1-2% din populație ca fiind hipersensibilă la înțepăturile albinelor [24, 38]. În practică este foarte improbabil ca o persoană hipersensibilă să fie înțepată de albine, dar aceasta se poate produce accidental. Din nefericire, după un prim contact cu alergenul, nu întotdeauna apare reacția. Dacă aceasta se întâmplă însă, victima va dezvolta o reacție alergică ce culminează cu şocul anafilactic. În cazul acestor persoane, cu cât intervalul de timp dintre primele contacte cu alergenul este mai scurt cu atât şansele pentru a dezvolta simptomele şocului anafilactic sunt mai mari [30, 32].

După cum s-a prezentat anterior, prezența unei reacții intense la locul înțepăturii, cu tumefierea zonei, durere, mâncărime şi căldură, extinsă pe o suprafață mare, uneori pe un întreg segment de membru, nu are semnificația prezenței alergiei la veninul de albine. Persoanele la care se manifestă astfel de reacții prezintă şanse mai reduse de a dezvolta şoc anafilactic la înțepăturile ulterioare.

În cazul alergiei la veninul de albine, la scurt timp după înțepare, pe lângă reacția locală – de intensitate variabilă – mai apar şi umflături (angioedem) şi/sau urticarie în regiuni îndepărtate de locul înțepării. Aceste reacții pot fi explicate în mod sumar pe baza mecanismelor imunologice specificate mai jos [39-41].

- După un prim contact cu alergenul, creşte semnificativ producția de anticorpi – imunoglobuline E (IgE) care se leagă cu mare afinitate de receptori aflați pe mastocite (localizate pe diverse epitelii) şi bazofile (aflate în circulație).
- La următoarea expunere, IgE vor interaționa cu antigenul (componente ale veninului – fosfolipaza A_2, melitina), ceea ce determină unele modificări ale membranei mastocitelor sau bazofilelor. Ca urmare, ele vor elibera mediatori chimici (histamină, alți agenți proinflamatori – inclusiv IL12 etc.), răspunzători de leziunile provocate ulterior.
- Limfocitele T ucigaşe, stimulate de nivelul crescut al IL 12 [18] atacă celulele ce au pe membrană antigenul incriminat; complexele antigen-anticorp de pe suprafața epiteliilor atrag elementele sistemului complement şi leucocitele polimorfonucleare, având ca rezultat lezarea acestor epitelii.
- Creşterea fluxului de fluide în țesut este urmată de creşterea drenării limfatice şi transportul antigenului spre ganglionii limfatici unde vor fi stimulate noi limfocite.

La simptomele amintite se mai pot asocia şi strănutul în salve, iritații ale esofagului, palatului, buzelor şi ochilor, lăcrimare, scurgere nazală apoasă, tuse, dificultăți la respirație, vomă. În unele cazuri se resimte şi o nevoie acută de a defeca sau urina [6, 29]. Există şi posibilitatea apariției şocului anafilactic, însă acesta se manifestă doar în primele 10-15 minute [25].

Rezultatele altor studii statistice efectuate în Franța (în care au fost luați în considerare 222 apicultori – [31]), respectiv în Turcia (pe 212 persoane alese randomic – [19]), arată că practicarea apiculturii poate avea ca rezultat o incidență relativ mare a reacțiilor alergice, dar cu tendințe de ameliorare rapidă a simptomelor şi o incidență scăzută a reacțiilor severe, iar pe de altă parte şi în rândul populației cu alte ocupații sunt relativ frecvente complicațiile sistemice apărute în urma înțepăturilor albinelor.

Şocul anafilactic (din gr. *ana* – fără, lipsă şi *phylaxis* – protecție) este cea mai gravă manifestare a alergiei pentru că amenință viața pacientului. Este de tip sistemic, adică priveşte întreg organismul. Simptomele se instalează în majoritatea cazurilor brusc şi brutal: în câteva zeci de secunde de la contactul cu alergenul, apare înroşirea corpului şi în special a feței, asociată cu erupție urticariană, prurit, puls rapid, agitație psihică şi motorie, febră, anxietate, senzație de sufocare, dată de insuficiența respiratorie, cu modificarea vocii. Pot să apară şi crampe abdominale sau diaree. Ulterior subiectul devine palid – datorită scăderii bruşte a presiunii sângelui, prezintă frisoane şi transpirații reci, abundente şi generalizate, amețeşte şi chiar îşi pierde conştiența, iar buzele şi unghiile se cianozează [30, 37-39]. În 75% dintre cazuri moartea survine în primele 4 ore după contactul cu alergenul [30].

Mecanismul şocului anafilactic este următorul: cuplarea alergenului cu Ig E duce la eliberarea histaminei din mastocite şi bazofile [43]; aceasta va produce efecte diverse în funcție de tipul țesutului şi, respectiv, a receptorilor de care se va lega.

Consecința legării histaminei la receptorii din pereții vaselor sanguine (H2) din toate organele, inclusiv din piele, este relaxarea musculaturii lor netede, urmată de dilatarea acestor vase. Datorită creşterii bruşte a diametrului, respectiv a capacității tuturor vaselor din organism, cantitatea de sânge din ele va deveni insuficientă. Astfel, după faza de roşeață generalizată produsă prin dilatarea vaselor, tensiunea arterială scade brusc. Un alt efect imediat al activării receptorilor prin legarea histaminei îl constituie retracția celulelor endoteliale. Aceasta, asociată cu lezarea unor capilare determină scurgeri plasmatice ce produc umflături sub piele sau sub mucoase – angioedem sau edem glotic cu sufocare, până la oprirea respirației [30] şi contribuie şi la căderea tensiunii arteriale.

Legarea histaminei la receptorii de pe celulele musculare netede din tractul gastrointestinal (H1) cauzează contracții şi spasme (exacerbate prin eliberarea simultană a serotoninei), manifestate prin senzația de vomă, apariția de crampe sau nevoia de a defeca.

În plămâni se produce şi contractarea musculaturii respiratorii (bronşice) şi spasme ale acesteia, determinând apariția manifestărilor respiratorii de astm; pătrund fluide în alveole şi pot fi obstrucționate căile respiratorii, ceea ce duce la o respirație scurtă şi dificilă şi chiar la asfixiere.

Pentru piele, după cum s-a menționat, sunt caracteristice pruritul, eritemele (înroşirea), angioedemele şi urticaria.

Toate simptomele menționate se desfăşoară foarte repede, în puține cazuri existând posibilitatea acordării unui prim-ajutor eficient. Uneori evoluția spre deces este la fel de rapidă. Moartea survine de cele mai multe ori ca rezultat al colapsului respirator şi circulator. Victimele sunt în general persoane peste 40 ani înțepate de albine în zona capului sau gâtului, arterioscleroza putând fi un factor agravant [44]. De obicei însă pacientul supraviețuieşte, revenindu-şi singur sau cu tratament medical intensiv, în decurs de câteva minute sau ore [45]. Demn de remarcat este faptul că Ch. Mraz – citat de Cherbuliez [6] – unul dintre pionierii utilizării veninului de albine în tratamentul sclerozei multiple în SUA, în 65 de ani de experiență în acest domeniu nu a înregistrat nici un caz de şoc anafilactic. Aceasta vine să confirme frecvența scăzută a acestei manifestări, sau poate supoziția că persoanele afectate de diferitele tipuri de artrite au un sistem imun modificat care nu declanşează şocul anafilactic.

Primul ajutor. Pentru ca aceste evenimente să nu se producă, în primul rând este indicat să se încerce evitarea contactului cu acest tip de alergen. Când totuşi contactul s-a produs, se recomandă extragerea urgentă a acului albinei din epidermă. Această operație este recomandată de unii autori a se efectua de preferință cu ajutorul unei lame de cuțit pentru a preveni descărcarea unei cantități suplimentare de venin în piele [37], dar pe baza studierii structurii morfologice şi a funcționării aparatului vulnerant, alți autori [46] apreciază că metoda de îndepărtare nu contează, ci doar intervalul până la realizarea ei – care este direct proporțional cu cantitatea de venin injectată. Deoarece în unele situații starea pacientului poate

evolua rapid spre deces (care poate surveni după circa 30 minute), trebuie asigurată de urgență astistența de specialitate. În drum spre spital se va curăța rana şi se va aplica un garou deasupra locului înțepăturii pentru evitarea răspândirii veninului în organism. Extractul de *Calendula officinalis* la care se adaugă 0,15 mg anestezină combate durerea prin neutralizarea histaminei. Se recomandă, în absența altor mijloace şi fricționarea locală cu oțet, NaCl, ceapă sau frunze de pătrunjel, cu acțiune antiinflamatorie, astringentă şi analgezică. Este importantă liniştirea pacientului în vederea evitării panicii care accentuează problemele respiratorii. Este necesară cât mai rapid asistarea ventilației şi administrarea unui ser antivenin – principalul mijloc pentru neutralizarea efectului veninului ajuns în circulație [3].

Datorită incidenței relativ mari a accidentelor ce au ca punct de plecare înțepăturile de albine, au fost dezvoltate unele medicamente cu acțiune specifică în acest sens. În România a fost produs şi testat cu succes un astfel de medicament care, actualmente se comercializează sub denumirea de Antiven. Acest produs este o soluție analgezică destinată uzului extern, realizată pe bază de acetat de calciu şi un antihistaminic (fenilamina). La acestea se alătură benzocaina sau lidocaina, ca anestezice locale. Ca utilizare terapeutică, se aplică în cazul înțepăturilor de insecte, ca analgezic, antiinflamator, anestezic local, în caz de urticarie acută, prurit etc. În ce priveşte modul de întrebuințare, se aplică extern, tamponând uşor zona înțepată, cu un tampon de vată medicinală îmbibat cu soluția respectivă. Se recomandă menținerea timp de 1-2 minute a tamponului pe locul înțepăturii [5]. În cazul persoanelor alergice este necesară şi aplicarea unor doze repetate de spray antiastmatic. În cazul opririi respirației se recurge la efectuarea de respirație artificială asociată cu masaj cardiac.

Tratmentul de specialitate parcurge trei stadii [24, 30]:

- tratamentul imediat pentru anafilaxie este adrenalina (vasoconstrictor şi bronhodilatator; previne degranularea mastocitelor şi bazofilelor, împiedicând eliberarea histaminei), administrată prin injectare intramuscular sau adânc subcutan;
- al doilea pas include un agent simpatomimetic – intravenos, antihistaminice administrate intramuscular (ce blochează activitatea unor componente ale veninului, respectiv limitează efectele produse de histamina eliberată) şi corticosteroizi (stabilizează limfocitele şi reduc eliberarea de compuşi vasoactivi); dacă este cazul, se reface hidratarea pacientului, se administrează transfuzii sau chiar se va face hemodializa;
- tratamentul de lugă durată presupune hiposensibilizarea organismului.

Pentru aceasta, se recomandă efectuarea testului pentru hipersensibilitate la veninul de albine [4, 38]. Testul este relativ simplu, dar se efectează numai sub supravegherea medicului. În funcție de reacția pielii şi de nivelul anticorpilor IgE din sânge va fi recomandat cel mai potrivit tratament de hiposensibilizare specifică ce va stimula sistemul imun să protejeze organismul la eventuale înțepături ulterioare.

Hiposensibilizarea, descrisă pentru prima dată de Noon şi Freeman în 1911, se face prin administrarea subcutană a unor cantități mici de soluții injectabile obținute din veninul integral sau din componente ale acestuia, gradat, în doze crescătoare, în

mod progresiv, până când se ajunge la echivalentul cantității de venin eliberată în urma a 1-2 înțepături, fără ca pacientul să prezinte reacții hipersensibile [4, 38, 41]. Rezultatul desensibilizării prin utilizarea veninului pur este pozitiv la circa 95% dintre subiecții tratați. Tratamentul poate fi asociat şi cu administrarea de antihistaminice [15] sau alte substanțe active [34] pentru a limita amploarea reacțiilor. S-a încercat şi hiposensibilizarea cu extract din corpul albinelor, dar s-a dovedit că imunoterapia cu venin este radical superioară celei cu extract [28]. La fel ca în timpul desfăşurării evenimentelor în cazul reacțiilor normale locale şi în cursul tratamentelor de hiposensibilizare cu venin de albine s-au determinat valori crescute ale producției de IL-10 [42]. Această citokină este produsă de limfocitele T din sângele periferic în cantități din ce în ce mai mari pe parcursul imunizării şi va avea un important rol în contracararea sintezei de IL12 [18]. Un alt fapt observat este acela că titrul anticorpilor dozați prin metoda ELISA este cel mai ridicat după 30 de zile de tratament, rezultatele fiind şi în acest caz mai bune în urma tratamentului cu venin decât cu extract [12].

Deoarece, chiar şi în timpul şedințelor de hiposensibilizare – mai ales în perioada de debut – asistate de specialişi, pot să apară simptome alergice sau ale anafilaxiei, cercetătorii din domeniu încearcă să găsească noi metode de reducere a frecvenței acestor manifestări neplăcute sau chiar periculoase. Se testează aşadar răspunsul sistemului imunitar la diferite fracțiuni (sub formă de extracte) ale veninului [21], la molecule asemănătoare cu alergenii sau derivate, sau chiar la moleculele respective, dar având structura terțiară modificată – toate acestea, încadrate în categoria aşa-numiților alergoizi [18]; sunt luați în considerare şi inhibitori specifici pentru componentele veninului [7]. O altă metodă testată cu succes, dat fiind că majoritatea alergenilor sunt proteine, o reprezintă identificarea genelor pentru acestea, urmată ulterior de sinteza şi integrarea lor în vectori (plasmide, virusuri recombinate etc.) care permit transferul lor în celulele gazdei, prin administrarea de injecții intramusculare, intradermice sau pe alte căi. Imunizarea bazată pe utilizarea ADN va duce la inhibarea sintezei de anticorpi IgE, implicit a sensibilității de tip anafilactic [20, 40].

În unele situații s-a observat că persoane care în mod normal nu prezentau reacții la veninul de albine, chiar apicultori obişnuiți cu înțepăturile, după ce au urmat un tratament cu medicamente antiinflamatoare nesteroidice, au devenit hipersensibile. După întreruperea tratamentului respectiv, sistemul imun îşi revine, putând apărea doar eventuale reacții locale ca urmare a unor noi înțepături [37, 38].

Mulți indivizi care prezintă reacții locale severe la înțepăturile albinelor, pe care un apiterapeut le-ar considera ca efecte pozitive, sunt incorect considerați ca fiind alergici [35]. În cazul acestor persoane, reacțiile nu sunt mediate de IgE, ci sunt produse prin activarea complementului; ca urmare se declanşează aşa-numitul şoc anafilactoid, în care caz hiposensibilizarea este ineficientă şi deci inutilă. Deci, în cazul persoanelor alergice trebuie determinat cu precizie mecanismul de acțiune al sistemului imun. De asemenea, este indicat ca persoanele recunoscute ca hipersensibile să aibă la îndemână tot timpul un chit antialergic care la nevoie le poate salva viața şi mai ales să evite contactul cu albinele.

Toxicitatea veninului de albine

Toxicitatea veninului de albine poate fi evidențiată cel mai bine în cazurile în care o cantitate foarte mare de venin pătrunde în organism. Astfel, dacă numărul de înțepături primite este de la 50 la 100, apare efectul toxic al veninului de albine. Edificatoare în acest sens sunt observațiile clinice şi rezultatele primelor analize în cazul unor pacienți atacați de un număr mare de albine [3, 13]. Acestea au arătat că veninul injectat cauzează cianoza pielii, produce spasme musculare şi simptome de paralizie temporară, aritmie respiratorie însoțită uneori de întreruperea temporară a respirației, hipertensiune şi aritmie cardiacă cu accelerarea pulsului etc. Un număr de 200 de înțepături sau mai multe pot avea ca rezultat paralizia muşchilor din sistemul respirator [38]. Pe lângă aceste simptome au mai fost observate o puternică hemoliză intravasculară şi rabdomioliza cu mioglobinemie şi mioglobinurie. Cantitatea mare de venin provoacă, de asemenea, sângerări, edem pulmonar, disfuncții hepatice, renale şi neurologice, stare de şoc, comă. Efectele menționate sunt produse prin acțiunea concomitentă a melitinei şi fosfolipazelor (distrug membranele celulare), hialuronidazei (duce la slăbirea adeziunii intercelulare), apaminei (efect stimulator excesiv la nivelul sistemului nervos), peptidului MCD (Mast Cell Degranulating; eliberează histamina din mastocite), histaminei etc. Hiperpotasemia şi nivelurile ridicate ale ureei şi creatininei confirmă disfuncțiile renale acute, de obicei provocate prin necroza tubulară [3]. Victima înțepăturilor îşi pierde viața în general datorită disfuncțiilor renale şi complicațiilor cardiace şi respiratorii [45]. La pacienții decedați din această cauză s-au observat zone extinse de necroză în țesuturile analizate (necroză hepatocelulară, necroză nefrotubulară, necroză subendocardială – pot fi explicate prin efectul direct al componentelor veninului, dar şi ca urmare a acumulării de resturi celulare transportate de fluxul sanguin la nivelul capilarelor fine din aceste organe, cu blocarea lor, respectiv împiedicarea oxigenării şi aprovizionării celulelor etc.) şi coagulare intravasculară diseminată. Park [30] arată într-un studiu statistic că cele mai multe cazuri de deces datorate reacțiilor toxice la veninul de albine apar la extremele de vârstă datorită rezistenței reduse a organismului, în vreme ce incidența deceselor cauzate de apariția şocului anafilactic la veninul de albine este maximă în rândul categoriei de vârstă cuprinsă între 35-45 ani. Pacienții care însă supraviețuiesc se vor reface treptat în timp.

Unele persoane pot tolera mai mult de 1000 de înțepături. Este menționat în literatura de specialitate cazul unui pacient care a primit 2.243 de înțepături şi a supraviețuit. O estimare aproximativă arată că doza letală medie (DL_{50}) pentru oamenii adulți este reprezentată, după unii autori, de veninul eliberat în urma a circa 1000-1100 înțepături [38] – 100-110 mg venin cristalizat/kg corp –, iar după alții, a 500-1500 de înțepături [44] – 50-150 mg/kg corp. Pentru un copil de 10 ani 90 de înțepături sunt fatale.

Pe de altă parte s-au raportat şi decese survenite după 100, până la 300 înțepături de albine. Ca urmare, foarte importantă este îndepărtarea rapidă a acului din rană, limitându-se astfel cantitatea de venin introdusă.

Oricum, cele mai multe cazuri de decese provocate de veninul de albine au fost înregistrate în rândul persoanelor hipersensibile, în urma unei singure înțepături [37, 38] datorită reacțiilor alergice, disfuncționalităților cardiace sau sufocării produse de edemele apărute în zona gurii sau gâtului. Dar statistic, numărul accidentelor produse datorită veninului de albine reprezintă doar 5% din numărul celor determinate de înțepăturile sau muşcăturile insectelor [35].

Există şi variații interspecifice ale compoziției chimice a veninului, respectiv ale toxicității acestuia: s-a raportat pentru veninul provenit de la *A. cerana* o toxicitate dublă față de cel provenit de la specia *A. mellifera* [23].

A fost determinată toxicitatea veninului de albine şi pentru animalele de laborator. Astfel, DL_{50} la şoarecii injectați intravenos este situată între 4 şi 8 mg/kg corp. Animalele testate au prezentat caracteristicile hemolizei interne: edeme hemoragice la nivelul plămânilor, eliminarea de hemoglobină prin urină etc. În urma unui experiment simplu, Marsc [26] trage concluzia că mecanismele prin care organismul realizează prelucrarea moleculelor, respectiv detoxificarea servesc şi la apărarea împotriva veninului de albine. El a observat că la şoarecii de laborator, înfometați, injectați cu o doză mare de venin de albine, supraviețuirea este de 100%, iar administrarea aceleiaşi doze de venin, pe aceeaşi cale, la şoareci alimentați cu o rație bogată în proteine, sau cu ulei de arahide înainte de injectare, duce la o mortalitate de până 100%. În primul caz, capacitatea de absorbție în celule şi de inactivare a componentelor veninului este mare, ceea ce duce la rezistență, pe când în cel de-al doilea caz, imposibilitatea prelucrării toxinelor veninului favorizează o activitate mai îndelungată a acestora la diferite niveluri, având în final efectul letal.

DL_{50} a fost stabilită de asemenea şi pentru unele componente purificate ale veninului de albine. Pentru melitina administrată intravenos, DL_{50} este de 3,5 mg/kg, intraperitoneal, de 5 mg/kg, intracerebral, de 0,8 mg/kg [16]. Pentru apamină, doza letală la şoarece este de 3,8 mg/kg corp la injectarea intravenoasă, animalele murind ca urmare a convulsiilor generalizate, în urma unei perioade de mişcări neîntrerupte, necoordonate [47]. Animalele care au supraviețuit acestei doze au prezentat hiperexcitabilitate pe o perioadă de peste 60 ore, mai accentuată la şoarecii ținuți în grup [17]. Fosfolipaza A_2 injectată intravenos la şoarece produce moartea la o doză de 7 mg/kg corp [16]. Peptidul MCD, injectat intravenos este practic netoxic (DL_{50} fiind situată în jurul valorii de 40 mg/kg corp) [17]. Însă injectat intracerebroventricular, doza letală pentru peptidul MCD este la şoarece de 1,5 μg/kg corp, iar la şobolan de 6,8 μg/kg. Minimina testată pe larve de *Drosophila* a prezentat o DL_{50} de circa 0,005 μg, larvele care au supraviețuit încetând hrănirea şi creşterea, evoluând în musculițe cu dimensiuni de circa 1/4 față de normal. Pentru histamina izolată din venin, DL_{50} la injectarea intravenoasă la şoarece a fost de 192-445 mg/kg corp [17]. Pentru acidul formic, DL_{50} la administrare orală la şobolan este de 730-1830 mg/kg corp [33].

În cazul administrării experimentale a veninului de albine la animale gestante, s-a observat o extindere a efectelor acestuia şi la nivelul embrionilor. Shkenderov şi Todorov [36] sunt cei care au arătat capacitatea veninului de albine de a traversa

placenta. Astfel, după injectarea unor doze zilnice de venin la femelele de şobolan aflate în gestaţie, la embrionii care au atins vârsta de 20 de zile s-a observat o reducere a greutăţii corporale şi totodată modificarea unor parametri biochimici (scăderea activităţii lactatdehidrogenazei şi izocitratdehidrogenazei din omogenatul hepatic). Au existat şi cazuri de autoliză şi embrioni morţi în uterul animalelor tratate (efect embriotoxic).

Unele din rezultatele studiilor privind toxicitatea veninului de albine au fost confirmate de noi prin investigaţii histologice şi electrono-microscopice originale, însoţite şi de determinări biochimice şi hematologice în urma administrării experimentale a veninului de albine în diferite doze [8-11].

BIBLIOGRAFIE

1. Annila, I. T., Karjalainen, E. S., Annila, P. A., Kuusisto, P. A., *Bee and wasp sting reactions in current beekeepers*, "Ann. Allerg., Asthma Immunol.", **77**, 1996**,** 423-427.
2. Artemov, N. M., *Efectul veninului de albine asupra permeabilităţii capilarelor şi asupra cantităţii albuminelor din sânge*, în *Al XXII-lea Congres al Apimondiei*, p. 361-365, Apimondia, Bucureşti, 1969.
3. Azevedo-Marques, M. M., Cupo, P., Hering, S. E., Costa, R., Ferreira, D. B., *Clinical-laboratory and therapeutic aspects of envenomation caused by africanized bees*, "J. Ven. Anim. Tox.", **5** (2), 2001, 154-171.
4. Bousquet, J., Lockey, R., Malling, H. J., Alvarez-Cuesta, E., Canonica, G. W., Chapman, M. D., Creticos, P. J., Dayer, J. M., Durham, S. R., Demoly, P., Goldstein, R. J., Ishikawa, T., Ito, K., Kraft, D., Lambert, P. H., Løwenstein, H., Mūller, U., Norman, P. S., Reisman, R. E., Valenta, R., Valovirta, E., Yssel, H., *Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases*, "Ann. Allerg., Asthma Immunol.", **81**, 1998, 401-405.
5. Chauvin, R., *Action du venin sur l'homme*, în Chauvin, R. (Ed.), *Traité de biologie de l'abeille*, p.160-161, Masson, Paris 1968.
6. Cherbuliez, T., *Bee venom therapy and safety*, "Bee Informed", **4** (3), 1997, 10-11.
7. Cheung, A. K., Snapper, M. L., *Total syntheses of (+)- and (–)-cacospongionolide B: New insight into structural requirements for phospholipase A_2 inhibition*, "J. Am. Chem. Soc.", **124** (39), 2002, 11584-11585.
8. Florea, A., Crăciun, C., Puică, C., Gherghel, P., Oprea, M. C., *Hepatotoxicitatea veninului de albine*, "Stud. Univ. Babeş-Bolyai, Biol.", **48** (1), 2003, 49-66.
9. Florea, A., Oprea, M. C., Puică C., Gherghel, P., Crăciun, C., *Efecte structurale şi ultrastructurale determinate de veninul de albine în miocard*, "Stud. Univ. Babeş-Bolyai, Biol.", **48** (2), 2003, 89-101.
10. Florea, A., Puică, C., Crăciun, C., Gherghel, P., Oprea, M. C., *Modificări histologice şi ultrastructurale induse experimental la nivelul rinichiului prin administrarea veninului de albine în diferite doze*, "An. Soc. Naţ. Biol. Cel.", **7 (**1), 2002, 327-341.
11. Florea, A., Pure, D., Oprea, M. C., Gherghel, P., Crăciun, C., *Blood changes in experimental subchronic rat envenomation with honey bee (*Apis mellifera L.*) venom*, "Bull. Mol. Med.", **15-17**, 2003, 19-26.

12. Forster, J., Urbanek, R., *Enzyme-linked immunosorbent assay of allergen-specific IgG antibodies in bee sting allergic patients hyposensitized with pure bee venom*, "Klin. Wochenschr.", **57**, 1979, 421-422.
13. França, F. O. S., Benvenuti, L. A., Fan, H. W., Dos Santos, D. R., Hain, S. H., Picchi-Martins, F. R., Cardoso, J. L. C., Kamiguti, A. S., Theakston, R. D. G., Warrell, D. A., *Severe and fatal mass attacks by "killer" bees (Africanized honey bees* – Apis mellifera scutellata*) in Brazil: clinicopathological studies with measurement of serum venom concentration*, "Quart. J. Med.", **87,** 1994, 269-282.
14. Freizer, A., *Allergy to the bee stings*, "Am. Bee J.", **11**, 1964, 406-407.
15. Graft, D. F., *Maintenance venom immunotherapy*, "Curr. Opin. Allerg. Clin. Immunol.", **2** (4), 2002, 359-362.
16. Habermann, E., *Chimie, pharmacologie et toxicologie du venin*, în Chauvin, R. (Ed.), *Traité de biologie de l'abeille*, p.363-387, Masson, Paris, 1968.
17. Habermann, E., *Bee and wasp venoms. The biochemistry and pharmacology of their peptides and enzymes are reviewed*, "Science", **177**, 1972, 314-322.
18. Kahlert, H., Grage-Griebenow, E., Stūwe, H.-T., Cromwell, O., Fiebig, H., *T cell reactivity with allergoids: Influence of the type of APC*, "J. Immunol.", **165**, 2000, 1807-1815.
19. Kalyoncu, A. F., Demir, A. U., Özcan, Ü., Özkuyumcu, C., Şahin, C., Bariş, Y. I., *Bee and wasp venom allergy in Turkey*, "Ann. Allerg., Asthma Immunol.", **78**,1997, 408-412.
20. Kay, A. B., *Allergy and allergic diseases*, "New Engl. J. Med.", **344** (2), 2001, 109-113.
21. Košnik, M., Mušič, E., Sager, A., *Safety of Venomenhal*[Á] *venom in maintenance hymenoptera venom immunotherapy*, "Zdrav Vestn.", **70**, 2001, 531-533.
22. Koyama, N., Hirata, K., Hori, K., Dan, K., Yokota, T., *Computer-assisted infrared thermographic study of axon reflex induced by intradermal melittin*, "Pain", **84**, 2000, 133-139.
23. Krell, R., *Value-added products from beekeeping*, "FAO Agr. Serv. Bull.", **124**, Food Agr. Org. U. N., Rome, 1996.
24. Lehnert, T., *Hymenopterous insect stings. Bee keeping in the United States*, http://www. maarec.cas.psu.edu/bKCD/HBBiology/insect-sting.htm, 2001.
25. Liebers, V., Sander, I., van Kampen, V., Raulf-Heimsoth, M., Rozynek, P., Baur, X., *Overview on denominated allergens*, "Clin. Exp. Allergy", **26**, 1996, 494-516.
26. Marsc, R., *The toxicity of bee venom*, "Gleanings Bee Cult.", **12**, 1964, 733-740.
27. Matzinger, P., *The danger model: A renewed sense of self*, "Science", **296**, 2002, 301-305.
28. Muller, U., *Immunotherapy in bee sting hipersensivity. Bee venom versus wholebody extract*, "Allergy", **34**, 1979, 369-378.
29. Mureşan, D., *Studiu asupra modificărilor imunologice din alergia la înțepăturile de albine*, "Apicult. România", **5**, 1982, 25-26.
30. Park, R., *Bee and hymenoptera stings*, "eMed. J.", **3 (**4), 2002, http://www. author. emedicine.com/EMERG/ topic55.htm.
31. Pastorello, E. A., *Epidemiological and clinical study on bee venom allergy among beekeepers*, "Boll. Ist. Sieroter. Milano", **67** (5-6), 1988, 386-392.
32. Pucci, S., Antonicelli, L., Bilo, M. B., Garritani, M. S., Bonifazi, F., *Shortness of interval between two stings a risk factor for developing Hymenoptera venom allergy*, "Allergy", **49**, 1994, 894-896.

33. Rauckman, E., *Test plan for the formates category – U.S. Environmental Protection Agency*, http://www.epa.gov/chemrtk/formates/c.13438.pdf, 2001
34. Reimers, A., Hari, Y., Muller, U., *Reduction of side-effects from ultrarush immunotherapy with honeybee venom by pretreatment with fexofenadine: a double-blind, placebo-controlled trial*, "Allergy", **55**, 2000, 484-488.
35. Rothfeld, G., *Bee venom therapy*, htttp//:www.2shore.net/…/apitherapy.html, 2001
36. Shkenderov, S., Todorov, S., *Effect of bee venom and its low and high-molecular fractions on embryogenesis in rats*, "Eksp. Med. Morfol.", **18**, 1979, 160-165.
37. Simics, M., *Bee Venom: Exploring the Healing Power*, Apitronic Publ., Calgary, 1994.
38. Simics, M., *The effect of bee stings on the human body*, "Bee Inf.", **1** (4), 1994, 6.
39. Stoenescu, M., *Copilul alergic*, p.7-24, 131-134, Ed. Med., Bucureşti, 1991.
40. Sudowe, S., Montermann, E., Steitz, J., Tūting, T., Knop, J., Reske-Kunz, A. B., *Efficacy of recombinant adenovirus as vector for allergen gene therapy in a mouse model of type I allergy*, "Gene Ther.", **9**, 2002, 147-156.
41. Svirshchevskaya, E. V., Kurup, V. P., *Immunotherapy of allergic bronchopulmonary aspergillosis: A clinical and experimental approach*, "Front. Biosci. ", **8**, 2003, 92-101.
42. Umetsu, D. T., McIntire, J. J., Akbari, O., Macaubas, C., DeKruyff, R. H., *Asthma: an epidemic of dysregulated immunity*, "Nature Immunol.", **3** (8), 2002, 715-720.
43. Vaillant, J., *Immunologie et allergie aux venoms d'hymenoptères*, "Santé l'Abeille", **131**, 1937, 27-31.
44. Vetter, R. S., Visscher, P. K., *Bites and stings of medically important venomous arthropods*, "Int. J. Dermatol.", **37**, 1998, 481-496.
45. Vetter, R. S., Visscher, P. K., Camazine, S., *Mass envenomations by honey bees and wasps*, "West. J. Med.", **170** (4), 1999, 223-228.
46. Visscher, P. K., Vetter, R. S., Camazine, S., *Removing bee stings: speed matters, method doesn't*, "Lancet", **348**, 1996, 301-302.
47. ****Ion channel and receptor ligands – Toxins & alkaloids, L8407 apamin*, http://www. 00000149 APAMIN.htm

STUDIA UNIVERSITATIS BABEŞ-BOLYAI, BIOLOGIA, XLVIII, 2, 2003

MICROBIOTA UNOR APE MINERALE DIN ZONA LĂPUŞULUI (JUD. MARAMUREŞ)

MIHAIL DRĂGAN-BULARDA* şi CLAUDIU IUŞAN**

SUMMARY. – Microbiota of Some Mineral Waters from the Lăpuş Zone (Maramureş County). The microbiota of mineral waters is closely related to the environmental, physical-chemical and hydro-geological conditions of the deposit. Our research is the first complex analysis of the mineral waters in the Lăpuş zone (Maramureş county) from a microbiological point of view. We studied 9 springs of mineral water, at four places in the Lăpuş Valley (Stoiceni, Rogoz, Borcut and Măgureni). We determined the numbers of the following bacteria: heterotrophic aerobic, ammonifying, nitrite– and nitrate-producing, denitrifying, sulphate-reducing, iron-reducing and proved the presence of the sulphur-oxidizing bacteria in the water samples taken aseptically in October 2002. We also determined four hygienic-bacteriological indicators: the mesophilic heterotrophic bacteria, the total coliform bacteria, the faecal coliform bacteria and the faecal enterococci , in the water samples collected aseptically in April 2003. Our data show that all the bacteria in the seven physiological groups were present in a low or very low number in the studied springs, the mineral waters being oligotrophic, containing a very low amount of organic substance. Some differences were observed between the mineral water springs based on their bacterial content. Occurrence of sulphur-oxidizing bacteria was demonstrated in water samples from all springs by using three elective media. On the basis of the average pH value modification and of the microscopic examination, it was established that these bacteria belong to the *Thiobacillus* genus. Mesophilic heterotrophic bacteria were found in all water samples but in a small number. The numbers recorded for the total coliform bacteria were low in all mineral water samples. Faecal coliform bacteria were present in 6 of the 9 springs (their number was small), but the faecal enterococci were missing in all analysed water samples. These data confirm a good hygienic-sanitary state of the springs and installations.

Analiza microbiologică a apelor minerale este absolut necesară, în primul rând pentru stabilirea indicilor calitativi igienico-sanitari [9], dar şi pentru a se putea stabili compoziția şi stabilitatea acestora, tendința de modificare a acestora ca urmare a predominanței unor grupe ecologice de bacterii, în funcție de originea apei şi a unor constituenți chimici ai acesteia [4].

Cercetări cu privire la analiza microbiologică a apelor minerale din România au vizat izvoarele minerale de la Băile Herculane, Călimăneşti-Căciulata, Olăneşti [4], respectiv Bizuşa-Băi [8], precum şi alte izvoare, acestea contribuind la explicarea

* *Universitatea "Babeş-Bolyai", Facultatea de Biologie şi Geologie, Catedra de Biologie vegetală, Str. M. Kogălniceanu nr.1, 3400 Cluj-Napoca, România.* E-mail: draganb@bioge.ubbcluj.ro

** *Universitatea "Babeş-Bolyai", Facultatea de Biologie şi Geologie, Str. M. Kogălniceanu nr.1, 3400 Cluj-Napoca, România*

genezei apelor minerale, a formării H_2S, diferitele izvoare prezentând particularităţi specifice şi în funcţie de prezenţa şi activităţile fiziologice ale diferitelor grupe de bacterii [4, 8].

Izvoarele minerale luate în studiu sunt situate în zona Lăpuşului, în judeţul Maramureş, la baza masivului vulcanic Şatra, în apropiere de oraşul Târgu Lăpuş.

Datorită structurii geologice deosebit de complexe a teritoriului [5], apele izvoarelor prezintă o mineralizaţie bogat moderată (9,2 g /l), un conţinut de CO_2 liber de 1,7 g/l (izvoarele de la Stoiceni) şi o compoziţie chimică complexă, fapt ce le conferă proprietăţi terapeutice deosebite, fiind folosite atât în afecţiuni ale aparatului digestiv, cât şi ale aparatului circulator [6, 15, 16].

Analiza chimică a demonstrat că aceste izvoare au o apă carbogazoasă (2,6 g/l), bicarbonată (3,7 g HCO_3^-/l), clorurată (2,6 g/l), calcică (0,3 g/l), magneziană (0,2 g /l), sodică (1,7 g/l), un conţinut ridicat de acid metaboric (0,1 g /l), sulfuroasă, hipotonă [11, 12].

Nu dispunem de date referitoare la analiza microbiologică a acestor ape minerale. In cercetările noastre am urmărit evidenţierea şi determinarea numărului de bacterii din 7 grupe fiziologice (heterotrofe aerobe mezofile, amonificatoare, nitrificatoare (nitrit- şi nitrat-bacterii), denitrificatoare, sulfat-reducătoare, fier-reducătoare), evidenţierea celor sulf-oxidante, precum şi a parametrilor igienico-bacteriologici (bacterii mezofile aerobe, coliformi totali, coliformi fecali, enterococi fecali).

Materiale şi metode. *Recoltarea probelor*. Pentru analiza microbiologică a apelor minerale au fost prelevate, în condiţii aseptice, probe provenite de la 9 izvoare din următoarele 4 localităţi din zona Lăpuşului, jud.Maramureş (Stoiceni, Rogoz, Borcut şi Măgureni), la două date caledaristice: 16 octombrie 2002 (pentru grupele fiziologice) şi 10 aprilie 2003 (pentru indicatorii igienico-bacteriologici).

Medii de cultură. Au fost utilizate medii elective pentru grupele fiziologice luate în studiu [1, 3, 7].

Mediu pentru bacterii heterotrofe aerobe: bulion nutritiv agarizat. Sterilizare la 121^0C, 30 de minute [7].

Mediu pentru bacterii amonificatoare: apă peptonată (pH 7,9). Sterilizare la 121^0C, 30 de minute [7].

Medii pentru bacteriile sulfoxidante. *A. Mediul F* [8] cu următoarea compoziţie: $Na_2S_2O_3$ 5 g, $NaHCO_3$ 1 g, Na_2HPO_4 0,2 g, NH_4Cl 0,1 g, $MgCl_2$ 0,1, apă de robinet 1000 ml, pH 7. *Mediul S* [1] compus din: $Na_2S_2O_3$ 10 g, $(NH_4)_2SO_4$ 3 g, KH_2PO_4 3 g, $CaCl_2$ 2 g, $MgSO_4$ 0,25 g, soluţie de microelemente 1 ml, apă distilată 1000 ml, pH 7,5. *Mediul R* [1] conţinând: NH_4Cl 0,5 g, $NaHCO_3$ 1 g, KNO_3 2 g, $MgCl_2$ 0,5 g, K_2HPO_4 2 g, $Na_2S_2O_3$ 5 g, soluţie de microelemente l ml, apă distilată 1000 ml, pH 7. Soluţia de microelemente a avut următoarea compoziţie: EDTA 5 g, $ZnSO_4$ 2,2 g, NaCl 0,5 g, $MnCl_2$ 0,5 g, $FeSO_4$ 0,4 g, $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ 0,11 g, $CuSO_4$ 0,157 g, $CaCl_2$ 0,161 g, apă distilată 100 ml, pH 6. Toate mediile s-au sterilizat la 100^0C (în autoclavul neînşurubat), 30 minute, în 3 zile consecutive.

Medii pentru bacteriile sulfat-reducătoare A. Mediul v a n D e l d e n [3] alcătuit din: asparagină 2 g, K_2HPO_4 1 g, $MgSO_4$ 1,5 g, $CaSO_4$ 1g, lactat de Na 5 g, $FeSO_4$ 0,02 g, apă distilată 1000 ml, pH 7. Sterilizare: 105^0C, 30 minute în 3 zile consecutive. B. Bulion nutritiv cu benzi de $(CH_3COO)_2Pb$ [7].

Mediul pentru bacteriile fier-reducătoare [10] alcătuit din: K_2HPO_4 3 g, KH_2PO_4 0,8 g, $MgSO_4$ 0,2 g, KCl 0,2 g, glucoză 20 g, peptonă 5 g, Fe_2O_3 0,5 g, $MnSO_4$ 0,1 g, apă distilată 1000 ml. Sterilizare: 105^0C, 60 minute, în 3 zile consecutive.

Mediul pentru bacteriile nitrificatoare [7] a cuprins *a*. mediul pentru nitrit-bacterii compus din: $(NH_4)_2SO_4$ 0,05 g, $CaCO_3$ 0,1 g, soluție salină Vinogradski 5 ml, apă distilată 95 ml; sterilizare: 110^0C, 20 de minute; *b*. mediul pentru nitratbacterii alcătuit din: $NaNO_2$ 0,1 g, $CaCO_3$ 0,1 g, soluție salină Vinogradski 5 ml, apă distilată 95 ml; sterilizare: 110^0C, 20 de minute. Soluția salină Vinogradski este compusă din: K_2HPO_4 3 g, $MgSO_4$ 2,5 g, NaCl 2,5 g, $Fe_2(SO_4)_3$ 0,05 g, $MnSO_4$ 0,05 g, apă distilată 1000 ml. Sterilizare: 121^0C, 30 de minute.

Mediul pentru bacteriile denitrificatoare [7] este alcătuit din: KNO_3 2 g, glucoză 10 g, $CaCO_3$ 5 g, soluție salină Vinogradski 50 ml, apă distilată 950 ml, pH 7,2. Sterilizare: 112^0C, 20 minute, în 3 zile consecutive.

Mediul pentru coliformi totali: laurilsulfat de Na (simplu şi dublu concentrat) şi Geam-Levin [14].

Mediul pentru coliformi fecali: mediul MacConkey [14].

Mediul pentru enterococi fecali: mediu cu azidă de Na simplu şi dublu concentrat, respectiv mediu cu azidă şi purpur crezol [14].

Prepararea diluțiilor. S-au preparat diluții de ape minerale, cuprinse între 10^{-1} şi 10^{-3}, pentru diluare folosindu-se soluție de NaCl 0,85 %, sterilizată (121^0C, 30 minute).

Inocularea diluțiilor. Din diluțiile preparate s-au inoculat câte două cutii Petri, conținând mediul pentru cultivarea bacteriilor heterotrofe aerobe şi câte 5 eprubete, conținând mediile pentru cultivarea bacteriilor din celelalte grupe fiziologice. Volumul inocului a fost, întotdeauna, 1 ml. Pentru indicatorii igienico-bacteriologici s-a procedat conform metodei STAS pentru apa de fântână [14].

Incubarea a avut loc la 28^0C şi a durat 7 zile, în cazul grupelor fiziologice, respectiv la 37^0C, 24 ore, pentru indicatorii igienico-bacteriologici.

Examinarea culturilor. Culturile au fost examinate macroscopic sau/şi chimic.

Pentru determinarea numărului bacteriilor heterotrofe aerobe s-a citit numărul coloniilor din fiecare cutie Petri.

Culturile bacteriilor amonificatoare au fost analizate, utilizându-se reactivul Nessler pentru evidențierea amoniului produs de aceste bacterii. La 1 ml cultură s-a adăugat 1 ml reactiv Nessler. Apariția unei colorații galbene-portocalii în mediul inoculat şi absența ei în mediul martor (neinoculat) indică amonificarea.

Culturile bacteriilor sulf-oxidante au fost examinate pentru stabilirea unei opalescențe, respectiv pentru modificarea pH-ului, comparativ cu proba martor. Din culturi s-au efectuat preparate microscopice colorate prin metoda Gram [7].

Culturile nitritbacteriilor au fost examinate pentru evidențierea NO_2^- care se formează din amoniu sub acțiunea acestor bacterii. La 1 ml cultură s-a adăugat 0,1 ml reactiv Griess I şi 0,05 ml acid acetic glacial. După 15 minute, s-au adăugat 0,1 ml reactiv Griess II. Apariția unei colorații roz indică prezența nitriților.

Culturile nitratbacteriilor au fost examinate pentru evidențierea NO_3^- produs din NO_2^- de către aceste bacterii. Pentru a elimina reacția dată de nitriții reziduali s-a folosit ureea, apoi s-a efectuat reacția cu difenilamină. In fiecare eprubetă s-au adăugat 1 ml H_2SO_4 concentrat şi 1 ml reactiv cu difenilamină. In prezența nitraților apare o colorație albastră.

Pentru evidențierea H_2S produs de bacteriile desulfoficatoare în urma reducerii SO_4^{2-}, s-au folosit benzi de hârtie de filtru îmbibate într-o soluție de acetat de Pb 10%. Din cultură s-au transpus 1-3 ml, în tuburi mici, după care s-au adăugat 2-3 picături de HCl concentrat. Gura tubului s-a acoperit cu banda de hârtie îmbibată în soluția de acetat de Pb. Conținutul tubului s-a încălzit. Apariția unei pete brune sau negre (PbS) pe hârtie dovedeşte reducerea SO_4^{2-} de către culturi.

Ionii de Fe^{2+}, produşi de bacteriile fier-reducătoare în urma reducerii Fe(III) din Fe_2O_3 s-au evidențiat prin adăugarea la cei 7 ml de cultură a 1 ml reactiv cu α,α-dipiridil. Colorația roz sau roşie indică prezența Fe^{2+}.

Numărul bacteriilor heterotrofe aerobe s-a stabilit pe baza valorii medii a numărului de colonii care s-au dezvoltat în urma inocularii diluțiilor, înmulțindu-se numărul de colonii cu valoarea inversă a diluției. La celelalte culturi de la grupele fiziologice, s-a stabilit, pentru fiecare diluție în parte , numărul eprubetelor pozitive din totalul de 5 eprubete. Numărul cel mai probabil al bacteriilor raportat la 1 ml apă minerală s-a calculat pe baza tabelului statistic publicat de A l e x a n d e r [2], luându-se în considerație cele 3 diluții. Pentru indicatorii igienico-bacteriologici s-au utilizat tabelele prevăzute de metoda STAS [14].

Rezultate şi discuții. Datele referitoare la prezența şi numărul bacteriilor din diferitele grupe fiziologice sunt redate în Tabelul 1. Se poate constata că toate cele 7 grupe fiziologice au fost evidențiate în cele 9 izvoare de ape minerale analizate, numărul lor oscilând în funcție de grupul fiziologic (ecologic), respectiv de izvorul mineral studiat. Valorile cele mai ridicate s-au dovedit a fi în cazul bacteriilor heterotrofe aerobe, acestea oscilând între 1200 celule în cazul izvorului de la Stoiceni şi 95.000 celule la izvorul de la Măgureni I. Se poate aprecia că, în general, acest grup ecologic, cel mai numeros de altfel în ape (atât în apa potabilă, cât şi în cea a râurilor şi lacurilor), este slab reprezentat, demonstrând prezența substanței organice în cantitate foarte redusă, apele izvoarelor studiate fiind oligotrofe. De asemenea, acest rezultat mai scoate în evidență lipsa unei surse de poluare organică.

Bacteriile amonificatoare au fost evidențiate în toate cele 9 izvoare, analizele furnizând valori scăzute de câteva zeci de celule/ml la 4 izvoare (Stoiceni, Rogoz I, Rogoz II şi Borcut II), respectiv sute de celule la două izvoare (Rogoz III şi Borcut I) sau de câteva mii la 3 izvoare (Măgureni I, Măgureni II şi Măgureni III). Materia organică ce a constituit substratul dezvoltării acestor bacterii este reprezentată de

bacteriile moarte, în principal, degradate cu eliberare de amoniu. Prezența acestor bacterii în număr ridicat constituie un indiciu al poluării apelor cu substanțe organice din surse externe. Dacă se are în vedere valorile calculate la bacteriile heterotrofe aerobe şi la cele amonificatoare se poate constata că la izvoarele de la Măgureni s-au înregistrat cele mai ridicate cifre, ceea ce ar putea constitui o eventuală infiltrație a apelor din sol cu unele cantități mici de substanțe organice.

Tabel 1

Numărul bacteriilor din diferite grupe fiziologice în apele minerale studiate

Sursa de apă minerală	Denumirea izvorului	Bacterii heterotrofe aerobe	Bacterii amonifi-catoare	Nitrit - bacterii	Nitrat – bacterii	Bacterii denitrifi-catoare	Bacterii desulfofi-catoare	Bacterii fier- redu-cătoare
Stoiceni	La casă	1200	28	6	7	110	22	14
Rogoz I	Râu	2100	45	11	10	95	32	62
Rogoz II	Peste râu	16000	54	9	7	24	160	350
Rogoz III	La fântână	29000	350	14	12	39	160	45
Borcut I	Lângă vale	17000	920	14	13	39	72	350
Borcut II	Pe pășune	11000	54	9	11	39	140	32
Măgureni I	Valea Babei	95000	16000	20	22	140	64	38
Măgureni II	Valea Babei-Bazin	21000	16000	27	28	33	280	64
Măgureni III	Fântâna de piatră	9000	31000	290	350	40	350	60

Bacteriile nitrificatoare (nitrit- şi nitrat-bacteriile) au furnizat valori scăzute, ele fiind strâns legate de prezența amoniului, rezultat în urma activității bacteriilor amonificatoare. Acest substrat energetic este oxidat până la nitriți de către nitrit-bacterii (*Nitrosomonas, Nitrosococcus)* şi apoi până la nitrați de către nitrat-bacterii (*Nitrobacter, Nitrococcus).* Se poate afirma că oxidarea a fost realizată de bacteriile autotrofe, din cele două faze ale nitrificării, întrucât conținutul în substanțe organice al acestor ape este foarte redus.

Grupul bacteriilor denitrificatoare, strâns legat de celelalte două grupe fiziologice din ciclul azotului (bacterii amonificatoare şi nitrificatoare) a fost prezent în toate izvoarele, fiind calculate valori scăzute ale numărului acestora, în general de ordinul zecilor de celule, cu două excepții (Stoiceni, cu 110 celule/ml, respectiv Măgureni I, cu 140 celule/ml apă). Pe baza valorilor obținute la cele 3 grupe fiziologice implicate în circuitul azotului se poate aprecia că există relații ecologice strânse între acestea, fiecare grup furnizând substratul metabolic sau energetic pentru un alt grup, fapt reflectat şi de valorile absolute înregistrate în cazul fiecărui grup, la cele 9 izvoare minerale. La toate aceste 3 grupe fiziologice valorile cele mai scăzute s-au găsit la izvorul de la Stoiceni, iar cele mai ridicate valori la izvoarele de la Măgureni.

Bacteriile sulfat-reducătoare şi cele fier-reducătoare, cu implicații în circuitul sulfului, respectiv al fierului, au fost determinate într-un număr destul de redus, obținându-se cifre de ordinul zecilor de celule sau a sutelor de celule la 1 ml de apă. Rezultate asemănătoare s-au semnalat şi la apele minerale de la Bizuşa-Băi, din județul Sălaj [8]. In urma acestor rezultate, se poate formula consatarea că grupele fiziologice pot caracteriza condițiile ecologice ale unui zăcământ de ape minerale.

In Tabelul 2 sunt prezentate rezultatele obținute la evidențierea bacteriilor sulf-oxidante în izvoarele minerale din zona Lăpuşului.

Tabel 2

Date privind evidențierea bacteriilor sulf-oxidante în probele de ape minerale studiate

Sursa de apă minerală	Denumirea izvorului	Mediul nutritiv folosit	pH inițial	pH final	Creşterea bacteriilor
Stoiceni	La casă	R	7,5	7,5	-
Stoiceni	La casă	S	7,5	6,0	++
Stoiceni	La casă	F	7,0	5,5	+++
Rogoz I	Râu	R	7,5	7,5	-
Rogoz I	Râu	S	7,5	7,5-	-
Rogoz I	Râu	F	7,0	6,5	+
Rogoz II	Peste râu	R	7,5	6,5	++
Rogoz II	Peste râu	S	7,5	7,0	+
Rogoz II	Peste râu	F	7,0	7,0	-
Rogoz III	La fântână	R	7,5	6,5	+
Rogoz III	La fântână	S	7,5	7,5	-
Rogoz III	La fântână	F	7,0	7,0	-
Borcut I	Lângă vale	R	7,5	6,5	++
Borcut I	Lângă vale	S	7,5	7,5	-
Borcut I	Lângă vale	F	7,0	7,0	-
Borcut II	Pe păşune	R	7,5	7,0	+
Borcut II	Pe păşune	S	7,5	7,5	-
Borcut II	Pe păşune	F	7,0	7,0	-
Măgureni I	Valea Babei	R	7,5	6,5	++
Măgureni I	Valea Babei	S	7,5	6,5	++
Măgureni I	Valea Babei	F	7,0	5,5	+++
Măgureni II	Valea Babei-bazin	R	7,5	5,5	+++
Măgureni II	Valea Babei-bazin	S	7,5	6,5	++
Măgureni II	Valea Babei-bazin	F	7,0	6,5	+
Măgureni III	Fântâna de piatră	R	7,5	7,0	+
Măgureni III	Fântâna de piatră	S	7,5	7,0	+
Măgureni III	Fântâna de piatră	F	7,0	6,5	+

- absența creşterii; + creştere slabă; ++ creştere bună; +++ creştrere foarte bună

In general, evidențierea acestui grup este mai dificilă, întrucât tipul de mediu electiv utilizat influențează într-o măsură însemnată rezultatul determinării. S-a avut în vedere în primul rând modificarea pH-ului, apoi creşterea bacteriilor prin apariția unei opalescențe şi nu în ultimul rând evidențierea microscopică a celulelor colorate prin metoda Gram. Din analiza tabelului rezultă că există o relație directă între creşterea bacteriilor (apariția unei opalescențe) şi modificarea pH-ului (scăderea lui, datorită apariției acidului sulfuric). Se poate constata că cele mai importante modificări de pH s-au obținut pe mediul R, la 6 izvoare (Rogoz II, Rogoz III, Borcut I, Măgureni I, Măgureni II, Măgureni III), apoi pe mediul F la 5 izvoare (Stoiceni, Rogoz I,

Măgureni I, Măgureni II, Măgureni III) şi pe mediul S tot la 5 izvoare (Stoiceni, Rogoz II, Măgureni I, Măgureni II, Măgureni III). Este de subliniat că, în urma folosirii celor 3 tipuri de medii nutritive elective, la fiecare izvor studiat s-a evidențiat acest grup ecologic. Aceste bacterii implicate în mod însemnat şi în chimismul apei s-au dovedit a aparține, pe baza studiilor microscopice şi a modificărilor de pH, genului *Thiobacillus* (*Th.thiooxidans* şi *Th.thioparus*) [13].

In Tabelul 3 sunt prezentate rezultatele noastre privind parametrii igienico-bacteriologici pentru testarea igienico-sanitară a acestor izvoare. Pe baza datelor obținute se constată prezența bacteriilor mezofile heterotrofe într-un număr scăzut, în toate izvoarele studiate, indicând absența unei poluări organice. Numărul de bacterii coliforme totale este redus, fiind admis de STAS [14]. Bacteriile coliforme fecale, care indică o poluare fecaligenă recentă, lipsesc la primele 3 izvoare şi sunt prezente în număr mic la celelalte 6, fără a indica un semnal de contaminare cu ape menajere. Enterococii fecali au lipsit în toate probele de apă analizate, confirmând starea igienică corespunzătoare a instalațiilor, apele minerale putând fi consumate fără a prezenta vreun pericol epidemiologic.

Tabel 3

Parametrii igienico-bacteriologici din apele minerale studiate

Sursa de apă minerală	Denumirea izvorului	Bacterii mezofile heterotrofe nr./ 100 ml	Bacterii coliforme totale nr./100 ml	Bacterii coliforme fecale nr./100 ml	Enterococi fecali nr./100 ml
Stoiceni	La casa	12000	2	-	-
Rogoz I	Râu	21000	3	-	-
Rogoz II	Peste râu	130000	1	-	-
Rogoz III	La fântână	120000	2	1	-
Borcut I	Lângă vale	150000	3	4	-
Borcut II	Pe păşune	120000	6	3	-
Măgureni I	Valea Babei	500000	10	7	-
Măgureni II	Valea Babei -bazin	240000	10	5	-
Măgureni III	Fântâna de piatră	90000	11	3	-

Concluzii. 1. Apele minerale de la cele 9 izvoare existente în Zona Lăpuşului prezintă o microbiotă variată, fiind evidențiate bacterii din 7 grupe fiziologice (heterotrofe aerobe, amonificatoare, nitrificatoare, denitrificatoare, desulfufoficatoare, fier-reducătoare, sulf-oxidante), prezente într-un număr mic, diferind în funcție de izvorul de unde s-a recoltat proba de apă.

2. Valorile cele mai ridicate ale bacteriilor din grupele fiziologice studiate s-au înregistrat la cele heterotrofe aerobe şi apoi la cele amonificatoare, iar cele mai scăzute la nitrificatoare (nitrit- şi nitrat-bacterii).

3. Dintre cele 9 izvoare luate în studiu, cele din localitatea Măgureni (izvorul I, II şi III) au avut microbiota cea mai însemnată, urmate de izvorul III din localitatea Rogoz, iar izvorul de la Stoiceni s-a dovedit a avea microbiota cea mai redusă (este cel mai bine amenajat şi cel mai cunoscut, de peste 100 de ani).

4. Bacteriile sulf-oxidante au fost evidenţiate în toate probele de apă analizate, prelevate din cele 9 izvoare, prezenţa lor fiind demonstrată pe cel puţin unul din cele 3 medii elective testate. Pe baza modificărilor de pH, precum şi în urma examinărilor microscopice s-a stabilit că acestea aparţin genului *Thiobacillus* (*Th. thiooxidans* şi *Th. thioparus*).

5. Indicatorii igienico-bacteriologici, în special germenii coliformi totali, coliformi fecali şi enterococi fecali au fost prezenţi în număr mic sau au fost absenţi, confirmând starea igienico-sanitară corespunzătoare a acestor ape minerale, fără a prezenta un pericol epidemiologic.

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

1. A a r o n s o n, S., *Experimental Microbial Ecology,* Acad. Press, New York, 1970.
2. A l e x a n d e r , M., *Most-probable-number method for microbial populations,* în B l a c k, C.A., E v a n s, D.D., W h i t e, J. L., E n s m i n g e r, L.E., C l a r k, F.E.(Eds.), *Methods of Soil Analysis,* p. 1467-1472, Amer. Soc. Agron., Madison, Wisconsin, 1965.
3. A l l e n, O. N., *Experiments in Soil Bacteriology,* Third ed., Burgess, Minneapolis, Minnesota, 1957.
4. B u i c l i u, L., G o d e a n u, S., T r i c ă, V., K i s s, S., I o n e s c u, V., *Rolul biologiei şi microbiologiei în estimarea valorii terapeutice a apelor minerale şi a nămolurilor,* în *Problematica factorilor terapeutici naturali. Actualitate, Perspectivă,* Inst. Medicină Fizică, Balneoclimatologie, Recuperare Medicală, Bucureşti, 1981.
5. C i u p a g e a, D., P ă u c ă, M., I c h i m, T., *Geologia Depresiunii Transilvaniei,* Ed. Acad. R.S.R., Bucureşti, 1970.
6. C o c i a ş u, E., *Tratamentul balneoclimateric în bolile interne,* Ed. Med., Bucureşti, 1974.
7. D r ă g a n-B u l a r d a, M., *Lucrări practice de Microbiologie generală,* Univ. ”Babeş-Bolyai”, Cluj-Napoca, 2000.
8. D r ă g a n-B u l a r d a, M., B u l i e r i s-S i c o r a, P., S i c o r a, C., *Analiza microbiologică a apelor minerale din Staţiunea Bizuşa-Băi, Judeţul Sălaj,*”An.Univ.Oradea, Biol.”, **8**, 1998, 143-156.
9. M ă n e s c u, S., *Microbiologie sanitară,* Ed. Med., Bucureşti, 1989.
10. O t t o w, J. C. G., *Evolution of iron-reducing bacteria in soil and the physiological mechanism of iron reduction in* Aerobacter aerogenes,” Z. Allg. Mikrobiol.”, **8,** 1968, 441-443.
11. P r i c ă j a n, A., *Ape minerale şi termale din România,* Ed. Tehn., Bucureşti, 1975.
12. P r i c ă j a n, A., A i r i n e i, S., *Ape minerale de consum alimentar din România,* Ed. Ştiinţ. Encicloped., Bucureşti, 1979.
13. S t a r k e y, R.L., *Oxidation and reduction of sulfur compounds in soils,* ”Soil Sci.”, **101**, 1966, 298-300.
14. *** STAS, Apa - analiza bacteriologică, Nr. 3001, 1991.
15. S t o i c e s c u, C., *Farmacodinamia apelor minerale de cură internă din România,* Ed. Acad. Române, Bucureşti, 1984.
16. Ţ e p o s u, E., *Apele minerale din România,* ”Natura”, **26,** 1937, 244-257.

STUDIA UNIVERSITATIS BABEŞ-BOLYAI, BIOLOGIA, XLVIII, 2, 2003

INVESTIGAREA CARACTERELOR FENOTIPICE ASOCIATE CU POTENȚIALUL ENTEROTOXIGEN LA TULPINI DE *AEROMONAS* IZOLATE DIN SURSE INDIVIDUALE DE APĂ POTABILĂ NETRATATĂ

BRÎNDUŞA BOCOŞ*, DANIELA MOGA* şi ŞTEFAN ȚIGAN**

SUMMARY. – Investigation of Some Phenotypic Characteristics, Associated with the Enterotoxigenic Potential in Strains of A e r o m o n a s Isolated from Individual Untrated Drinking Water Supplies. In this study we investigated the presence of *Aeromonas* species in 27 individual untrated drinking water supplies, in which the water quality was found to be poor. Identification of 104 *Aeromonas* strains at species level showed that 85 strains (81.73%) were *A. hydrophila* HG1 and 6 strains (5.77%) were *A. caviae* HG5a. Other 13 *Aeromonas* strains (12.5%) could not be included in any of the 14 hybridisation groups currently recognised by their phenotype only. All the 104 isolates of *Aeromonas* species were tested for their enterotoxigenic potential. Our results showed that 48.1% of the *Aeromonas* strains investigated exhibited enterotoxigenicity - associated phenotype, due to their positive responses for the biochemical characteristics known to be strongly associated with enterotoxigenicity of aeromonads (β-haemolysis, acetoin production, lysine decarboxylation and sorbitol fermentation).

Aeromonadele sunt microorganisme ubicvitare în mediile acvatice naturale, dar sunt, de asemenea, întâlnite în produse alimentare (de origine animală şi vegetală) şi în intestinul uman, la subiecți cu diaree şi la subiecți aparent sănătoşi [1,10,13]. Se vorbeşte tot mai des despre circulația tulpinilor de *Aeromonas* între om şi factorii de mediu [1], dar dovezile despre originea hidrică, de pildă, a infecțiilor umane şi a contaminării alimentelor cu aeromonade, sunt controversate [14]. Faptul că aceste bacterii pot reprezenta cauza apariției multor infecții la om (bacteremii, meningite, infecții ale plăgilor, infecții pulmonare) este neîndoielnic [11], în timp ce rolul lor etiologic în boala diareică umană rămâne încă neclarificat, chiar dacă unii autori raportează asocieri semnificative [1].

Mecanismul enteropatogenității aeromonadelor nu este elucidat pe deplin, deşi capacitatea acestor organisme de a produce enterotoxine, hemolizine, citotoxine, asociate cu patogenitatea este binecunoscută [6,18]. Sunt menționate corelații pozitive între producerea de enterotoxină şi citotoxină şi anumite capacități biochimice, cum ar fi hemoliza eritrocitelor de iepure, producerea de acetoină (reacția Voges-Proskauer), decarboxilarea lizinei şi fermentarea sorbitolului [3,4,8,12,20].

* *Institutul de Sănătate Publică "Prof. Dr. Iuliu Moldovan", Str. L. Pasteur nr. 6, 3400 Cluj-Napoca, România. E-mail: inst@ispcj.ro*
** *Catedra de Informatică Medicală, UMF 3400 Cluj-Napoca, România*

Obiectivele propuse în studiul de faţă au fost: (i) izolarea şi identificarea aeromonadelor prezente în surse individuale de apă potabilă netratată şi (ii) investigarea caracterelor fenotipice care sunt asociate cu potenţialul lor enterotoxigen.

Materiale şi metode. Prezenţa bacteriilor din genul *Aeromonas* a fost determinată în 27 de probe de apă, recoltate din tot atâtea surse individuale de apă potabilă netratată (fântâni), necorespunzătoare din punct de vedere bacteriologic. Au fost izolate şi reţinute pentru analiză 104 colonii cu aspect caracteristic coloniilor de *Aeromonas*, pe diferite medii de cultură utilizate în cursul determinărilor privind calitatea igienico-sanitară a respectivelor surse de apă [2]. Pentru filtrarea probelor de apă au fost utilizate membrane Millipore cu diametrul porilor de 0,45 µm, iar mediile de cultură şi reactivii au fost de provenienţă Oxoid, Merck şi Sanofi.

Identificarea tulpinilor izolate s-a făcut prin utilizarea criteriilor propuse de P o p o f f [19]. Tulpinile izolate identificate ca fiind aeromonade au fost examinate pentru câteva dintre caracteristicile biochimice care sunt asociate cu producerea de enterotoxină/citotoxină, conform datelor din literatură [3,4,8,12,20]. Acestea sunt: β-hemoliza, producerea de acetoină (reacţia Voges-Proskauer), decarboxilarea lizinei şi fermentarea sorbitolului.

Rezultate şi discuţii. Toate cele 104 tulpini bacteriene izolate în studiul nostru au fost identificate ca specii mobile aparţinând genului *Aeromonas*. Capacităţile biochimice observate la 13 tulpini (12,5%) au evidenţiat însuşiri ce se regăsesc doar parţial în caracterizarea fenotipurilor din cadrul acestui gen [13,14] şi identificarea clară a speciilor la care aparţin sau a grupurilor de hibridare (HGs), în lipsa determinărilor genetice, nu a fost posibilă. În cazul celorlalte 91 de tulpini (87,5%), încadrarea în specie, prin utilizarea criteriilor biochimice, a putut fi realizată cu uşurinţă.

Distribuţia aeromonadelor în cele 27 de surse de apă investigate a fost următoarea: în probele de apă care au provenit din 20 de fântâni, au fost decelate tulpini aparţinând la câte o singură specie de *Aeromonas*; probele recoltate din celelalte 7 fântâni au conţinut două, trei sau mai multe specii de aeromonade.

În privinţa distribuţiei pe specii a tulpinilor de *Aeromonas* izolate în studiul nostru, rezultatele au arătat că 81,73% dintre acestea (85 de tulpini) au fost *A. hydrophila* HG1, 5,77% (6 tulpini) au fost *A. caviae* HG5a, iar 12,5% au fost aeromonade neidentificate la nivel de specie (Tabel 1).

Tabel 1

Speciile de *A e r o m o n a s* prezente în probele analizate

Mediul de izolare	Nr. de tulpini izolate	Nr. de tulpini de *A.hydrophila*	Nr. de tulpini de *A.caviae*	Nr. de tulpini neidentificate*
RYAN	67	53	5	9
TCBS	25	20	1	4
GEAM	12	12	0	0
TOTAL	104	85	6	13
(%)	(100)	(81,73)	(5,77)	(12,5)

* – Tulpini neidentificate, la nivel de specie, pe baza caracterelor biochimice.

Este de menționat că toate tulpinile izolate de pe mediul GEAM, din colonii lactozo-negative (colonii lipsite de interes din perspectiva evaluării bacteriologice curente a calității apelor potabile, tratate şi netratate – în etapa de confirmare a coliformilor totali, care constituie totodată etapa de prezumție în determinarea nivelului coliformilor fecali [21]), au fost identificate ca *A. hydrophila* HG1 – aeromonade aflate pe primul loc în "top-ul" patogenilor importanți ai genului. Această observație se constituie într-un argument suplimentar, dacă mai era nevoie, în sprijinul îndoielii pe care o exprimă unii specialişti, cu privire la eficiența utilizării bacteriilor coliforme ca parametri bacteriologici curenți ai calității apei [5,16]. Alți autori sunt de părere că, deoarece apa de băut netratată a fost deja identificată ca factor semnificativ de risc, în bolile asociate cu aeromonadele [15], prezența bacteriilor din acest gen ar trebui considerată indicator de condiții nesatisfăcătoare, în special în caracterizarea apei provenite din fântâni individuale, netratate sistematic prin metoda clorinării [17].

Bacteriile aparținând speciei *A. hydrophila* HG1 au fost prezente în 23 (85,2%) dintre cele 27 probe de apă analizate în acest studiu, fiind singurele aeromonade izolate în cazul a 17 dintre acestea. Tulpini identificate ca *A. caviae* HG5a au fost izolate din 4 probe (14,8%), dintre care în 2 probe au constituit singurii reprezentanți ai genului, iar aeromonadele neidentificate la nivel de specie au provenit din 7 probe de apă (25,9%), în care au fost prezente singular (în 2 probe), alături de *A. hydrophila* (în 4 probe), sau simultan cu *A.hydrophila* şi *A. caviae* (într-o singură probă de apă).

În urma examinării caracteristicilor biochimice asociate cu enterotoxicitatea, la cele 104 tulpini de *Aeromonas* izolate în studiul nostru (Tabel 2), s-a observat că procentele mari de răspunsuri pozitive, la testele cele mai semnificative (β-hemoliza, reacția VP, decarboxilarea lizinei şi fermentarea sorbitolului), au fost determinate mai ales de tulpinile încadrate în specia *A. hydrophila* HG1.

Tabel 2

Caracteristici biochimice asociate cu enterotoxicitatea, studiate la tulpinile de *A e r o m o n a s* izolate

Caracteristicile biochimice asociate cu enterotoxigenitatea	Tulpini izolate care au dat reacții pozitive:							
	Total	(104)	*A.hydrophila*	(85)	*A.caviae*	(6)	Neidentificate*	(13)
	nr.	%	nr.	%	nr.	%	nr.	%
β –Hemoliză**	90	86,5	79	92,9	0	0	11	84,6
Voges-Proskauer	82	78,8	74	87	0	0	8	61,5
Lizin-decarboxilază	98	94,2	85	100	0	0	13	100
Acid din sorbitol	59	56,7	52	61,2	0	0	7	53,8

* – Tulpini neidentificate, la nivel de specie, pe baza caracterelor biochimice.
** – Pe mediul agar-sânge cu eritrocite de oaie.

Unii autori sunt de părere că se poate vorbi despre o corelație pozitivă strânsă între citotoxicitatea tulpinilor de *Aeromonas hydrophila* şi reacția VP pozitivă [3,7]. Alți autori au corelat toxigenitatea tulpinilor de *Aeromonas* cu activitatea lizin-decarboxilazei şi cu fermentarea sorbitolului [7,8]. În sfârşit, după B u r k e şi colab. [4],

97% dintre tulpinile citotoxice de *Aeromonas* pot fi clasificate ca atare, fără rezervă, în funcţie de activitatea lor hemolitică. Precizăm că, în cazul tulpinilor de *Aeromonas hydrophila* izolate din apă potabilă, corelaţia găsită de H a n d f i e l d şi colab. [9] între însuşirile hemolitice şi citotoxicitatea acestor tulpini faţă de linia HT- 29 de celule intestinale umane a fost mai puternică decât în cazul aeromonadelor izolate din alimente.

În lumina acestor informaţii, dintre cele 104 tulpini de *Aeromonas* investigate în studiul de faţă, 48,1% (n=50) au dovedit proprietăţi fenotipice asociate cu potenţialul enterotoxigen al aeromonadelor, fiind capabile să producă acetoină (reacţia VP pozitivă), să determine β-hemoliză pe agar-sânge cu eritrocite de oaie, să decarboxileze lizina şi să fermenteze sorbitolul. Dintre acestea, 47 de tulpini au fost identificate ca fiind *A. hydrophila* HG1, iar 3 tulpini au făcut parte din grupul celor pentru care încadrarea în specie, după profilul biochimic, nu a fost posibilă. Toate tulpinile identificate ca fiind *A. caviae* HG5a au avut răspunsuri negative la cele patru teste menţionate mai sus (Tabel 3).

Tabel 3

Tulpini de *A e r o m o n a s* la care a fost pusă în evidenţă prezenţa simultană a patru dintre însuşirile fenotipice asociate puternic cu enterotoxigenitatea acestor bacterii

Tulpini izolate	Total (%)	A (%)	B (%)	C (%)
A. hydrophila	85 (100)	71 (83,5)	52 (61,2)	47 (55,3)
A. caviae	6 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Neidentificate*	13 (100)	7 (53,8)	7 (53,8)	3 (23,1)
Total	104 (100)	78 (75)	59 (56,7)	50 (48,1)

* – Tulpini neidentificate, la nivel de specie, pe baza caracterelor biochimice. A – Număr de tulpini pozitive pentru reacţia VP şi pentru β-hemoliză. B – Număr de tulpini pozitive pentru decarboxilarea lizinei şi pentru fermentarea sorbitolului. C – Număr de tulpini pozitive pentru caracteristicile biochimice menţionate la categoriile A şi B.

Concluzii. 1. Prezenţa bacteriilor din genul *Aeromonas* a fost pusă în evidenţă în toate cele 27 de surse individuale de apă potabilă netratată investigate, surse despre care analiza curentă de potabilitate a demonstrat că nu sunt corespunzătoare din punct de vedere bacteriologic.

2. Grupurile de hibridare la care aparţin aeromonadele identificate în studiul nostru sunt *Aeromonas hydrophila* HG1 şi *Aeromonas caviae* HG5a. Frecvenţa cea mai mare de izolare a fost observată în cazul bacteriilor aparţinând grupului *A. hydrophila* HG1, atât din punctul de vedere al numărului de tulpini izolate (81,7% din total), cât şi din cel al numărului de probe în care a fost decelată prezenţa lor (85,2%).

3. Însuşirile asociate cu potenţialul enterotoxigen la bacteriile din genul *Aeromonas* au fost puse în evidenţă la 48,1% din totalul tulpinilor izolate, marea lor majoritate fiind organisme încadrate în specia *A. hydrophila*. Toate cele 6 tulpini de *A. caviae* izolate în acest studiu au avut răspunsuri negative la testele asociate cu enteropatogenitatea aeromonadelor.

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

1. A l b e r t, J.M., A n s a r u z z a m a n, M., T a l u k d e r, K.A., C h o p r a, A.K., K u h n, I., R a h m a n, M., F a r u q u e, A.S.G., S a c k, B.R., M o l l b y, R., *Prevalence of enterotoxin genes in* Aeromonas *spp. isolated from children with diarrhea and the environment*, "J. Clin. Microbiol.", **38**, 2000, 3785-3790.
2. B o c o ş, B., M o g a, D., V l a d, M., Ţ i g a n, Ş., *Izolarea şi identificarea unor tulpini de* Aeromonas *spp. din ape de fântână*, "*Cluj. Med.*", 2003, sub tipar.
3. B u r k e, V., R o b i n s o n, J., A t k I n s o n, H.M., G r a c e y, M., *Biochemical characteristics of enterotoxigenic* Aeromonas *spp.*, "J. Clin. Microbiol.", **15**, 1982, 48-52.
4. B u r k e, V., R o b i n s o n, J., B e a m a n, J., G r a c e y, M., L e s m a n a, M., R o c k h i l l, R., E c h e v e r r i a, P., J a n d a, J.M., *Correlation of enterotoxicity with biotype in* Aeromonas *spp*., "J. Clin. Microbiol.", **18**, 1983, 1196-1200.
5. B u r k e, V., R o b i n s o n, J., G r a c e y, M., P e t e r s e n, D., P a r t r i d g e, P., *Isolation of* Aeromonas *spp. from a metropolitan water supply: seasonal correlation with clinical isolates*, "Appl. Environ. Microbiol.", **48**, 1984, 361-366.
6. C a h i l l, M., *A review: Virulence factors in* Aeromonas *species*, "J. Appl. Bacteriol.", **69**, 1990, 1-16.
7. C u m b e r b a t c h, N., G u r w i t h, M.J., S a c k s, R.B., B r u n t o n, J.L., *Cytotoxic enterotoxin produced by* Aeromonas hydrophila*: relationship of toxigenic isolates to diarrheal disease*, "Infect. Immun.", **23**, 1979, 829-837.
8. G o s l i n g, P.J., T u r n b u l l, P.C.B., L i g h t f o o t, N.F., P e t h e r, J.V.S., L e w i s, R.J., *Phenotypic characteristics of* Aeromonas *species as "markers" of enterotoxigenicity*, "Med. Microbiol. Lett.", **2**, 1993, 287-295.
9. H a n d f i e l d, M., S i m a r d, P., C o u i l l a r d, M., L e t a r t e, R., Aeromonas hydrophila *isolated from food and drinking water: haemoagglutination, haemolysis and cytotoxicity for a human intestinal cell-line (HT-29)*, "Appl. Environ. Microbiol.", **62**, 1996, 3459-3461.
10. H a n n i n e n, M.L., S a l m i, S., M a t t i l a, L., T a i p a l i n e n, R., S i i t o n e n, A., *Association of* Aeromonas *species with travellers' diarrhoea in Finland*, "J. Med. Microbiol.", **42**, 1995, 26-31.
11. J a n d a, J.M., A b b o t t, S.L., *Evolving concepts regarding the genus* Aeromonas*: an expanding panorama of species, disease presentations, and unanswered questions*, "Clin. Infect. Dis.", **27**, 1998, 332-344.
12. J a n d a, J.M., B o t t o n e, E.J., S k i n n e r, C.V., C a l c a t e r r a, D., *Phenotypic markers associated with gastrointestinal* Aeromonas hydrophila *isolates from symptomatic children*, "J. Clin. Microbiol.", **17**, 1983, 588-591.
13. J o s e p h, S.W., C a r n a h a n, A., *The isolation, identification, and systematics of the motile* Aeromonas *species*, "Ann. Rev. Fish Dis.", **4**, 1994, 315-343.
14. J o s e p h, S.W., C a r n a h a n, A.M., *Update on the genus* Aeromonas, "Amer. Soc. Microbiol. News", **66**, 2000, 218-223.
15. K i r o v, S.M., Aeromonas *and* Plesiomonas *species*, în D o y l e, M.P., B e u c h a t, L.R., M o n t v i l l e, T.J. (Eds.), *Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers*, p. 265-287, ASM Press, Washington, DC, 1997.

16. L e C h e v a l i e r, M.W., E v a n s, T.M., S e i d l e r, R.J., D a i l y, O.P., M e r e l l, B.R., R o l l i n s, D.M., J o s e p h, S.W., Aeromonas sobria *in chlorinated drinking water supplies*, "Microb. Ecol.", **8**, 1982, 325-333.
17. M a s s a, S., A l t i e r i , C., D'A n g e l a, A., *The occurrence of* Aeromonas *spp. in natural mineral water and well water*, "Int. J. Food Microbiol.", **63**, 2001, 169-173.
18. P e m b e r t o n, J.M., K i d d, S.P., S c h m i d t, R., *Secreted enzymes of* Aeromonas. *Review*, "FEMS Microbiol. Lett.", **152**, 1997, 1-10.
19. P o p o f f, M., *Genus* Aeromonas, în K r i e g, N.R., H o l t, J.G. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 8th ed., **I**, 545-548, Williams and Wilkins, Baltimore, MD, 1984.
20. T u r n b u l l, P.C.B., L e e, J.V., M I l o t I s, M.D., V a n D e W a l l e, S., K o o r n h o f, H.J., J e f f e r y, L., B r y a n t, T.N., *Enterotoxin production in relation to taxonomic grouping and source of isolation of* Aeromonas *species*, "J. Clin. Microbiol.", **19**, 1984, 175-180.
21. *** STAS, *Apa. Analiză bacteriologică*, Nr. 3001, 1991.

RECENZII - BOOK REVIEWS

Ethiopian Rift Valley Lakes, edited by C. Tudorancea and W. D. Taylor, Backhuys Publishers, Leiden, the Netherlands, 2002, 289 pages with 27 tables and 35 figures in the text.

The book is included in "Biology of Inland Waters" series, initiated by Dr. K. Martens (The Royal Belgian Institute of Natural Sciences, Freshwater Biology, Brussels). The topic of this book represents one of the priorities of biological research, dealing with biodiversity of several Ethiopian Rift Valley lakes. All issues are considered within the framework of sustainable development.

Due to its content, the book fulfils several actual requirements of the limnological field. Thus, it completes the studies made in the Ethiopian Rift Valley, providing new data on the Northern lakes, less studied in previous papers. This study was possible due to some major research projects that took place between 1980 and 1997, coordinated by the universities in Waterloo, Ontario, Canada and Addis Abeba, Ethiopia. Several researchers, specialists in different fields, coming from three continents (Europe, North America and Africa) were involved in this study.

The editors, Professor C. Tudorancea (Department of Ecology-Genetics, Faculty of Biology and Geology, Babes-Bolyai University) and Professor W.D. Taylor, both are world-wide known limnologists. They made a huge effort to synthesise the results, in spite of the fact that the specific subjects of the chapters were presented by different authors or group of authors.

The book consists of eleven chapters, accompanied by the foreword written by the honoured Professor H.B.N. Hynes (Waterloo University, Canada). The book also includes a subject index and an index of taxa. Each of the eleven chapters contains a substantial and updated bibliography.

In the following we present the author(s) and titles of the chapters: Chapter 1: C. Tudorancea and W.D. Taylor, *Introduction*; Chapter 2: G. Wolde Gabriel, *The Main Ethiopian Rift System: an overview on volcanic, tectonic, rifting and sedimentation processes*; Chapter 3: R.M. Baxter, *Lake morphology and chemistry*; Chapter 4: Elizabeth Kebede, *Phytoplankton distribution in lakes of the Ethiopian Rift Valley*; Chapter 5: W.D. Taylor, Elizabeth Kebede and Zinabu Gebre-Mariam, *Primary and secondary production in the pelagic zone of Ethiopian Rift Valley lakes*; Chapter 6: C. Tudorancea, *Zoobenthic and weed-bed faunas;* Chapter 7: Eyualem Abebe, *Free-living aquatic nematodes of the Ethiopian Rift Valley*; Chapter 8: A.D. Harrison, *A general view on the communities of the Chironomidae adults in the Ethiopian Rift Valley lakes*; Chapter 9: K. Martens, *Ostracoda in the Ziway-Shala-Awasa Basins*; Chapter 10: A.S. Golubtsov, Yu.Yu. Dgebuadze and M.V. Mina, *Fishes of the Ethiopian Rift Valley;* Chapter 11: Zinabu Gebre-Mariam, *The Ethiopian Rift Valley lakes: major threats and strategies for conservation*.

The authors followed the two main objectives of sustainable development: the study of aquatic community structure and functions, correlated to ecological factors in the considered lakes. This study had a double purpose: on the one hand, protection and conservation of the lakes, and on the other hand, the use of some natural reserves by local populations. Other important aspects were also considered, for example the main human impacts on aquatic environments.

They were caused by fast increases in inhabitants' number from the study area, together with accelerated urbanisation and the development of industry and agriculture. The lack not only of integrated monitoring programs, but also of clear strategies concerning the management of water resources enhanced human impacts on the study area. Water resources have an extraordinary importance, being vital not only to the local populations, but also to the wild life. Thus, problems related to the management of water resources are also taken into consideration, in accordance with environmental legislation and its gaps. Another important issue was the local populations' education for a better understanding of the existing environmental problems.

Because of the issues discussed, the book represents a useful tool not only for specialists, but also for teachers and students. The book also provides valuable information for scientists that work in the integrated management of water resources, as well as for those who elaborate and improve the environmental legislation and the strategies of natural resources, sustainable use of the aquatic ecosystems. The subjects of the book represent a valuable basis for future limnological studies of lakes in Africa or in any part of the world.

LAURA MOMEU