

ROMANIAN ACADEMY  
INSTITUTE OF BIOLOGY



# THE NOVEL RESULTS OF THE INSTITUTE OF BIOLOGY BUCHAREST INTO FIELDS OF ECOLOGY, MICROBIOLOGY AND CITOBIOLOGY







Academia Română  
Institutul de Biologie București



# THE NOVEL RESULTS OF THE INSTITUTE OF BIOLOGY BUCHAREST INTO FIELDS OF ECOLOGY, MICROBIOLOGY AND CITOBIOLOGY

The book is dedicated to 58<sup>th</sup> Annual Scientific Session  
of the Institute of Biology Bucharest

Descrierea CIP a Bibliotecii Naționale a României  
ACADEMIA ROMÂNĂ (București) . Institutul de Biologie

The novel results of the Institute of Biology Bucharest into fields of ecology, microbiology and cytobiology / Academia Română. Institutul de Biologie București. - București : Ars Docendi, 2018

Conține bibliografie

ISBN 978-606-998-044-6

57

**Editori:**

*Mădălin Enache*

*Roxana-Lucia Cojoc*

*Simona-Elena Neagu*

*Marian Constantin*

*Robert-Marian Ruginescu*

**Tehnoredactare și copertă:**

*Marian Constantin*

**Comitetul Științific:**

*Acad. Octavian Popescu* – Univ. Babeș-Bolyai, Cluj-Napoca

*Dr. Dumitru Murariu* – m.c. al Academiei Române, director IBB

*Dr. Anca Manole* – secretar științific IBB

*Dr. Mădălin Enache* – șef Departament Microbiologie, IBB

*Dr. Sorin Ștefănuț* – șef Departament de Ecologie, Taxonomie și Conservarea Naturii, IBB

**Comitetul de organizare:**

*Dr. Mădălin Enache* – șef Departament Microbiologie, IBB

*Dr. Marian Constantin*, IBB

*Drd. Robert-Marian Ruginescu*, IBB

*Dr. Roxana-Lucia Cojoc*, IBB

*Drd. Simona-Elena Neagu*, IBB

*Dr. Sorin Ștefănuț* – șef Departament de Ecologie, Taxonomie și Conservarea Naturii, IBB

*Dr. Anca Manole* – secretar științific IBB

*Maricica Ciocanaru*, IBB

**Copyright:** Institutul de Biologie București

Tipărit la Institutul de Biologie București

**Imaginile de pe coperti reprezintă:**

**Coperta I:** clădirea Institutului de Biologie București (sus) și sediul Staționarului de cercetări ecologice din Sulina (jos);

**Coperta a IV-a:** *Dianthus compactus*, pâ râul Doftana, *Chrysolina fastuosa* (pe rândul de sus), Automobilul de teren ARO, aflat, mult timp, în slujba cercetătorilor Institutului, *Cantharellus cibarius* (pe rândul din mijloc), Lacul Roșu, de pe râul Bicaz, și *Polytrichum* sp. (pe rândul de jos).

# CUPRINS

Prefață .....	6
ARTICOLE <i>IN EXTENSO</i> .....	6
Biologia sintetică a plantelor - un domeniu nou cu perspective generoase, <i>Anca Manole</i> .....	7
Specific effects of viral infection in tomato progenies obtained from plants infected with viruses, <i>Andronic L., Marii L., Smerea S., Schin V.</i> .....	14
Ferobacterii identificate în structura și instalațiile construcțiilor hidroenergetice, <i>Mădălin Enache, Simona Neagu, Roxana Cojoc, Mirela Moldoveanu, Larisa Florescu,</i> <i>Ioan Păceșilă, Robert Ruginescu, Ioana Gomoiu</i> .....	22
Increasing denitrification capacity of microbial populations, to be further used in ras, by selective cultivation, <i>C. Moisescu, M. Jordan, M. Cîrnu, I.I. Ardelean</i> .....	42
Ecological assessment of a peri-urban lake using physicochemical factors and zooplankton communities, <i>Larisa Florescu, Laura Parpală, Victor Zinevici, Mirela Moldoveanu</i> .....	46
Aspartate transcarbamoylase obtained from a psychrophilic bacterium ( <i>Rugamonas sp.</i> ) isolated from an Antarctic lake, <i>Victoria I. Păun, Georgiana Necula-Petrăreanu,</i> <i>Antonio Mondini, Cristina Purcărea</i> .....	61
Monitoring of the <i>Callimorpha (Euplagia) quadripunctaria</i> (Poda, 1761) (Insecta: Lepidoptera) in the Măcin Mountains National Park (Romania), <i>Minodora Manu, Nicolae Lotrean,</i> <i>Marilena Onete, Roxana Nicoară, Florian Bodescu</i> .....	73
REZUMATE – <i>LIMBA ROMÂNĂ</i> –.....	99
Izolarea și caracterizarea unei tulpini bacteriene cu potențial biotehologic, <i>Mihaela Marilena Stancu</i> .....	100
Tribul Chrysomelini (Coleoptera: Chrysomelidae) în România, <i>Sanda Maican, Rodica Serafim</i> .....	102
Crioconservarea unor apexuri nodale de la specia <i>Marsilea quadrifolia</i> L. cultivate <i>in vitro</i> , <i>Cristian Banciu, Gabriel Maria, Mihnea Vladimirescu, Ioana Paica, Anca Manole</i> .....	104
Dinamica răspândirii ambroziei ( <i>Ambrosia artemisiifolia</i> L.), specie invazivă, în vegetația Cocorei (județul Ialomița), între anii 2010–2018, <i>Marian Constantin</i> .....	105
REZUMATE – <i>ENGLISH</i> –.....	106
A molecular investigation of polymorphism in tomato progenies of virus infected plants, <i>Andronic Larisa, Smerea Svetlana, Grajdieru Cristina</i> .....	107
Effects of vineyard management on surface communities of Collembola, <i>Cristina Fiera, Werner Ulrich, Daniela Popescu, Claudiu-Ioan Bunea, Johann Zaller</i> .....	109
Determination of antioxidant activity of <i>Cnicus benedictus</i> <i>in vivo</i> and <i>in vitro</i> , <i>Catană Rodica, Helepciuc Florenta, Zamfir Medana, Mitoi Monica</i> .....	110
Effect of gamma irradiation on intracellular ROS concentration in <i>Chlorella sorokiniana</i> , <i>C. Moisescu, D.Neguț, I.I. Ardelean</i> .....	111
The role of microorganisms and invertebrates in the trophic network of industrial pollutants ecosystems from Oltenia, <i>Carmen Mădălina Cismașiu, Olivia Cioboiu</i> .....	112
<i>In vitro</i> plant tissue cultures for <i>ex situ</i> conservation and biotechnological exploitation of the secondary metabolites, <i>Holobiuc I., Mitoi M., Maximilian C, Catană R., Helepciuc F., Cogălniceanu G</i> .....	114
Cold-active proteins from psychrophilic microorganisms, <i>Antonio Mondini, Cristina Purcărea</i> .....	116

<i>Lactobacillus helveticus</i> RFF 34.9 isolated from home-made fermented milk– characterization and evaluation of the bio- and nano-technological potential, Iulia-Roxana Stefan, Silvia-Simona Grosu-Tudor, Roxana Cojoc, Medana Zamfir.....	118
<b>DEPARTAMENTUL DE MICROBIOLOGIE.....</b>	<b>119</b>
<b>Prezentare generală .....</b>	<b>120</b>
Mădălin Iancu Enache .....	123
Cristina Purcărea .....	124
Medana Zamfir .....	125
Mugur Cristian Ștefănescu .....	126
Mihaela Marilena Stancu .....	127
Gabriela Teodosiu .....	128
Silvia Simona Grosu-Tudor .....	129
Lavinia Iancu .....	130
Georgiana Necula-Petrăreanu .....	131
Doina Maria Cîrstea .....	132
Cristina Moisescu .....	133
Lucia Roxana Cojoc.....	134
Elena-Simona Neagu .....	135
Marian Constantin.....	136
Iulia Roxana Ștefan .....	137
Anca Ioana Lucaci.....	138
Victoria Ioana Păun .....	139
Robert Marian Ruginescu.....	140
Ioan I. Ardelean.....	141
Carmen Mădălina Cismașiu.....	142
<b>DEPARTAMENTUL DE ECOLOGIE, TAXONOMIE ȘI CONSERVAREA NATURII.....</b>	<b>143</b>
<b>Prezentare generală .....</b>	<b>144</b>
Sorin Ștefănuț.....	146
Cristina Fiera .....	147
Sanda Maican.....	148
Kinga Öllerer .....	149
Minodora Manu .....	150
Mihaela Constanța Ion .....	151
Gabriela Tamas .....	152
Mirela Mădălina Moldoveanu.....	153
Larisa Isabela Florescu .....	154
Ioana Cătălina Paica .....	155
<b>DEPARTAMENTUL DE CITOBIOLOGIE VEGETALĂ ȘI ANIMALĂ.....</b>	<b>156</b>
<b>Prezentare generală .....</b>	<b>157</b>
Anca Manole .....	159
Rodica Daniela Catană .....	160
Carmen Maximilian .....	161
Holobiuc Irina .....	162
Elena Monica Mitoi .....	163
Cristian Banciu .....	164
Ana-Maria Moroșanu .....	165
Florența Elena Helepțiu .....	166
Gabriel-Mihai Maria .....	167
Mihnea Vladimirescu .....	168

# PREFAȚĂ

Volumul de lucrări și rezumate denumit „*The novel results of the Institute of Biology Bucharest into fields of ecology, microbiology and citobiology*“ cuprinde materialele suținute în cadrul conferinței științifice anuale a Institutului de Biologie București al Academiei Române (IBB). În acest an, această acțiune științifică a ajuns la ediția a 58-a, marcând, astfel, importanța cercetărilor biologice, mai ales în ariile microbiologiei generale, ecologiei și citobiologiei, pentru dezvoltarea cunoașterii în domeniu, dar și pentru valențele de colaborare cu alte discipline, precum chimia, fizica, matematica, arta etc.

Volumul cuprinde lucrări bazate pe rezultatele cercetărilor și studiilor efectuate de cercetătorii din cadrul IBB, dar și de colaboratori ai acestora, în cadrul unor proiecte de cercetare care se circumscriu obiectului de activitate al IBB, respectiv ocrotirea și managementul biodiversității, bioremedierea, microorganisme din medii extreme și ostile, crearea unei bănci de celule și de țesuturi vegetale de interes conservativ și biotehnologic.

Sesiunea științifică anuală, precum și valorificarea, prin acest volum, a lucrărilor prezentate în cadrul său, contribuie la dezvoltarea capacității de comunicare și a dialogului științific, pentru toți participanții la lucrările acesteia, dar, în mod deosebit, pentru tinerii cercetători, care se află în pragul carierei profesionale. Fiind orientată spre dezvoltarea cunoașterii, cercetarea biologică, prin rezultatele valorificate în cadrul lucrărilor acestei Sesiuni științifice a IBB și pe alte căi de diseminare, contribuie la întărirea relației și a dialogului dintre știință și societate, dar și la consolidarea colaborării dintre specialiștii implicați în această activitate.

*Dr. Mădălin Enache*

**ARTICOLE**  
***IN EXTENSO***



Institutul de Biologie București al Academiei Române, Splaiul Independenței nr. 296, sector 6, București, România, e-mail: anca.manole@ibiol.ro

## INTRODUCERE

Schimbările climatice și creșterea accelerată a populației globului pe fondul epuizării resurselor naturale sunt considerate problemele acute contemporane care direcționează în prezent preocupările cercetărilor din diverse sfere de activitate. În acest context, biologia sintetică - domeniu de vârf al cercetărilor interdisciplinare - poate oferi soluții eficiente și pe termen lung.

Biologia sintetică este o disciplină derivată în care își unesc eforturile oameni de știință din multiple domenii pentru proiectarea și producerea de structuri biologice noi sau modificarea unora deja existente, cu aplicații în medicină, agricultură, industria alimentară, protecția mediului, inteligență artificială, producerea de biocombustibili, robotică, artă, etc. (Fig. 1). Prin metode noi, specifice biologiei sintetice se preconizează producerea de hrană, energie, medicamente, etc., reducându-se astfel presiunea pe care populația globală în creștere o exercită asupra mediului și a resurselor naturale.

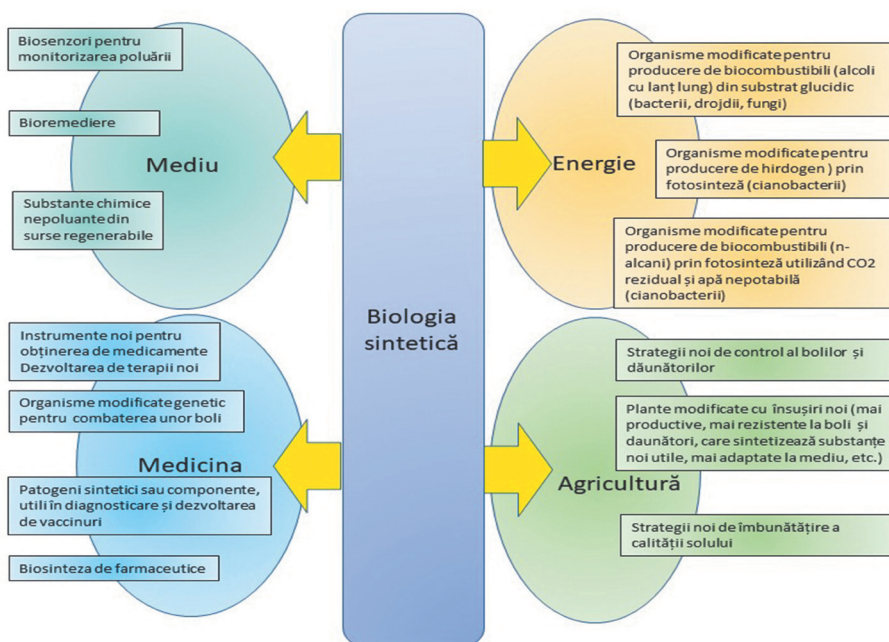


Fig.1. Aplicațiile Biologiei sintetice.

În același timp biologia sintetică nu este doar un mijloc de a crea sisteme biologice cu funcții care să răspundă diverselor necesități ale omului ci oferă și perspective noi de abordare a unor problematice specifice cercetării fundamentale și poate contribui semnificativ la descifrarea organizării și funcțiilor sistemelor biologice.

Principalele direcții de cercetare ale biologiei sintetice sunt:

- Ingineria circuitelor biologice bazate pe funcționarea ADN-ului incluzând și părți biologice, dar fără a se limita doar la acestea;
- Definitivarea unui genom minimal;
- Construirea de protocelule;
- Crearea de sisteme biologice ortogonale pornind de la molecule care nu există în natură (de exemplu crearea unui lanț de ADN care nu are baze azotate de tip ATCG, așa-numiții acizi xenonucleici) (Schmidt et al., 2008).

Termenul de *biologie sintetică* a fost introdus în literatura științifică încă din secolul trecut de către biologul francez Stéphane Leduc și definit ca știința prin care viața poate fi generată manipulând forțele fizice care o determină (Leduc, 1912). Deși definiția inițială a fost demult invalidată, termenul s-a păstrat și a dobândit semnificații noi, foarte diverse și în continuă dezvoltare.

Dezvoltarea biologiei sintetice a debutat practic în anul 1953 prin elucidarea structurii acidului dezoxiribonucleic (ADN) de către cercetătorii James Watson și Francis Crick fapt care a deschis era manipulărilor genetice. Anii '70 au fost marcați de obținerea ADN-ului recombinat iar progresele tehnice din anii '80 și '90 au permis secvențializarea de genomuri complete. Dezvoltarea tehnologiilor IT și utilizarea acestora în stocarea, gestionarea, interpretarea și transmiterea datelor au permis progrese remarcabile; procese care acum zece ani durau săptămâni, în prezent se derulează în doar câteva minute. Programe elaborate de redare tridimensională, de modelare și prelucrare a imaginilor permit vizualizarea în timp real a unor procese complexe, de la reproducerea bacteriilor până la activitatea nanoparticulelor. În prezent, se poate proiecta informație genetică pentru a determina o anumită funcție, se poate testa această funcție *in silico* utilizând modelarea pe computer, se poate comanda la o firmă specializată materialul genetic proiectat și apoi se poate insera într-un organism viu. Cu cât se aprofundează cunoașterea proceselor biologice naturale cu atât se va lărgi și orizontul de posibilități pentru a le manipula și a obține sisteme biologice noi cu însușiri care nu există la cele naturale și care sunt utile, de exemplu, în dezvoltarea de noi terapii, în controlul poluării sau în crearea de surse noi de energie curată.

Deși în prezent biologia sintetică s-a dezvoltat în multe centre de cercetare sau universități de prestigiu din întreaga lume, Statele Unite ale Americii sunt considerate lideri mondiali ai cercetărilor în domeniu (Oldham et al, 2012). În anul 2000 două echipe de cercetare din SUA au raportat crearea unor circuite genice sintetice care funcționează în sisteme biologice în mod analog oscilatoarelor și comutatoarelor din circuitele electrice (Elowitz și Leibler, 2000; Gardner et al., 2000). Aceaste realizări de pionierat au marcat debutul biologiei sintetice moderne. Anual în SUA sunt investiți în medie 140 milioane dolari (U.S. National Research Council report, 2013) în cercetări de biologie sintetică, direcționate în funcție de orientarea și obiectivele instituției finanțatoare. De exemplu, *National Science Foundation* (NSF) investește în crearea de sisteme biologice noi și dezvoltarea unei industrii bazate pe biologia sintetică, *Department of Energy* (DOE) în ingineria vegetală și microbiană și în dezvoltarea de sisteme hibride pentru producerea de biocombustibili și alte produse biologice, *Department of Health and Human Services* (NIH) în dezvoltarea de noi terapii și produse cu aplicații medicale, în

timp ce *Department of Defence* (DOD) consideră biologia sintetică un domeniu prioritar de cercetare cu impact major în industria de apărare, incluzând detectarea inteligență, materiale noi și medicină (Si și Zhao, 2016).

Peste tot în lume s-au dezvoltat companii care produc bunuri și servicii utilizând tehnologiile noi, emergente ale biologiei sintetice. De exemplu, se produc parfumuri, substanțe odorizante, detergenți, etc., cu ajutorul unor enzime modificate utilizând materii prime mult mai ieftine, se produc vaccinuri utilizând tulpini bacteriene modificate, se testează deja soluții ecologice pentru controlul insectelor dănuătoare pentru culturile agricole dar și a celor care transmit diverse boli ca Febra Denque și virusul Zika, se dezvoltă biosenzori pentru îmbunătățirea unor procese biologice sau pentru diagnosticare. Toate aceste aplicații fac din biologia sintetică o adevărată platformă tehnologică care susține dezvoltarea Bioeconomiei (Fig.2). În prezent, sunt comercializate mii de produse ca rezultate ale aplicării tehnologiilor biologiei sintetice ceea ce a creat o adevărată piață globală, care până la finalul anului 2018 se estimează că va depăși 16 miliarde de dolari (U.S. National Research Council report, 2013).

## BIOLOGIA SINTETICĂ A PLANTELOR - REALIZĂRI ȘI PERSPECTIVE

Biologia sintetică a plantelor utilizează plantele ca platforme de lucru pentru producerea de sisteme autosustenabile și/sau bio-produse noi și pentru îmbunătățirea calităților speciilor

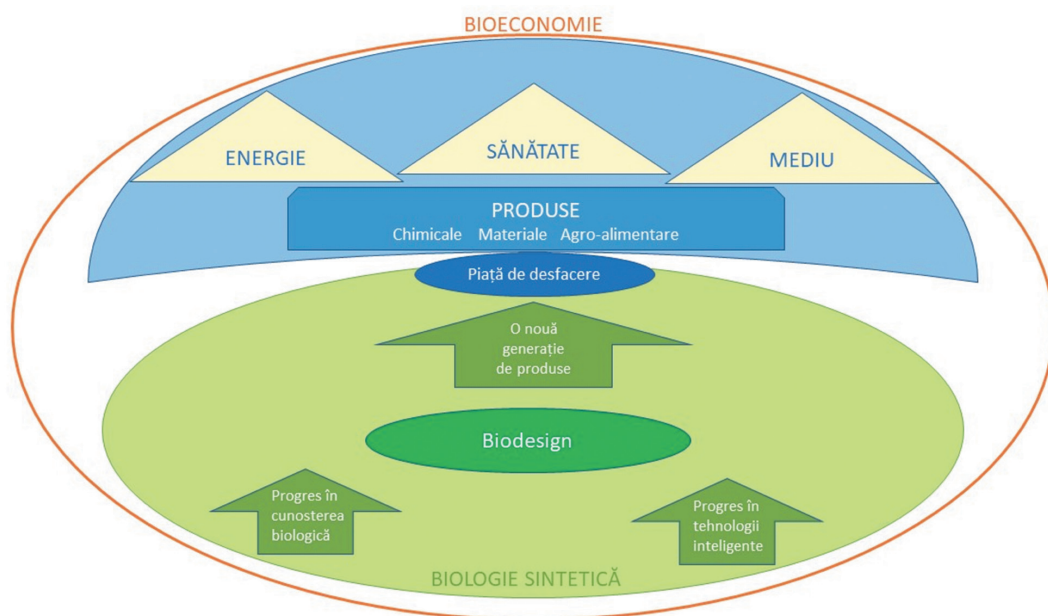


Fig.2. Biologia sintetică ca platformă tehnologică pentru susținerea Bioeconomiei (Adaptat după *UK Synthetic Biology Strategic Plan 2016*).

de cultivate în mod tradițional. Modulele de proiectare utilizate folosesc principiile ingineriei (Fig.3). Ca modele experimentale plantele prezintă o serie de avantaje cum ar fi imobilitatea, un ciclu de viață relativ scurt, exprimă multiple mecanisme reparatorii și de regenerare, au căi metabolice perfecționate și foarte eficiente de producere a substanțelor bioactive și nu în ultimul rând, nu sunt supuse la fel de riguros problemelor de etică ce limitează cercetările pe celule animale. Modelul experimental cel mai des utilizat până în prezent este specia *Arabidopsis*

*thaliana*. Deși a fost utilizată cu succes este un model mult mai complex decât cele preferate în cercetările de biologie sintetică, cum este de exemplu *Saccharomyces cerevisiae*. Pentru a preîntâmpina acest neajuns a fost propusă ca plantă model pentru cercetările de biologie sintetică la plante, specia de briofit *Marchantia polymorpha* care are o arhitectură genomică simplificată și redundanță genetică redusă (Cook et al., 2014).

În prezent, sunt disponibile o serie de instrumente informatice pentru biologia sintetică a plantelor precum și un limbaj informatic specific - *Synthetic Biology Open Language* (SBOL), mijloace care facilitează progresele cercetărilor în domeniu. Abordări care păreau foarte îndrăznețe acum zece ani și aproape imposibil de realizat, în prezent sunt reconsiderate înregistrând succese remarcabile, cum ar fi de exemplu obținerea de cereale fixatoare de azot (Rogers

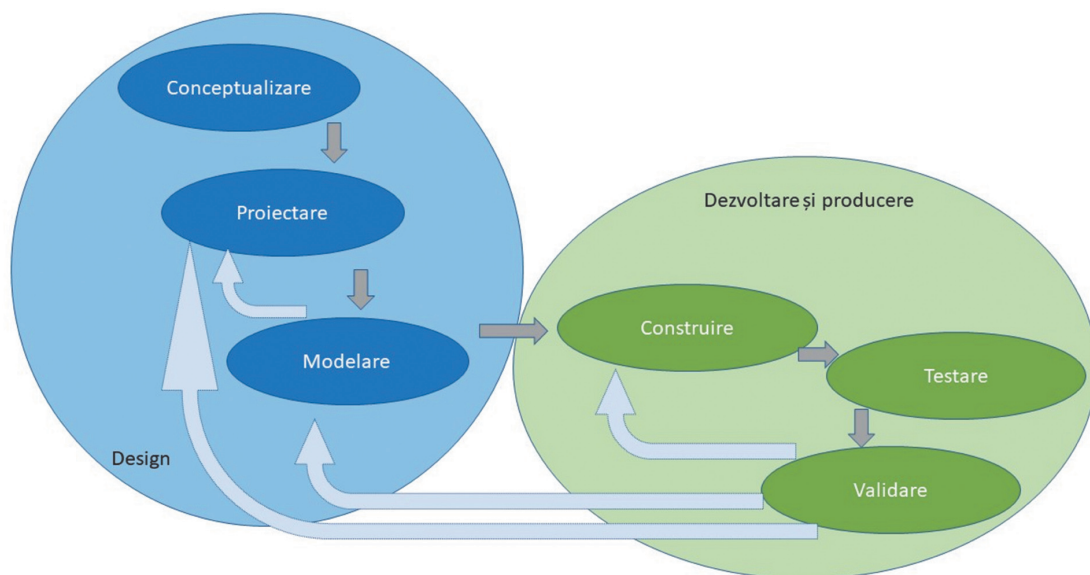


Fig.3. Modul de proiectare utilizat în biologia sintetică a plantelor (adaptat după Liu și Stewart, 2015).

și Oldroyd, 2014). Un alt exemplu de progres îl constituie obținerea de plante "santinela" care conțin un modul sintetic care funcționează ca biosenzor - planta se decolorează în prezența unor anumite molecule și își redevine verde în absența acestora în decurs de numai două ore (Antunes et al., 2006). De asemenea, prin inserarea de nanotuburi de carbon s-au obținut rezultate promițătoare în direcția creării de plante bionice ca biosenzori care să detecteze în timp real poluarea ambientală, pesticidele sau expunerea la microorganisme. De exemplu, inserarea în mezofilul frunzelor de spanac (*Spinacia oleracea* L.) de nanosenzori fluorescenți (nanotuburi de carbon conjugate cu peptida Bombolitina II pentru recunoașterea substanțelor amomate prin emisii fluorescente) ar permite monitorizarea în timp real a prezenței unor substanțe explozibile (Wong et al., 2018).

O altă direcție de succes în domeniul biologiei sintetice a plantelor o constituie dezvoltarea de căi metabolice artificiale pentru producerea pe scară largă unor metaboliți valoroși care sunt dificil de obținut în mod natural sau sunt prea costisitor de produs prin sinteză chimică sau biotehnologie vegetală convențională. De exemplu, artemisinina, o sescviterpenă cu puternic

efect anti-malarie, este produsă în mod natural de pelin (*Artemisia annua* L.) dar în cantități reduse ceea ce face nerentabilă exploatarea din surse naturale; în plus, din cauza structurii chimice complexe este dificil de obținut prin sinteză chimică. Prin dezvoltarea unei căi metabolice artificiale și implementarea acesteia în *Saccharomyces cerevisiae* se pot obține cantități de 500 de ori mai mari de acid artemisinic decât în mod natural (Paddon et al., 2013). În mod asemănător, prin exprimarea țesut-specifică a unei căi metabolice sintetice care conține trei gene provenite de la o specie de *Erwinia* s-au obținut plante de cartof care produc tuberculi cu un conținut de 20 de ori mai mare de carotenoizi și aproximativ 3600 de ori mai mare de beta-caroten (Diretto et al., 2007). De asemenea, a fost reconstituită o cale metabolică de sinteză a unor alkaloidi benzil-chinolinici (BIAs) reglată de 10 gene, care a fost inserată și este funcțională la tulpini de *Saccharomyces cerevisiae*, realizare care a deschis calea pentru producerea de alcaloizi valoroși în sisteme microbiene (Fossati et al., 2014).

De asemenea, mijloacele biologiei sintetice permit identificarea de gene care codifică sinteza de metaboliți secundari valoroși dar care nu se exprimă în planta gazdă. Principalele categorii de metaboliți secundari produși în plante cu proprietăți terapeutice sunt: alcaloizii, terpenele, peptidile non-ribozomale și polichetidele. Biosinteza acestor substanțe este reglată de activitatea unor clase de gene, de obicei grupate în cadrul genomului ceea ce facilitează dezvoltarea de mijloace de identificare, analiză și prognoză computerizată, cum este de exemplu "antiSMASH" (Weber et al., 2015). Deoarece majoritatea medicamentelor au fost sintetizate pornind de la compuși naturali, identificarea prin aceste mijloace de noi produși naturali cu valoare terapeutică deschide o perspectivă generoasă de dezvoltare a unor noi produse terapeutice (Awan et al., 2016).

În perspectivă, una dintre cele mai mari provocări ale biologiei sintetice este construirea *de novo* a unor genomuri complete. În acest sens, se disting realizările de pionierat ale echipei conduse de cercetătorul american John Craig Venter care a raportat încă din anul 2010 proiectarea, sinteza și asamblarea unui genom de 1.08 Mb, pornind de la secvențe genomice digitizate, și transferul acestuia într-o celulă de *Mycoplasma capricolum*, obținându-se astfel primul organism viu controlat în întregime de un cromozom sintetic (Gibson et al., 2010). Această realizare remarcabilă a condus, între altele, și la conturarea principiilor care stau la baza proiectării genomurilor sintetice (Liu și Stewart, 2015). Aceste principii sunt:

- genomul sintetic trebuie să determine un fenotip apropiat de cel natural
- nu trebuie să conțină elemente destabilizatoare (transpozoni sau gene ARN-t)
- trebuie să aibă flexibilitate genetică pentru studii ulterioare

Construirea unui genom în întregime artificial funcțional la plante este o provocare extrem de dificilă cu atât mai greu de atins cu cât încă se cunosc puține despre setul minim de gene necesar funcționării unui genom minimal. De asemenea, inserarea acestui genom într-o gazdă este o provocare la fel de dificilă. Progresele realizate în acest sens, de exemplu în crearea cloroplastelor sintetice, sunt încurajatoare (Akapakis et al., 2011).

## IMPLICAȚII PRIVIND ETICA ȘI BIOSECURITATEA CERCETĂRIILOR

Unul dintre dezideratele biologiei sintetice este să facă ingineria biologică mai accesibilă și mai previzibilă. Însă cu cât ne apropiem de această țintă cu atât crește și îngrijorarea privind pericolul dublei utilizari; pe de o parte utilizarea produselor cercetării pentru progre-

sul umanității, și pe de altă parte utilizarea în scopuri teroriste. De exemplu, accesul liber la secvențele ADN aparținând unor patogeni, reducerea prețului pentru serviciile de sinteză a ADN-ului combinată cu posibilitatea manipulării materialului biologic de către persoane mai puțin calificate din afara laboratoarelor de cercetare, fac accesibile mijloacele și produsele biologiei sintetice și persoanelor rău intenționate. În același timp, dezvoltarea comunității de biologi ”Fă-o singur” (do-it-yourself - DIYbio) alimentează această îngrijorare deoarece oferă oricui este interesat informații și mijloace specifice biologiei moleculare (Jefferson et al., 2014). Grupul European de Etică în Știință și Tehnologii Noi din cadrul Comisiei Europene a subliniat încă din anul 2009 că ”Problemele de etică apar în mod particular din pericolul utilizării de patogeni sintetici letali sau virulenți pentru atacuri teroriste, război biologic sau în scopuri dăunătoare, cu atât mai mult cu cât este liber accesul la informațiile privind modul de producere a acestor patogeni”.

Cu toate acestea înainte de luarea de măsuri restrictive se impune o analiză nuanțată și foarte atentă a beneficiilor pe care produsele biologiei sintetice le poate aduce în contrast cu potențialele riscuri (Benner și Sismour, 2005).

## CONCLUZII

Implementarea soluțiilor dezvoltate prin mijloacele biologiei sintetice poate aduce beneficii semnificative pentru societate, economie și mediu. Alăturându-se progreselor informaticii cuantice și tehnologiei digitale, biologia sistetică marchează debutul celei de-a patra revoluții tehnologice care promite să îmbunătățească semnificativ atât modul nostru de viață cât și mediul înconjurător. De asemenea, datorită extraordinarei sale complexități biologia sintetică ridică și o serie de probleme legate de tehnicile folosite, de etică, de proprietatea intelectuală, de securitate și biosecuritate, constituindu-se în limite care vor influența felul în care se va dezvolta acest domeniu de vârf al științei și cercetării.

## BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- ▶ Agapakis C.M., Niederholtmeyer H., Noche R.R., Lieberman T.D., Megason SG, Way J.C., Silver P.A. (2011) Towards a Synthetic Chloroplast. PLoS ONE 6(4): e18877.
- ▶ Antunes M. S., Ha S. B., Tewari-Singh N., Morey K. J., Trofka A. M., Kugrens P., Deyholos M., Medford J. I. 2006. A synthetic de-greening gene circuit provides a reporting system that is remotely detectable and has a re-set capacity. Plant Biotech J. 4(6): 605-622.
- ▶ Awan A. R., Shaw W. M., Ellis T. 2016. Biosynthesis of therapeutic natural products using synthetic biology. Adv Drug Deliver Rev. 105: 96-106.
- ▶ Benner S. A., Sismour A. M. 2005. Synthetic biology. Nature Rev Genet, 6(7): 533-543
- ▶ Cook C., Martin, L., Bastow, R. 2014. Opportunities in plant synthetic biology. J Exp Bot. 65(8): 1921-1926.
- ▶ Diretto G., Al-Babili S., Tavazza R., Papacchioli V., Beyer P., Giuliano G. 2007. Metabolic Engineering of Potato Carotenoid Content through Tuber-Specific Overexpression of a Bacterial Mini-Pathway. PLoS ONE. 2(4): e350.
- ▶ Elowitz M.B., Leibler S.2000. A synthetic oscillatory network of transcriptional regulators. Nature. 403(6767):335e8.
- ▶ European Group on Ethics. 2009. Opinion no. 25 – Ethics of Synthetic Biology. Brussels: European Group on Ethics in Science and New Technologies to the European Commission.
- ▶ [https://www.coe.int/t/dg3/healthbioethic/cometh/ege/20091118%20finalSB%20\\_2\\_%20MP.pdf](https://www.coe.int/t/dg3/healthbioethic/cometh/ege/20091118%20finalSB%20_2_%20MP.pdf) (accesat la 3.09.2018)
- ▶ Fossati E., Ekins A., Narcross L., Zhu Y., Falguyet J. P., Beaudoin G. A., ... Martin, V. J. 2014. Reconstitution of a 10-gene pathway for synthesis of the plant alkaloid dihydrosanguinarine in *Saccharomyces cerevisiae*. Nature Commun, 5: 3283.

- ▶ Gardner T.S., Cantor C.R., Collins J.J. 2000. *Construction of a genetic toggle switch in Escherichia coli*. Nature. 403(6767):339e42.
- ▶ Gibson D. G., Glass J. I., Lartigue C., Noskov V. N., Chuang R. Y., Algire M. A., ... Venter J.C. 2010. *Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome*. Science: 1190719.
- ▶ Jefferson C., Lentzos F., Marris, C. 2014. *Synthetic biology and biosecurity: challenging the “myths”*. Frontiers in public health, 2: 115
- ▶ Leduc S. 1912. *La biologie synthétique* (Vol. 2). Ed. A. Poinat.
- ▶ Liu W., Stewart, C. N. 2015. *Plant synthetic biology*. Trends Plant Sci. 20(5): 309-317.
- ▶ Oldham P., Hall S., Burton G. 2012. *Synthetic biology: mapping the scientific landscape*. PLoS ONE 7(4): e34368.
- ▶ Paddon C.J., Westfall P.J., Pitera D.J., Benjamin K., Fisher K., McPhee D... Polichuk D.R. 2013. *High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin*. Nature 496: 528–532.
- ▶ Rogers C., Oldroyd G.E.D. 2014. *Synthetic biology approaches to engineering the nitrogen symbiosis in cereals*. J. Exp. Bot. 65: 1939–1946.
- ▶ Schmidt M., Ganguli-Mitra A., Torgersen H., Kelle A., Deplazes A., Biller-Andorno N. 2009. *A priority paper for the societal and ethical aspects of synthetic biology*. Systems and Synthetic Biology, 3: 3-7.
- ▶ Si T., Zhao H. 2016. *A brief overview of synthetic biology research programs and roadmap studies in the United States*. Synthetic Syst Biotech. 1(4): 258-264.
- ▶ Synthetic Biology Leadership Council. 2016. *Biodesign for the Bioeconomy: UK Synthetic Biology Strategic Plan 2016* - <https://www.openplant.org/s/BioDesign-for-the-Bioeconomy-2016-DIGITAL.pdf> (accesat la 22.08.2018).
- ▶ U. S.National Research Council. 2013. *Positioning synthetic biology to meet the challenges of the 21st Century: Summary report of a six academies symposium series*. National Academies Press - [http://www.nap.edu/catalog.php?record\\_id=13316](http://www.nap.edu/catalog.php?record_id=13316) (accesat la 27.07.2018).
- ▶ Weber T., Blin K., Duddela S., Krug D., Kim H. U., Brucoleri R., ... Breitling, R. 2015. *antiSMASH 3.0—a comprehensive resource for the genome mining of biosynthetic gene clusters*. Nucleic acids Rese, 43(W1): W237-W243.
- ▶ Wong M.H., Giraldo J.P., Kwak S.Y., Koman B.V., Sinclair R., Lew T.T.S., Bisker G., Liu P., Strano M.S. 2017. *Nitroaromatic detection and infrared communication from wild-type plants using plant nanobionics*. Nature Materials, 16: 264 - 272.



# SPECIFIC EFFECTS OF VIRAL INFECTION IN TOMATO PROGENIES OBTAINED FROM PLANTS INFECTED WITH VIRUSES



*Andronic L., Marii L., Smerea S., Schin V.*

Institute of Genetics, Physiology and Plant Protection, 20 Str. Padurii, Chisinau, MD 2002, Republic of Moldova,  
e-mail: andronic.larisa@yahoo.com

## ABSTRACT

Effect of phytoviruses on tomato progenies derived from infected plants was assessed on the basis of four genotypes: susceptible cultivar Elvira, spontaneous form *S.pimpinellifolium*, the varieties with resistance genes to TMV - Craigella (Tm-2<sup>2</sup>/Tm-2<sup>2</sup>) and Craigella (Tm-1/Tm-1). The defense reactions of host genotypes to Tomato Aspermy Virus and Tobacco Mosaic Virus were evaluated on base of peroxidase and polyphenol oxidase activity,  $\alpha$ -tomatine accumulation in petiole tissues. The analyzed viruses contributed to fluctuation in peroxidase and polyphenol oxidase activity in infected progenies, depending on the genotype. The antioxidant activity is more significant in tolerant and genotypes with resistance genes. The variation in activity of polyphenol oxidase is higher expressed in genotype-virus systems that presented more deep pathological changes. The degree of accumulation of  $\alpha$ -tomatine depends in more part on the protective potential of the genotype.

**Key words:** *tomato, plant viruses, virus infection,  $\alpha$ -tomatine, peroxidase, polyphenol oxidase*

## INTRODUCTION

Impact of viral pathogens in host plants result in a wide range of modifications triggering local and global responses via multiple (intercrossing) transduction pathways. Has been established that viral infection can contribute to genome instability [14], paramutations [1], disturbances of the frequency of recombination between homologous chromosomes [11; 15] **and** changes in gene expression [12]. Recent studies indicate that interactions between plants and pathogens are based on epigenetic mechanisms [8; 10; 16]. According to Boyko, Kovalchuk [2], infection in a susceptible host with a compatible virus results in the activation of various signals, such as the induction of small RNAs. These signals extend systemically from the site of infection to non-infected tissues, including the tissues of the generative organs. Infection is accompanied by the hypo- or hypermethylation of specific locus, epigenetic changes that can be transmitted to the offspring. At the basis of these changes there are genetic effects (point mutations and gene recombination) leading to the formation of new allelic combinations, which can later be inherited. As results are formed gametes and the resulting individuals may have new allelic combinations.

A lot of researches regarding plant viruses reveal that the character of systemic symptoms of virus infection in plants is determined by the expression of both host and virus genes. The consequences of viral infection are highly variable, thereby leading to a continued lack of understanding of these effects.



The character of the manifested biochemical and structural changes depends on the type of genotype-pathogen reaction. The oxide-reduction enzymes, involved in the regulation of many processes, react to biotic stress, also to viruses. It is demonstrated, that under the influence of viral infections, the activity of antioxidant enzyme such as peroxidase is modified, which indicates the host reaction to the pathogen [6]. Another component involved in the formation of host plant responses to pathogen damage is steroidal glycoalkaloids,  $\alpha$ -tomatine, which is known to be proposed for identification of tomato plants with resistance to various agents, including viruses [13].

In this context, the objective of this study was the evaluation the activity of some enzymes (peroxidase and polyphenol oxidase) and histochemical identification of steroidal glycoalkaloid ( $\alpha$ -tomatine) involved in stress response in progeny of tomatoes derived from virus-infected plants of host with different defensive response (susceptibility, tolerance, resistance) in case of additional infection compared to its mock-inoculated control.

## MATERIAL AND METHODS

As biological material served five genotypes of tomato (local cultivar Elvira, spontaneous form *S.pimpinellifolium*, the varieties Craigella (Tm-2<sup>2</sup>/Tm-2<sup>2</sup>) and Craigella (Tm-1/Tm-1). For inducing pathogenesis the plants were inoculated mechanically at the stage of 3-4 leaves with Tomato Aspermy Virus (TAV, isometric virions, RNA genomic nucleic acid component) or Tobacco Mosaic Virus (TMV, rod-shaped particle, RNA genomic nucleic acid component). The first diseases symptoms had been developed on cultivars Elvira after 10-15 days before inoculation, while the spontaneous form and varieties with gene of resistance to TMV showed no external changes. Using negative staining, the viral particles were identified in all genotypes, regardless of the symptoms manifestation. By ultrastructural study was confirmed the presence of TAV and TMV in cytoplasm of leaf cells. The seeds formed under viral pathogenesis were used in the following investigations. Second and third progenies (P II and P III) were involved in these studies. The evaluated materials not established virions. The tomato descendents (P II and P III) were infected with same virus as first generation: at 3-4 leaves with TAV or at 5-6 leaves with TMV.

The peroxidase (POX) and polyphenol oxidase activity (PPO) was determined spectrophotometrically in fresh vegetable extract [20]. The samples for biochemical analysis were collected at phase of symptoms development. So, had been applied two control: control I at moment of collection of probes in TAV variants and control II - for TMV variants.

Histochemical tests were performed on sections obtained from fresh material using Dragendorff reagents for alkaloids [19]. The sections were examined with a Zeiss Axio Lab.A1 microscope. The preparations were evaluated with a AxioCam digital camera coupled to a microscope equipped with the Carl Zeiss Imaging System AxioVision program. The photomicrographic results were observed with A-Plan 10x/0.25 objective.

The statistical processing of data was carried out using the software package Statgraphics Plus for Windows (version 2.1; Microsoft Corp., Redmond, WA, USA) and Microsoft Excel. The contribution of variation sources was computed following the ANOVA test results [5].

## RESULTS AND DISCUSSION

Local cultivar Elvira showed external symptoms of disease caused by evaluated viruses. The first mosaic pots were established in about two weeks after inoculation. The varieties Craigella (Tm-2<sup>2</sup>/Tm-2<sup>2</sup>) and Craigella (Tm-1/Tm-1) showed different reactivity to viral infection: from weak mosaic to chlorotic spots in variant with TAV. Due to the high temperatures of the experimental environment conditions the symptoms of the disease were also noted in the varieties with resistance genes to TMV (Craigella (Tm-2<sup>2</sup>/Tm-2<sup>2</sup>) and Craigella (Tm-1/Tm-1)), but with a less manifestation degree than susceptible cv.Elvira. In varieties *S.pimpinellifolium*, the symptoms did not developed or were poorly expressed, although the particles of TMV and TAV were detected in plant organs by electron microscopy technique. Similar aspects were described and for second and third progenies infected with same virus.

One of defender plant reaction to viral infection is the modification of antioxidant activity. The perturbation of peroxidase activity is considered to be a non-specific response to biotic and abiotic factor, mechanical damage [13].

In our research, the difference in peroxidase activities is dependent on the genotype (Table).

Table. Peroxidase and polyphenol activity in crude vegetal extract of virus infected tomato plants

Genotype	Variant	Peroxidase activity (optical density)	Polyphenol oxidase activity (optical density)
<i>S.pimpinellifolium</i>	Control I	0.1279±0.0491	0.0619±0.0049
	TAV	0.0790±0.0111	0.0974±0.0125**
	P II	0.1434±0.0124	0.0879±0.0056**
	P III	0.1393±0.0319	0.0764±0.0043**
	Control II	0.1485±0.0408	0.1447±0.0093
	TMV	0.2734±0.1286*	0.1769±0.0322
	P II	0.1318±0.0205	0.1678±0.0121
	P III	0.0957±0.0102*	0.1777±0.0391
Craigella (Tm-1/Tm-1)	Control I	0.2732±0.1245	0.0839±0.0019
	TAV	0.1676±0.0073	0.2534±0.0577***
	P III	0.2044±0.068	0.1801±0.0551***
	Control II	0.2044±0.0677	0.1890±0.0371
	TMV	0.3116±0.0207*	0.1936±0.0391
	P II	0.2627±0.0287	0.1543±0.0298
	P III	0.1976±0.0223	0.1426±0.0134
Craigella (Tm-2 <sup>2</sup> /Tm-2 <sup>2</sup> )	Control I	0.2711±0.1309	0.0656±0.0089
	TAV	0.2699±0.0323	0.2087±0.0297**
	P II	0.2697±0.0775	0.0733±0.0181
	P III	0.2499±0.0894	0.0701±0.0085
	Control II	0.1819±0.0263	0.1847±0.0068
	TMV	0.2469±0.0861*	0.1822±0.0083
	P II	0.2645±0.0106*	0.1848±0.0302
	P III	0.3307±0.0483*	0.1590±0.0441
Elvira	Control I	0.1704±0.0291	0.0859±0.0139
	TAV	0.4870±0.1055**	0.0681±0.0033*
	Control II	0.2069±0.0550	0.2241±0.0252
	TMV	0.4402±0.0745**	0.2259±0.0279
	P III	0.3477±0.0434**	0.2650±0.0472

\*, \*\*, \*\*\* - significant difference from the control at P < 0.05; 0.01 and 0.001.

Elvira variety demonstrated a significant increase in the activity after infection with TAV or TMV. Significant growing was described and in infected TMV progeny III. Statistically confirmed increase was also certified in variants of Craigella (Tm-2<sup>2</sup>/Tm-2<sup>2</sup>) with TMV application. TMV conducted to higher level of POX in *S.pimpinellifolium*.

The average activity of polyphenol oxidase was slightly influenced by viral infection. So, significant modification was found only in plants infected with TAV.

Evaluations of the peroxidase values distribution indicate significant modifications of this parameter under the action of viral infection, generating high variation. In the TAV or TMV variants have been found plants that exhibit a different activity of this enzyme than in control, causing the displacement of minimal and maximal values (Fig. 1). If the peroxidase activity in control variant of *S.pimpinellifolium* was notified between 0.093-0.195 (o.d., units of optical density) in the experimental variants attained 0.155 -0.44 (o.d.). The higher level (0.253 – 0.274) had been established in Craigella (Tm-2<sup>2</sup>/Tm-2<sup>2</sup>) infected with TAV. Proximal tendency was found in progenies too.

Similar disturbs were described and for polyphenol oxidase, indicating the destabilization effect of viral infection (Fig. 2). Significant fluctuations of polyphenol oxidase activity have been reported in most host-pathogen combination, including progenies of infected plants. The more intense deviations were recorded for Craigella (Tm-1/Tm-1) – 0.179 – 0.32 (o.d.) comparativ to control (0.082 – 0.087 o.d.).

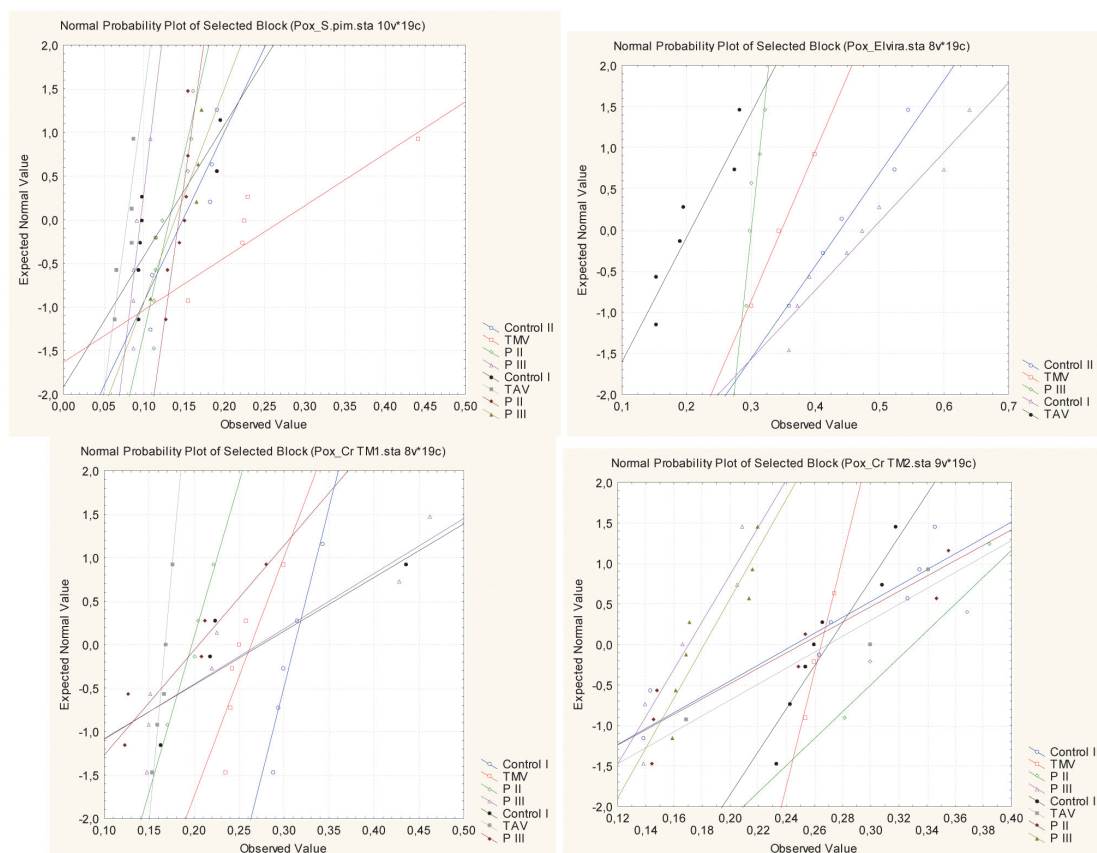


Fig.1. Values distribution of peroxidase in various pathogenic systems.

The differences between experimental variants were certified as well as in localization of  $\alpha$ -tomatine in the petioles of susceptible variety Elvira, spontaneous form and cultivars with genes of resistance to TMV (Fig. 3). A significant accumulation of alkaloid granules was detected

ted in parenchymal cells of *S. pimpinellifolium* infected with TAV and TMV (Fig. 3 B, C). The histochemical studies of petioles showed that alkaloids could be observed also in phloem, but

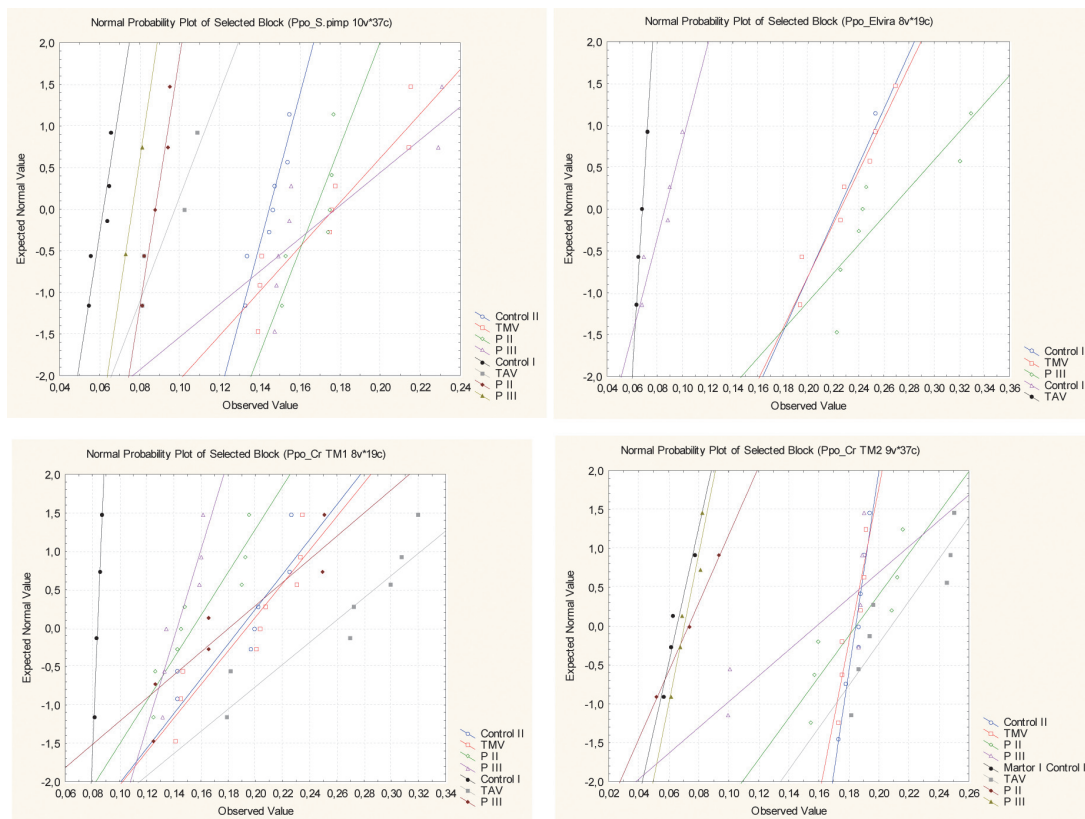


Fig.2. Values distribution of polyphenol oxidase in various pathogenic systems.

also in the xylem parenchyma. Abundant accumulation of  $\alpha$ -tomatine was also noted in petioles of Craigella cultivars under infection with TMV and TAV (Fig. 3 I-J, L-M).

It was shown that alkaloids can exist in the epidermis, mesophyll cells, and parenchyma cells [7].

In our studies, the granules could be established in the glandular trichomes too. According to the literature data, the glandular trichomes are renowned as prolific “chemical factories” for either synthesizing or storing of metabolites as chemical defenses [4].

Tomatine is a steroidal glycoalkaloid found in the tomato plant and other *Solanum* species. The glycoalkaloids are metabolites that protect of plants against insects, fungi, bacteria, including viruses [17]. Work on the involvement of  $\alpha$ -tomatine in the resistance of tomato to vascular wilt pathogens has been confined exclusively to *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, founding substantial increases of  $\alpha$ -tomatine in stems and roots three days following inoculation of both resistant and susceptible cultivars [9]. According to the authors, the results from these studies are confusing yet with no clear picture emerging.

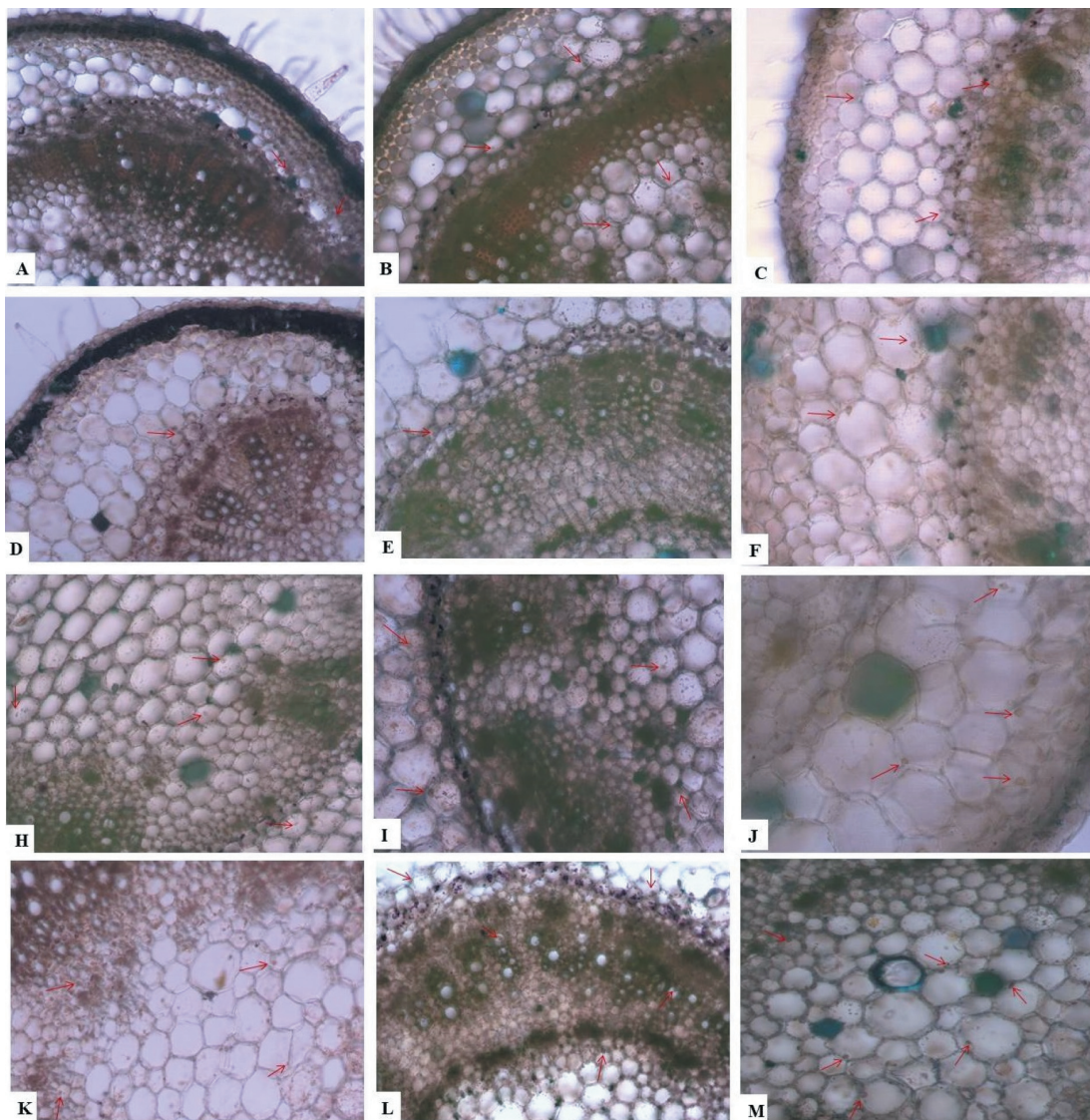


Fig.3. Histochemical identification of  $\alpha$ -tomatine in of health and virus infected tomato genotypes: A-C – *S.pimpinellifolium*, D-F – cv.Elvira, H-J – cv. Craigella (Tm-1/Tm-1), K-M – cv. Craigella (Tm-2<sup>2</sup>/Tm-2<sup>2</sup>). Transverse sections of petioles of health (A, D, H, K) and infected with TAV (B, E, I, L) and TMV (C, F, J, M) plants.

It is known that plant defense mechanisms are activated in a very short time in response to harmful agents, including viruses. The first reaction conducted in the cells is increase in the concentration of reactive oxygen species (ROS). Plants have defense mechanisms against oxidative damage that are activated to regulate toxic levels of ROS. Enzymatic and non-enzymatic systems are involved in ROS detoxification. The involvement of the antioxidant enzymes in the tolerance of plants to various stresses will be discussed. It has been reported that the antioxidant capacity has increased with tolerance and resistance to several stresses [3]. Between major antioxidant enzymes involved in detoxification and defense reaction an important role plays the peroxidase. In our study, in condition of viral pathogenesis, had been established the increasing activity of this enzyme in hosts with tolerance or genes of resistance. The variation in activity of polyphenol oxidase is higher expressed in genotype-virus systems that presented

more deep pathological changes. Such, the fluctuation of polyphenol oxidase was more pronounced in plants infected with TAV, which presented intense symptoms.

Among the non-enzymatic antioxidants, a special attention should be paid to phenolic and steroidal compounds which represent diverse groups of plant secondary metabolites. According to the Spencer et al. [18] the antioxidant capacity in tomato extract is correlated with content of secondary metabolites. The histochemical studies of  $\alpha$ -tomatine accumulation in petioles denote a wide distribution of glycoside granules in cells of tolerant host or plants with genes of resistance.

## CONCLUSIONS

The tomato aspermy virus and tomato mosaic virus contributed to fluctuation in peroxidase and polyphenol oxidase activity in infected plants and in progenies, depending on the genotype. The antioxidant activity is more significant in tolerant and genotype with resistance genes.

The degree of accumulation of  $\alpha$ -tomatine in the petioles of infected plants depends in more part on the protective potential of the genotype.

## BIBLIOGRAPHY

1. Bond D.M, Finnegan E.J. Passing the message on: inheritance of epigenetic traits. *Trends Plant Sci.*, 2007. Vol.12, p.211–216.
2. Boyko A., Kovalchuk I. Genetic and epigenetic effects of plant–pathogen interactions: An Evolutionary Perspective. *Molecular Plant*, 2011. Vol. 5, p. 1014-1023.
3. Caverzan A., Casassola A., Brammer S. P. Reactive oxygen species and antioxidant enzymes involved in plant tolerance to stress. In: *Abiotic and biotic stress in plants – recent advances and future perspectives*, 2016. Chapter 20, p.467
4. Chao L., Wang Z. Z. and Daniel J. A. Chemical imaging of trichome specialized metabolites using contact printing and laser desorption/ionization mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2014. Vol. 406, p. 171–182.
5. Clewer, A.G. and Scarisbrick, D.H. *Practical statistics and experimental design for plant and crop science*. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester. 2001, 346 p.
6. Culver J. N., Padmanabhan, M. S. Virus-induced disease: altering host physiology one interaction at a time. *Annu Rev Phytopathol*, 2007. Vol. 45, p.221–243.
7. Dhale D. A. Histochemical investigation on some medical plants. *Advance Research in Pharmaceuticals and Biological*, 2011. Vol. 1, p. 147–154.
8. Díaz E., Jordà M., Peinado M., Rivero A. Epigenetics of host–pathogen interactions: The Road Ahead and the Road Behind. *PLoS Pathog*, 2012. Vol.11 – e1003007.
9. Friedman M. Tomato glycoalkaloids: role in the plant and in the diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002. Vol. 50, p. 5751–5780.
10. Kasuga T., Gijzen M. Epigenetics and the evolution of virulence. *Trends in Microbiology*, 2013. Vol. 21, p. 575-582.
11. Kathiria P., Sidler C., Golubov A., Kalischuk M., Kawchuk L., Kovalchuk I. Tobacco Mosaic Virus infection results in an increase in recombination frequency and resistance to viral, bacterial, and fungal pathogens in the progeny of infected tobacco plants. *Plant Physiology*, 2010. Vol. 153, p. 1859-1870.
12. Kogovsek P., Pompe-Novak M., Baebler S., Rotter A., Gow L., Gruden K., Foster G. D., Boonham N. and Ravnikar M. Aggressive and mild Potato virus Y isolates trigger different specific responses in susceptible potato plants.

- Plant Pathology, 2010. Vol. 59, p. 1121–1132.
13. Liu N., Lin Z., Guan L., Gaughan G., Lin G. Antioxidant enzymes regulate reactive oxygen species during pod elongation in *Pisum sativum* and *Brassica chinensis*. PLoS One. 2014, 9(2):e87588. doi: 10.1371/journal.pone.0087588. eCollection 2014.
  14. Madlung A., Comai L. The effect of stress on genome regulation and structure. Annals of Botany, 2004. Vol. 94, p. 481-495.
  15. Molinier J., Ries G., Zipfel C. and Hohn B. Transgenerational memory of stress in plants. Nature, 2006. Vol. 442, p. 1046–1049.
  16. Qutob D., Chapman B. P., Gijzen M. Transgenerational gene silencing causes gain of virulence in a plant pathogen. Nat. Commun, 2013. Vol. 4, p.1349-1354.
  17. Silva-Beltrán N.P., Ruiz-Cruz S., Cira-Chávez L.A., Estrada-Alvarado M.I., Ornelas-Paz J.J., López-Mata M.A., Del-Toro-Sánchez C.L., Ayala-Zavala J.F. and Márquez-Ríos E. Total phenolic, flavonoid, tomatine, and tomatidine contents and antioxidant and antimicrobial activities of extracts of tomato plant. International Journal of Analytical Chemistry, 2015. Vol. 11, p.1-10.
  18. Spencer J. P. E., Kuhnle G. G. C., Hajirezaei M., Mock H. P., Sonnewald U., and Rice-Evans C. The genotypic variation of the antioxidant potential of different tomato varieties. Free Radical Research, 2005. Vol. 39, p. 1005–1016.
  19. Svendsen A.B., Verpoorte R. Chromatography of Alkaloids. 1983. Elsevier Scientific Publishing Company, New York, 531 p.
  20. Ермаков А. и др. Методы биохимического исследования растений. Ленинград «Колос», 1987, 360 с.



# FEROBACTERII IDENTIFICATE ÎN STRUCTURA ȘI INSTALAȚIILE CONSTRUCȚIILOR HIDROENERGETICE



*Mădălin Enache, Simona Neagu, Roxana Cojoc, Mirela Moldoveanu, Larisa Florescu,  
Ioan Păceșilă, Robert Ruginescu, Ioana Gomoiu*

Institutul de Biologie București al Academiei Române, Splaiul Independenței nr. 296, sector 6, București,  
România, e-mail: madalin.enache@ibiol.ro

Fierul a fost recunoscut de foarte multă vreme ca reprezentând o potențială sursă de energie pentru microorganisme, iar date de literatură privind ferobacteriile, respectiv microorganismele care se pot dezvolta în prezența fierului, pot fi identificate până la mijlocul anilor 1800 (Ghiorse și Ehrlich, 1992).

În jurul anului 1830, ferobacteriile au fost printre primele grupe de microorganisme recunoscute pentru implicarea într-un proces geologic fundamental, respectiv oxidarea fierului. Dezvoltarea unui microorganism având fierul ca unică sursă de energie reprezintă o provocare fiziologică. Oxidarea fierului feros la fier feric determină o scădere a energiei libere Gibbs necesară metabolismului celular. Cantitatea de energie pe care microorganismele o pot obține în urma acestui proces este de 29 kJ/mol, în timp ce dacă fierul ar precipita sub forma hidroxidului de fier, proces care are loc în mod spontan la valori neutre de pH, cantitatea de energie obținută ar fi dublă. Pe de altă parte, oxidarea la presiune parțial redusă conduce la creșterea cantității de energie la 90 kJ/mol pentru Fe(II).

Cinetica oxidării fierului la pH neutru reprezintă un factor important pentru dezvoltarea ferobacteriilor, având în vedere că oxidarea abiotică a fierului în apă oxigenată este rapidă, cu un timp de înjumătățire mai mic de 1 minut. Acest aspect presupune ca ferobacteriile să se dezvolte în condiții de microaerobioză unde timpul de înjumătățire al Fe(II) poate fi de 300 de ori mai mare. Pe de altă parte, precipitarea rapidă a hidroxidului de fier care rezultă din oxidarea fierului ar putea îngloba celulele bacteriene într-o crustă oxidică metalică, care poate limita accesul lor la sursa de energie.

Ferobacteriile au fost izolate din ape dulci și habitate marine folosind tehnici care utilizează gradientul de difuzie opus al Fe(II) și oxigenului pentru a mima condițiile redox naturale (Emerson și colab., 2010). În general, capacitatea de a oxida fierul este larg răspândită la microorganismele ce se regăsesc în domeniile Bacteria și Archaea.

În 1837, prima ferobacterie descrisă a fost *Gallionella ferruginea* (Ehrenberg, 1837). Descrierea ei s-a bazat pe faptul că în timpul creșterii formează filamente în care este încrustat hidroxidul de fier. Spre deosebire de alte ferobacterii, *Gallionella* s-a dovedit receptivă la cultivarea în condiții de laborator. Ralph Wolfe și colaboratorii au cultivat cu succes *G. ferruginea* care formează filamente în anii 1950 și au arătat că este un organism care preferă limitele redox (limitele de interpretare a semnificației potențialului oxido-reducător) și care necesită un gradient opus de oxigen și fier pentru a crește (Kucera și Wolfe, 1957). Aceste limite redox au confirmat că *G. ferruginea* este un organism microaerofil care necesită Fe(II) pentru creștere.



Studiul a demonstrat că celulele având forma bobului de fasole cresc pe extremități filamentoase (peduncul) și secretă aceste filamente ca funcție a creșterii celulare. Alți autori (Hanert, 2006) au confirmat că *G. ferruginea*, în condiții optime ale necesarului de Fe (II), produce filamente (pedunculi) cu o viteză de 90 μm/h în condiții redox adecvate. Astfel, filamentele par să servească la cel puțin două funcții:

a) orientarea mecanismului care să mențină celula în gradientii de fier și oxigen necesari pentru creștere, și

b) coordonarea locului de precipitare a hidroxidului de fier pentru a preveni înglobarea celulei în crusta oxidică metalică insolubilă.

Un alt gen care cuprinde specii ce au proprietatea de a oxida fierul dar și manganul este *Leptothrix*. În prezent, acest gen cuprinde patru specii validate, respectiv *L. ochracea*, *L. discophora*, *L. cholodnii* și *L. mobilis*. Aceste microorganisme au în comun producerea unei teci tubulare extracelulare care acoperă celulele filamentoase.

*L. ochracea* a fost prima specie descrisă (Kützing, 1843 citat de Emerson și colab., 2010) și aparent, dintre ferobacterii, este specia cel mai des întâlnită în apele dulci. Nu a putut fi cultivată cu succes în laborator și nici nu a constituit subiectul unui studiu independent de cultivare pentru a se analiza filogenia sau fiziologia. Date mai vechi din literatură conțin multe controverse despre statutul energetic al acestei specii. În 1978, Van Veen și colab. au elaborat un studiu amănunțit referitor la grupul *Leptothrix-Sphaerotilus*, concluzionând că *L. ochracea*, cel mai probabil nu are capacitatea de a obține energie din oxidarea Fe(II). Această concluzie se baza pe ideea că în baza similarităților morfologice, *L. ochracea* ar putea avea proprietăți fiziologice similare cu alte specii de *Leptothrix* care sunt heterotrofe. Începând cu acest amplu studiu, microbiologii au recunoscut că trăsăturile morfologice reprezintă un criteriu cu o probabilitate foarte scăzută în ceea ce privește legăturile taxonomice (Vandamme și colab., 1996). Indiferent de confuziile create de acest istoric, există numeroase dovezi care arată că *L. ochracea* are un metabolism chemolitotrof. În primul rând este vorba de abundența sa în ape cu conținut ridicat de fier, ceea ce arată că specia necesită concentrații ridicate de Fe(II) pentru a se dezvolta. În al doilea rând, tulpina produce cantități foarte mari de oxizi de fier care sunt depozitați sub formă de teacă (Emerson și Revsbech, 1994). Încercările de a cultiva specia pe medii de cultură specifice heterotrofilor și care permit cultivarea altor specii de *Leptothrix* nu au avut succes (Mulder și van Veen, 1963). De asemenea, încercările de a cultiva specia pe medii sintetice, în condiții care permit creșterea altor ferobacterii litotrofe, nu au avut succes. În acest context, poziția filogenetică reală a speciei *L. ochracea* precum și statutul său fiziologic rămân o problemă deschisă cercetărilor (Emerson și colab., 2010). Așadar, confuziile privind statutul fiziologic și taxonomic derivă din cunoștințele despre speciile cultivate ale genului *Leptothrix* și cele ale genului înrudit *Sphaerotilus*. Toate speciile acestui din urmă gen oxidează fierul și/ sau manganul și sunt obligat chemoorganotrofe, fiind capabile să se dezvolte pe o gamă largă de compuși organici și neexistând dovezi despre o creștere litotrofă în prezența fierului sau a manganului (Spring, 2006; van Veenși colab., 1978).

Producerea tecii este trăsătura definitorie atât a speciilor de *Leptothrix* cât și a celor de *Sphaerotilus*, fiind locul de depozitare atât pentru oxizii de fier cât și pentru oxizii de mangan. În cazul oxidării fierului se presupune că un rol esențial al tecii este de a proteja celula bacteriană de

posibilitatea înglobării ei în crusta insolubilă de hidroxid de fier. Teaca speciei *L. cholodnii* SP-6 (anterior *L. discophora* SP-6) este o matrice fibrilară care datorează proprietățile sale elastice existenței unui număr mare de legături disulfidice ce mențin fibrili individuali ai tecii împreună (Emerson și Ghiorse, 1993). Analiza structurii chimice în detaliu a tecilor de la *L. cholodnii* și *S. natans* a arătat existența unor noi glicoconjugăți care au unele similarități cu peptidoglicanul. Aceștia sunt alcătuiți din complexe polizaharidice care au în compoziție acizi uronici, aminozaharuri, zaharuri neutre și peptide, inclusiv N-acetil-L-cisteinglicină (Takeda și colab., 2007). Takeda și colab., au propus că fibriliile din teaca de la *L. cholodnii* se pot asambla spontan prin intermediul legăturilor disulfidice din lanțurile laterale ce au în compoziție L-cisteină, interacționând hidrofob cu substituții acidului 3-hidroxi propionic din unitățile glicanice din lanț. Legătura structurală prin care factorii metalooxidanti, fie pentru fier, fie pentru mangan sunt asociați cu aceste complexe polimerice rămâne un subiect deschis investigațiilor ulterioare. Relația dintre tecile de la *L. cholodnii* și *S. nantas* și cea formată de specia necultivabilă *L. ochracea* este necunoscută (Emerson și colab., 2010). Pe baza analizei STXM (microscopie de baleiaj cu transmisie de raze x) a unor probe naturale care conțin teci de la o tulpină bacteriană similară cu *L. ochracea* s-a constatat că acestea conțin polizaharide acide (Chan și colab., 2009), însă compoziția specifică nu a fost încă elucidată.

Ferobacteriile sunt foarte bine adaptate, în mod similar oricărui grup care beneficiază de avantajele interfeței oxic-anoxic. Această limită redox particulară în care ferobacteriile se dezvoltă foarte bine este caracterizată prin fluxuri constante de Fe(II) care provin dintr-o sursă anoxică și O<sub>2</sub> care este furnizat de apa oxigenată. În termenii condițiilor fizico-chimice, oricare dintre aceștia se poate opune stabil gradientilor de difuzie a Fe(II) și O<sub>2</sub> sau pot fi direcționați printr-un amestec adecvat de apă oxică și anoxică. Rizosfera este un exemplu pentru cele menționate în prima parte, în timp ce scurgerea fierului, izvoarele și venturile hidrotermale sunt exemple pentru cele menționate în ultima parte a frazei anterioare.

## APELE DULCI BOGATE ÎN FIER ȘI ZONELE UMEDE

Scurgerile de fier au loc oriunde apele subterane cu concentrații mari de Fe(II) iau contact cu aerul și devin oxigenate. Cel mai adesea, ele sunt asociate cu scurgerile din zonele umede sau cu sistemele de drenaj din agricultură, fluxurile care se mișcă lent, izvoarele feruginoase și apele subterane. Domeniul de pH al acestor sisteme, de regulă este cuprins între 5.5 și 7.2. Concentrația de Fe(II) în aceste surse este cuprinsă între 10 și 200 μM, dar ea se diminuează rapid pe măsura îndepărtării de sursă. În general, Fe(II) provine din reducerea bacteriană a fierului sau din dezagregarea chimică a mineralelor bogate în fier (Canfield și colab., 2005).

Cele mai evidente rezultate ale amestecului de Fe(II) și O<sub>2</sub> sunt precipitatele ruginii ale flocculelor de oxizi ai fierului sau depozitele de fier care acoperă orice suprafață disponibilă. Morfologia brută a acestor precipitate depinde de regimul de flux prezent. Când apele hipoxice apar dintr-un izvor focalizat sau predomină condițiile turbulente, se pot forma depozite dense, sub forma unei mase cu aspect lănos care poate avea câțiva centimetri grosime. În adâncime, în canalele cu apă cu mișcare lentă, precipitatele formate cel mai adesea nu mai au forma oxidurilor cu aspect lănos, ci se depun sub forma unui sediment la adâncimi de 10 centimetri. Unele exemple se regăsesc în Fig.1. Aceste depozite de fier pot concrește foarte rapid. De exemplu un

depozit de fier compact în Danemarca a avut o viteză de acumulare de 3,1 mm pe zi în perioada condițiilor optime de creștere (Emerson și Revsbech, 1994). Depozitele lănoase care se acumulează în straturile de apă, cel mai adesea sunt măturate de furtuni, dar o cantitate însemnată de Fe(II) rămâne prezentă în sursa de apă, astfel încât procesul de regenerare a materialului nou începe imediat și evoluează rapid (Carlile și Dudeney, 2000).

Analiza microscopică atât a depozitelor compacte cât și a celor cu aspect lănos arată că sunt matrici complexe de morfotipuri ale oxizilor fierului și în mod constant predomină fie tecile caracteristice pentru *L. ochracea*, fie filamentele caracteristice pentru *G. ferruginea*. Aceste structuri filamentoase formează un schelet pe care se depun particulele oxidice (Emerson și Weiss, 2004). Analiza microbiologică a depozitelor compacte a evidențiat că acestea, din punct de vedere structural, sunt dominate de teci, fapt ce arată că celulele de *L. ochracea* sunt cele mai active din punct de vedere al creșterii în structura depozitului care poate să atingă o grosime de câțiva centimetri. În aceste depozite, tecile sunt prezente numai în procent de 10% (Emerson și Revsbech, 1994). Cu creșterea adâncimii, tecile devin mult mai goale, iar particulele oxidice care sunt predominante se depun pe celulele solitare. Datorită structurii lor filamentoase, tecile (sau filamentele) formează o suprafață largă și un traseu de scurgere care ajută intrarea apelor bogate în fier, dând naștere unui potențial de sporire a disponibilității Fe(II) pentru ferobacterii (Emerson și Weiss, 2004).

Studii bazate pe librării de clone de SSU ARNr din ape dulci cu depozite de fier au demonstrat prezența diferitelor filumuri bacteriene. Cele mai abundente sunt microorganismele din *Betaproteobacteria* constituind 26 – 57% din totalul clonelor, predominante fiind *Gallionella* și *Synderoxidans* care reprezintă 10 – 25% din totalul clonelor. Unitatea taxonomică pentru speciile de *Leptothrix* este prezentă, dar într-un procent de 3% din totalul clonelor, în pofida evidenței morfologice abundente pentru tecile aparținând *L. ochracea*. Aceste analize independente de cultivare constituie o dovadă importantă a prezenței și activității ferobacteriilor în ecosistemele cu ape dulci.

Depozitele bacteriene de fier pot demonstra atât importanța stratificării verticale cât și variabilitatea în chimia redox. Studii cu electrozi de oxigen asupra unui ecosistem din Danemarca alcătuit din depozit de fier au arătat că oxigenul pătrunde la o adâncime care pornește de la 300 μm și poate ajunge până la câțiva centimetri (Emerson și Revsbech, 1994). Studiul a arătat că în depozit este dominantă specia *L. ochracea* care are tendința de a facilita accesul oxigenului până la o adâncime mai mare comparativ cu depozitele în care predomină *G. ferruginea*, fapt care sugerează că *G. ferruginea* preferă creșterea la concentrații scăzute de oxigen.

Dinamica oxigenului este dependentă de structura depozitului, concentrația de Fe(II), amestecul de apă și distanța de sursa anoxică de apă. Analizele de voltametrie ciclică a unui depozit din Virginia în care predomină *L. ochracea* și au loc infiltrații ale fierului au arătat că oxigenul pătrunde până la o adâncime de 2 – 3 mm în timp ce pentru gradientul de Fe(II) situația este inversă (Druschelși colab., 2008). Studiul a mai demonstrat că apa din acest depozit are un profil geochemic complex în care sunt prezenți manganul, Fe(III) și diferite varietăți de sulfuri de fier. Măsura în care biologia ferobacteriilor afectează geochemia și viceversa rămâne să fie elucidată.

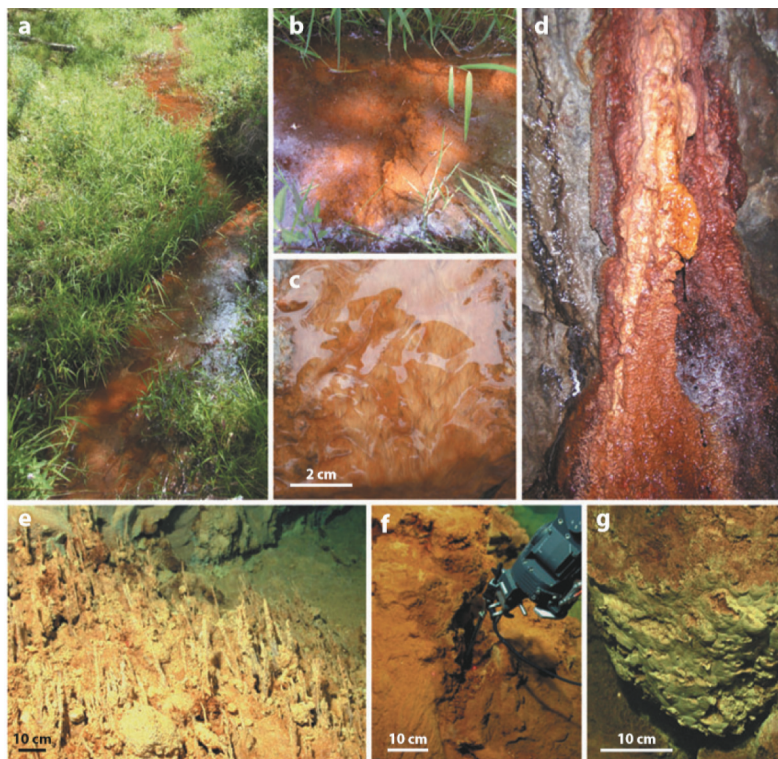


Fig.1. Situri ocupate de ferobacterii. a) scurgeri de apă dulce conținând fier într-o zonă umedă din Maine. b) închiderea depozitului microbial de fier cu aspect lânos de la punctul a). c) depozit de fier compus din ferobacterii în pârâu bogat în fier cu curgere rapidă. d) depozit de hidroxid de fier pe pereții unei mine care este alimentat de o pânză freatică cu pH neutru bogată în Fe(II). e) depozit de fier asociat cu izbuc hidrotermal difuz la vulcanul Loihi Seamount (adâncimea minimă (mbsl) 1300 m); se observă structurile oxizilor asemănătoare unui șemineu. f) izbuc cu flux concentrat la vulcanul Loihi Seamount ( $T = 50^{\circ}\text{C}$ ) înconjurat de depozit de fier cu aspect lânos. g) imagine de închidere a unui alt depozit de fier la vulcanul Loihi asociat unui izbuc focusat; se observă textura oxizilor (după Emerson și colab., 2010)

## CIRCUITUL FIERULUI

Deoarece ferobacteriile se dezvoltă la interfața oxic-anoxic, oxizii biogeni pe care ele îi produc determină cel mai adesea apariția unui mediu anaerob în care reducerea fierului este activă. Circuitul fierului are implicații pentru remobilizarea metalelor sau a compușilor organici legați la oxizii de fier. O serie de studii au arătat că hidroxidul de fier produs de către ferobacterii constituie un substrat foarte bun pentru reducerea bacteriană a fierului în apele dulci, în apele marine și în rizosferă. Modelele conceptuale au demonstrat o legătură între activitatea microorganismelor fier oxidante și fier reducătoare iar studii recente asupra infiltrațiilor în pânza freatică terestră au demonstrat această legătură. În acest caz, în zona anaerobă, reducerea resturilor de fier de origine biogenă conduce la obținerea de oxizi, reciclându-se o cantitate semnificativă de Fe(II) pentru reoxidare. Un alt studiu recent având ca obiect depozitele marine de fier microbial a arătat că bacteriile fier reducătoare sunt prezente și se dezvoltă foarte bine în prezența oxizilor biogeni, însă aceste bacterii sunt limitate de disponibilitatea carbonului organic din acest sistem oligotrof (Emerson, 2009).

## FEROBACTERIILE ÎN ANTICHITATE

Ca urmare a activității metabolice în urma căreia rezultă pendunculi mineralizați și teci mineralizate, ferobacterii ca *Mariprofundus*, *Gallionella* și *Leptothrix* au lăsat urme distinctive

înregistrate în fosile (Little și colab., 2004). Au fost raportate astfel de structuri dintr-o gamă largă de habitate. Imaginile petrografice ale pedunculilor unor tulpini similare cu *Mariprofundus*, vechi de 350 milioane de ani, asociați cu un vent hidrotermal antic sunt imperceptibile la organismele din zilele noastre. Analiza unor formațiuni de fier din Gunflint (Anglia) vechi de 1,9 miliarde de ani au arătat de asemenea, structuri care se aseamănă cu cele ale ferobacteriilor moderne. Chiar dacă aceste analize morfologice sugerează că ferobacteriile pot avea o origine ancestrală, deocamdată nu există biomarkeri organici pentru ferobacteria care să poată furniza consolidări biochimice ale dovezilor morfologice. Pe de altă parte, chiar dacă au fost construiți arbori filogenetici pe baza SSU ARNr, sunt disponibile foarte puține cunoștințe despre evoluția moleculară a acestor organisme. Perioadele atât cea care a precedat cât și în timpul evenimentului mării oxidări când a fost o creștere dramatică a oxigenării atmosferei Pământului, aproximativ cu 240 milioane de ani în urmă (Sessions și colab., 2009), ar fi fost favorabile pentru dezvoltarea ferobacteriilor microaerofile. În aceeași perioadă, se consideră că Oceanul Planetar ar fi fost anoxic și bogat în Fe(II), cu o concentrație de O<sub>2</sub> atmosferic reprezentând o parte din nivelul actual. În același timp cu această dinamică a oxigenului din timpul perioadei Archaean s-au format depozite mari de oxizi de fier, în primul rând sub forma benzilor de fier geologice. Geneza acestor formațiuni reprezintă un alt episod puțin înțeles din istoria Pământului, dar sunt o serie de dovezi care arată că viul a jucat un rol important. Din punct de vedere microbiologic, întrebarea care se pune este ce rol au jucat ferobacteriile în timpul acestor epoci când Fe(II) a existat din abundență, iar oxigenul a fost prezent la concentrații care favorizează dezvoltarea lor.

## STRUCTURI HIDROENERGETICE STUDIAȚE

### **Barajul Dridu – râul Ialomița**

Barajul Dridu este situat pe valea Ialomiței în partea de vest a orașului Urziceni și în partea de nord a Platformei Moesice. Zona în care acesta este situat este o zonă geodinamic active care se definește de prezența barajului în compartimentul de nord-est al faliei Intra-Moesice, la o distanță de cca 5–7 km și înconjurat în partea de nord, la aproximativ 20 km, de falia Bărăitaru. Caracterul compozit și mișcările pe verticală ale faliei active Intra-Moesice au dus la coborârea bazei Neogenului cu aproximativ 600 m în partea de nord – vest iar din Pliocenul superior cu aproximativ 200 m (Polonic și colab., 2005).

De asemenea, această falie se caracterizează și prin mișcări transcurrente senestre, similar mecanismului în focar al cutremurului de la Plopeni din 08.02.1975 care a avut o magnitudine de 4,6 (Cornea și Polonic, 1979). Astfel, construcția hidroenergetică de la Dridu se află într-o zonă care se poate caracteriza prin mișcări crustale recente pozitive de +1 mm/an (Polonic și colab., 2005). Conform datelor din literatura în raport cu standardul de zonare seismică (SR 11100/1-1993 MSK), barajul de la Dridu se într-o zonă de seismicitate I = 8, fiind încadrat în zona C din punct de vedere al coeficientului K<sub>s</sub> = 0,20 (Polonic și colab., 2005).

Acumularea Dridu (râul Ialomița) are o capacitate normal proiectată de 45 mil. mc și este situată la 700 m amonte de confluența cu râul Prahova. Este alcatuită din baraj frontal și baraj de închidere, descărcător de ape mari, priză de apă industrială, canal evacuator de ape mari, sistem de drenaj, apărări de maluri și centrală electrică (Revista Construcțiilor, 2013). Lucrările

de construcție a acumulării au fost demarate în anul 1977 iar în anul 1986 barajul a fost dat în folosință la jumătate din capacitatea sa. În anul 1988, construcția hidrotehnică de la Dridu a fost dată în folosință la întreaga capacitate.

În raport cu date din literatura de specialitate (Neculauși colab., 2016) lacul de acumulare Dridu este situat la 70 m altitudine, are o suprafață de 9,96 km<sup>2</sup> și un volum total la viitură de 60 mil. mc. Adâncimea medie a lacului este estimată la aproximativ 6 m iar rata de evaporare este de 10% (Neculau și colab., 2016).

Pe pereții din beton ai galeriei barajului se observă numeroase infiltrații cu un produs care poate fi considerat consecința unor reacții de alcalii agregate (Fig.2 a, b, c), fenomen menționat și în literatura de specialitate (Voinitchi și colab., 2008).

## FRECVENȚĂ ȘI LOCURI DE PRELEVARE PROBE

Analiza în teren s-a realizat în luna decembrie 2016 și în lunile februarie și martie 2017. În urma observațiilor realizate la fața locului se constată colonizarea la suprafața digului a structurilor din beton cu diverse specii litofile de licheni și mușchi. Dezvoltarea acestora este normală având în vedere condițiile de umiditate ridicată și intensitate mare a luminii solare într-un spațiu deschis și cu o elevație ridicată față de terenul adiacent pe care este situat digul. Aceste organisme, chiar dacă au o dezvoltare intensă, nu au o strategie de creștere în profunzime ci doar la suprafața substratului, neafectând structura de rezistență a digului. De asemenea, în zona protejată de administrația barajului prin turnarea unui strat de rășină epoxidică nu se observă apariția de organisme.

Situația înregistrată la nivelul subteran al construcției hidrotehnice se prezintă cu totul diferit față de cea constatată la exterior. La acest nivel, condițiile de umiditate excesivă, lipsa de lumină, temperatura aproximativ constantă de 10 grade, pH-ul variabil între 7 și 10, infiltrațiile de apă prin pereții din beton care prezintă un anumit grad de porozitate, precum și o sursă de mediu (apa lacului de acumulare, sedimente, eventuale instalații de conducte, tubulaturi) precum și structura armată metalică au întreținut și dezvoltat masiv un produs biologic vizibil. La o analiză macroscopică, acesta se prezintă ca un strat mălos, de culoare roșiatic-brun, cu miros puternic de rugină, în unele zone acesta ajungând la o culoare neagră, cu aspect de degradare. Pe pereții din beton erau numeroase infiltrații cu acest produs, atât de culoare roșiatică cât și albicioasă, care forma un aspect de peșteră, cu o crustă groasă pe alocuri, sau formațiuni în formă de stalactite de dimensiuni mici (10-20 cm), sugerând mobilizarea din pereți a calciului sau a diverselor minerale conținute în acestea, cel mai probabil compuși ai Fe.

Aspecte ale locurilor din care s-au prelevat probele analizate precum și o imagine de ansamblu a zonei adiacente barajului se regăsesc în imaginile de mai jos (Fig.2).

## METODE DE INVESTIGARE

*Analiza microscopică* s-a efectuat prin tehnica de microscopie inversată planctonică cu ajutorul unui microscop Zeiss Axiovert, cu obiective 40x, fără colorare. De asemenea, o serie de analize microscopice (vizualizare frotiuri, colorația Gram) au fost efectuate prin microscopie optică folosind microscopul Zeiss Axio-Scope A1.

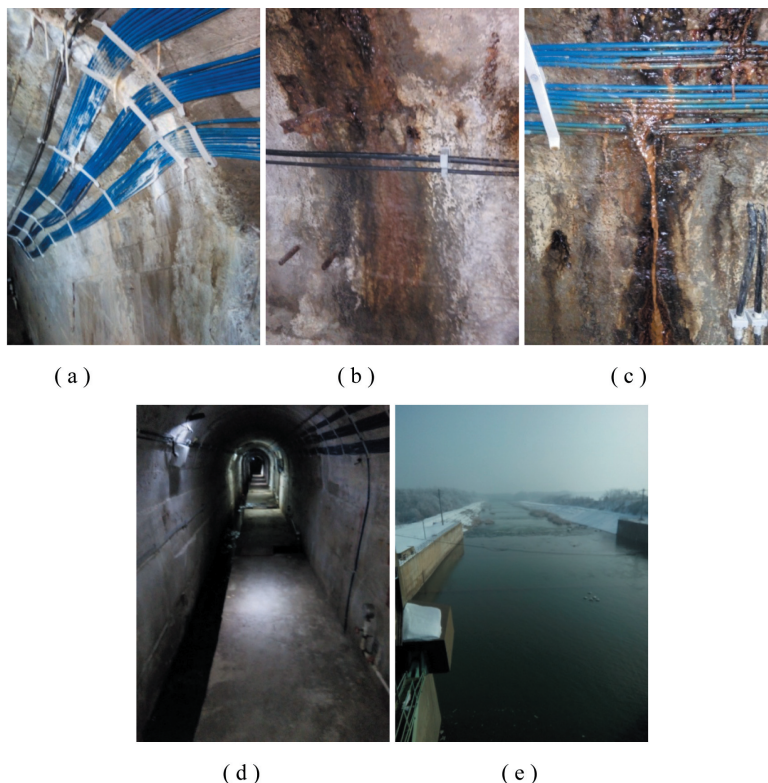


Fig. 2. Aspectul spaniilor din care au fost prelevate probele (a – d) și a zonei de ansamblu adiacentă barajului (e).

Pentru *investigațiile microbiologice* au fost realizate diluții seriale care au fost însămânțate pe medii specifice: geloză, Winogradsky, YGC, mediu Cartof, mediu Levine. Probele au fost incubate la temperaturi corespunzătoare iar interpretarea rezultatelor s-a realizat la 48 ore de la însămânțare.

*Compoziția chimică* a probelor analizate a fost evidențiată utilizând Spectrometrul de fluorescență X-Ray Supermini (Rigaku Corporation, Japonia) folosind metoda semicantitativă de analiză a elementelor în atmosferă de heliu conform instrucțiunilor producătorului. Aproximativ 10 ml probă au fost utilizați pentru efectuarea analizelor (Neagu și colab., 2014). Conținutul elementelor chimice a fost exprimat în procente de masă (din cantitatea de probă analizată).

*Capacitatea microorganismelor* prezente în probele investigate, de a degrada anumite substanțe macromoleculare, a fost evidențiată prin analiza enzimelor extracelulare  $\alpha$ - și  $\beta$ -glucozidaza, fosfataza alcalină și aminopeptidaza. În primele trei cazuri s-a folosit ca substrat para-nitrofenol iar în ultimul caz para-nitroanilina. Protocolul a fost descris în lucrările anterioare (Pacesilă și colab., 2014)

## REZULTATE

Pentru probele prelevate în luna decembrie 2016 și în luna februarie 2017 rezultatele au fost prezentate prin Raportul de cercetare nr. 1453 din 22 mai 2017. În proba prelevată din galeria barajului în luna mai 2017, s-a constatat prezența unei comunități bine dezvoltate de bacterii filamentoase aparținând grupului de bacterii fieroxidante *Sphaerotilus/Leptothrix* (Fig.3).

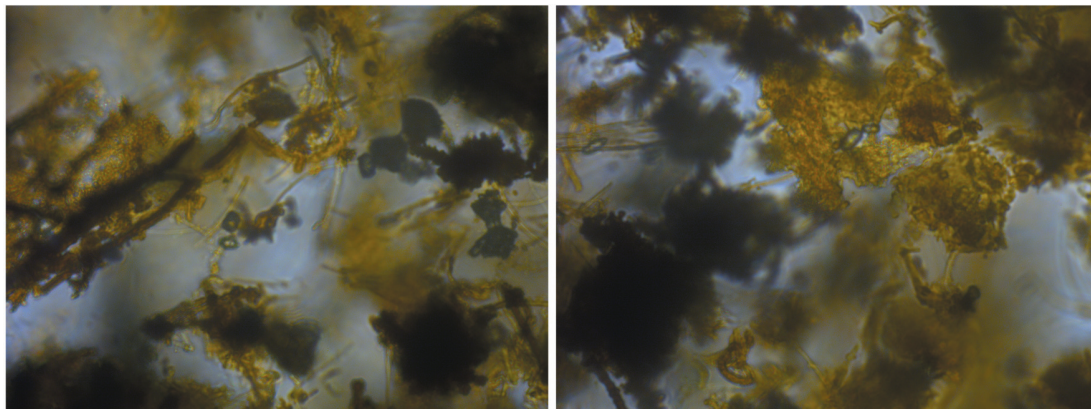


Fig.3. Aspecte microscopice cu specia dominantă (*Leptothrix sp.*) din probele prelevate.

Aparte de acest grup dominant, au fost identificate bacterii heterotrofe ( $9 \times 10^4$  u.f.c.), coliformi totali ( $2 \times 10^3$  u.f.c.), fungi și ferobacterii ( $2.8 \times 10^2$  u.f.c.). Valorile medii ale acestor categorii de microorganisme sunt prezentate în tabelul 1 iar aspectul culturilor se poate observa în figura 4. În comparație cu probele analizate în luna februarie, la cele prelevate în luna mai s-a observat o dezvoltare mai bună a mai multor tipuri de fungi, între care predomină genurile *Aspergillus*, *Penicillium* și *Cladosporium* (Fig.4).

Microorganismele care utilizează fierul (ferobacteriile sau bacteriile feruginoase) oxidează forma feroasă ( $\text{Fe}^{2+}$ ) la forma ferică ( $\text{Fe}^{3+}$ ). Ele constituie un grup fiziologic relativ puțin studiat, heterogen din punct de vedere sistematic, descoperite de Winogradsky în 1888, putând fi clasificate în două categorii, și anume ferobacterii filamentoase și ferobacterii nefilamentoase.

Cele filamentoase sunt pluricelulare și formează trihomi lungi înconjurați de o teacă organică, mucilaginoasă, impregnată cu hidroxid feric sau hidroxid de mangan tetravalent [ $\text{MnO}(\text{OH})_2$ ]. Trihomiile pot da ramificații false (unele celule se divid în direcție laterală și formează un trihom nou pe cel vechi). Cele mai cunoscute sunt *Sphaerotilus natans*, care depune fierul sub forma de hidroxid printr-un mecanism nespecific și nu depune nicio dată mangan, *Leptothrix sp.* care posedă o teacă de inveliș și o matrice organică formată din polimeri în care se pot impregna fierul și manganul, acesta din urmă fiind asociat și cu membrana externă (*Leptothrix discophora*). Aceste bacterii se pot dezvolta în masă și pot bloca conductele de apă, canalele de drenaj, sistemele de irigație (Ford, 1978). De asemenea, se pot întâlni și în sursele de apă potabilă, puțuri, fântâni, putând fi implicate în deteriorarea calității apei.

Ferobacteriile nefilamentoase oxidează  $\text{Fe}^{2+}$  formând  $\text{Fe}(\text{OH})_3$ . Hidroxidul feric rezultat în urma activității microorganismelor este insolubil în apă și colorează apele în portocaliu.

Ferobacteriile sunt foarte importante din punct de vedere biogeochimic deoarece participă la formarea zăcămintelor de fier (datorită multiplicării intense), asigură circuitul biogeochimic al fierului în natură și sunt implicate în deteriorarea deșeurilor care conțin compuși ai acestui metal.

Din punct de vedere al riscurilor pentru sănătatea publică, cu toate că ferobacteriile pot duce la alterarea calităților organoleptice ale apei (gust, miros, aspect fizic), nu există un risc pentru sănătate asociat acestor microorganisme. De asemenea, prezența fierului în apa potabilă nu are efecte asupra sănătății. În privința conținutului de mangan, concentrații ridicate (0,84



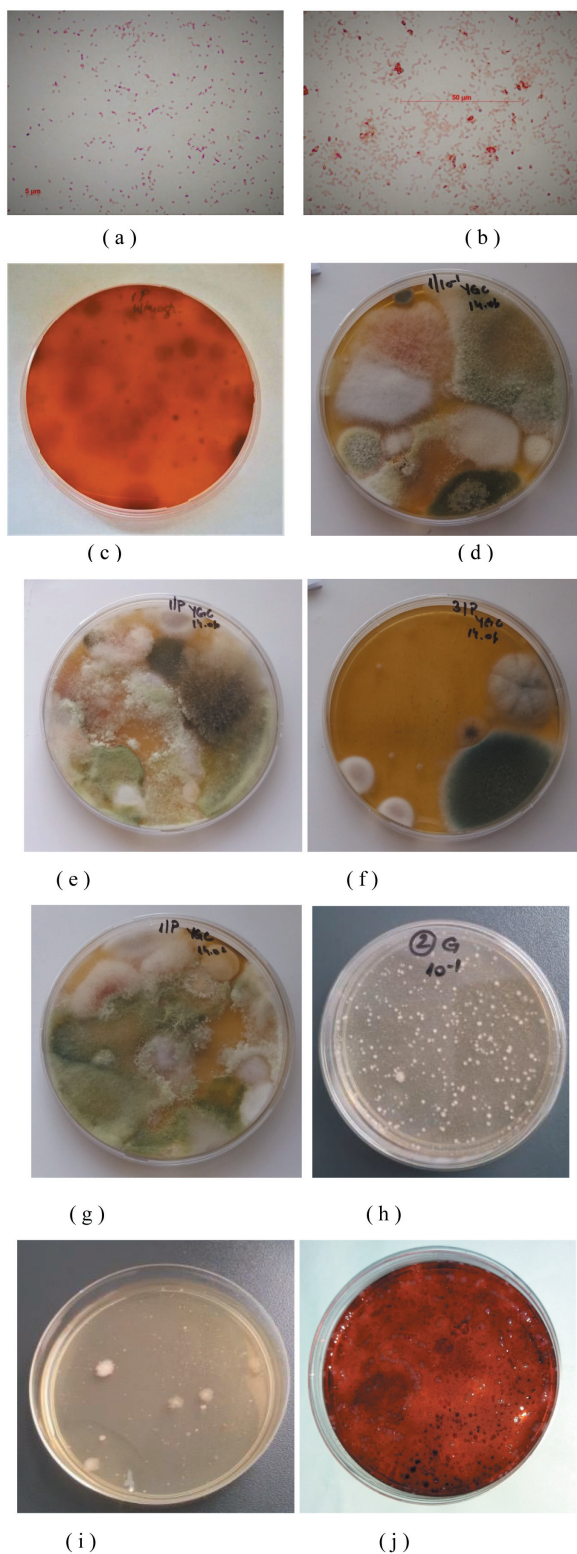


Fig.4. Aspecte microscopice cu specia de ferrobacterii (a,b,c), fungi (d, e, f, g) bacterii heterotrofe (h, i) si coliformi totali (j) din probele prelevate.

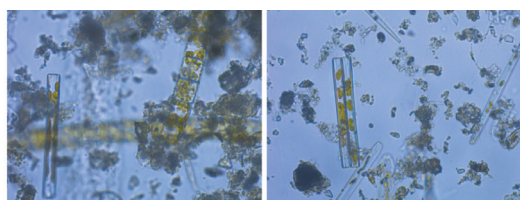
mg/L) ale acestui metal pot conduce la unele afecțiuni (WD-DWGB-3-21, Concord, New Hampshire, S.U.A.).

Tabelul 1 - Valorile medii ale tipurilor de microorganisme evidențiate în probele investigate. u.f.c. = unități formatoare de colonii/ml; + = present.

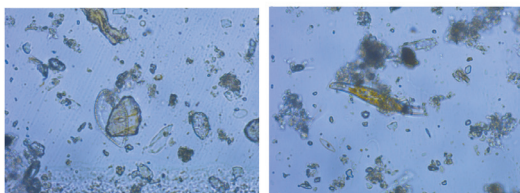
Coliformi totali	$2 \times 10^3$ u.f.c.
Bacterii heterotrofe	$9.3 \times 10^4$ u.f.c.
Fungi	+
Ferrobacterii	$2.8 \times 10^2$ u.f.c.

În proba prelevată din canalul colector extern se vizualizează o comunitate fitoplanctonică bine dezvoltată, formată din alge aparținând claselor *Bacillariophyceae* și *Xantophyceae*. Aspectul microscopic al acestora precum și denumirea sunt redată în figura nr. 5.

Analiza activităților enzimatică extracelulare implicate în degradarea unor substanțe de natură polimerică a evidențiat o scădere a valorilor medii a acestora în funcție de momentul prelevării probelor din galeria barajului Dridu. Astfel, valorile cele mai ridicate au fost înregistrate în cazul probelor prelevate în luna decembrie, urmată de o scădere importantă a acestora pentru sesiunea de prelevare din februarie (peste 50% din valoare), aspect care s-a menținut în linii mari și pentru sesiunea de prelevare din mai, cu excepția enzimei aminopeptidază care a înregistrat o creștere foarte slabă (Fig.6). Acest aspect, care în aparență pare să fie contrar evoluției normale a activității biologice în funcție de sezonul de prelevare a probelor, poate fi atribuit intervenției factorului uman care a îndepărtat o cantitate semnificativă din masa biologică prezentă în galeria barajului. Aspectul de îndepărtare fizică a fost constatat vizual de către personalul care a efectuat prele-

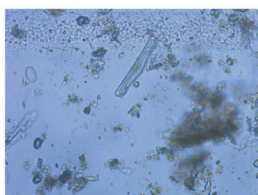


*Synedra ulna* și *Aulacoseira granulata*    *Synedra ulna* și *Nitzschia* sp.

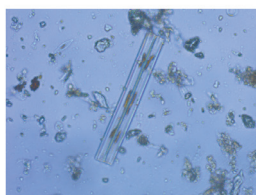


*Surirella ovalis*

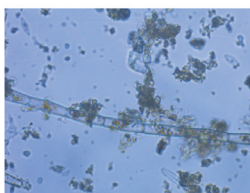
*Gyrosigma acuminatum*



*Rhopalodia gibba*



*Synedra ulna*



*Tribonema utriculosum* - Xantophyceae

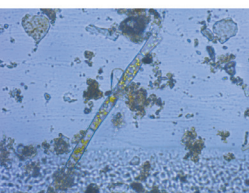


Fig.5. Specii de alge identificate în probele analizate.

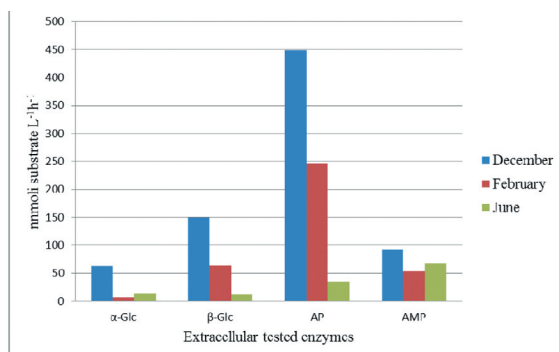


Fig. 6. Activitățile enzimatiche extracelulare (valori medii) ale probelor prelevate din galeria barajului: α-Glc = α-glucozidază; β-Glc = β-glucozidază; AP = fosfataza alcalină; AMP = aminopeptidază. Substratul folosit: p-nitrophenol (α-Glc; β-Glc și AP); p-nitroaniline (AMP)

varea probelor atât în luna februarie 2017 cât și în luna mai 2017.

Analiza compoziției chimice a celor patru probe prelevate în luna mai a evidențiat gruparea elementelor chimice identificate în trei categorii, și anume: elemente chimice întâlnite în toate probele analizate, elemente chimice întâlnite frecvent în probele analizate și elemente chimice regăsite sporadic în probele analizate. O clasificare similară s-a putut elabora și pentru probele prelevate în sesiunea din luna februarie. Diferența între probele recoltate în cele două sesiuni este reprezentată de prezența stronțului în cantități mai mici în probele prelevate în sesiunea din luna mai. De asemenea, manganul a fost detectat doar în probele prelevate din galeria barajului. Acest lucru, împreună cu celelalte observații poate să susțină faptul ca ferobacteria predominantă (*Leptothrix* sp.) nu provine din cursul de apă al râului Ialomița, ci a fost introdusă în galeria barajului și în structura barajului fie prin vector uman, fie animale (rozătoare) sau insecte care au pătruns în galerie. O caracteristică ce definește compoziția chimică este prezența calciului (ca urmare a reacției de alcalii agregate observată cu precădere în bolta galeriei barajului) precum și a fierului și manganului (ca urmare a acțiunii ferobacteriilor, remarcată atât în bolta galeriei barajului cât și în zona piezometrelor și a canalelor colectoare aferente). Datele sunt centralizate în tabelele nr. 2, 3 și 4. Se poate observa că elementele comune tuturor probelor sunt siliciul, calciul, fierul, aluminiul, potasiu și clor iar dintre elementele frecvent întâlnite în probele prelevate în luna mai se remarcă prezența manganului în cantități mai mari. Celelalte elemente cu frecvență mai ridicată sunt zinc, titan, lantan, fosfor și sulf. Printre elementele întâlnite sporadic în

probele analizate se remarcă prezența unei depuneri de culoare neagră (rezultatul metabolismului intens al ferobacteriilor, cumulat cu procesul chimic de coroziune) în zona piezometrelor din galeria barajului, alături de stronțiu și a altor elemente radioactive precum poloniu.

Tabelul 2 – Elemente chimice întâlnite în toate probele analizate; Compoziția în procente de masă (mass%)

mass%	Proba 1 Canal colector extern (dreapta amonte)	Proba 2 Supapă evacuare infiltrații din digul exterior (dreapta amonte)	Proba 3 Galeria barajului - piezometru	Proba 4 Depunere neagră din galeria barajului – zona piezometrelor
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	5.68	7.63	1.82	2.57
SiO <sub>2</sub>	39.37	35.49	5.61	14.27
Cl	0.67	9.45	0.6	0.13
K <sub>2</sub> O	5.73	5.84	1.45	0.62
CaO	18.65	19.07	38.07	14.96
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	16.33	8.95	29.33	11.37

Tabelul 3 – Elemente chimice întâlnite frecvent în probele analizate; Compoziția în procente de masă (mass%)

mass%	Proba 1 Canal colector extern (dreapta amonte)	Proba 2 Supapă evacuare infiltrații din digul exterior (dreapta amonte)	Proba 3 Galeria barajului - piezometru	Proba 4 Depunere neagră din galeria barajului – zona piezometrelor
ZnO		6.19	0.93	0.32
MnO	-	-	17.17	47.43
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0.55	-	0.76	-
SO <sub>2</sub>	0.66	-	0.28	-
La <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	6.33	-	-	2.19
SrO	-	-	0.88	0.44
TiO <sub>2</sub>	2.2	-	-	0.94

Tabelul 4 – Elemente chimice întâlnite sporadic în probele analizate; Compoziția în procente de masă (mass%)

mass%	Proba 1 Canal colector extern (dreapta amonte)	Proba 2 Supapă evacuare infiltrații din digul exterior (dreapta amonte)	Proba 3 Galeria barajului - piezometru	Proba 4 Depunere neagră din galeria barajului – zona piezometrelor
NiO	-	-	-	0.02
CuO	-	-	-	0.43
Ga <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0.67	-	-	-
As <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	-	-	1.04	-
SeO <sub>2</sub>	0.51	-	-	-
ReO <sub>2</sub>	1.40	-	-	-
OsO <sub>4</sub>	1.26	-	-	-
GeO <sub>2</sub>	-	7.37	-	-
Ta <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	-	-	2.05	-
MnO <sub>3</sub>	-	-	-	0.13
Ag <sub>2</sub> O	-	-	-	0.93
CdO	-	-	-	0.50
Sm <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	-	-	-	1.07
Tb <sub>4</sub> O <sub>7</sub>	-	-	-	0.29
WO <sub>3</sub>	-	-	-	0.34
PtO <sub>2</sub>	-	-	-	0.05
Bi <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	-	-	-	0.39
Po	-	-	-	0.38
MgO				0.22

## MĂSURI RECOMANDATE PENTRU IGIENIZAREA STRUCTURILOR AFECTATE:

- îndepărtarea fizică a materialului biologic abundent, diluarea acestuia cu cantități adecvate de apă, aducerea soluției la pH acid pentru 48 de ore apoi neutralizare înainte de deversarea apelor rezultate;
- spălarea cu cantități adecvate de apă a zonelor afectate; apele rezultate în urma spălării se vor colecta, se vor dilua 1/100 L și se vor aduce la pH neutru înainte de deversare;
- tratarea cu săruri de cupru (în zonele în care nu există coroziune);
- tratarea cu ozon și radiații UV B a instalațiilor și structurilor afectate, alternative;
- supravegherea structurilor, atât la suprafață cât și în profunzime, cu metode care să pună în evidență deformări sau modificări ale compoziției betonului la anumite intervale de timp;
- monitorizarea reacției alcalii-agregate observată în galeria barajului și aplicarea soluțiilor tehnice corespunzătoare.

### Barajul Paltinu – râul Doftana

#### *Descrierea generală a structurii hidrotehnice Paltinu*

Acumularea hidroenergetică Paltinu este situată pe valea râului Doftana, la 17 km amonte de vărsarea acestuia în râul Prahova, fiind o construcție în arc, realizată în perioada 1960 – 1971. Înălțimea barajului este de 108 m iar lungimea totală a coronamentului este de 460 m.

Barajul Paltinu a fost construit pentru alimentarea cu apă a zonei industriale adiacente (în

principal orașul Câmpina și municipiul Ploiești) și pentru asigurarea necesarului de apă potabilă pentru zona în care a fost ridicat. Barajul se află în structura Administrației Naționale “Apele Române”, Administrația Bazinală a Apelor Buzău – Ialomița, Sistemul de Gospodărire a Apelor Prahova. Barajul este construit din beton, în dublu arc, respectiv barajul central cu trasaj circular sprijinit pe soclu printr-un rost perimetral și care se închide la coronamentul din partea dreaptă cu o culee de tip greutate iar în partea stânga prin racord la o aripă cu trasaj parabolic cu închidere în versant printr-un baraj de greutate (Fig.7).

Barajul Paltinu este localizat la 18 km de orașul Câmpina, pe teritoriul comunei Brebu, iar lacul de acumulare format, cu o suprafață de circa 216 ha, are un volum util de 47 milioane mc

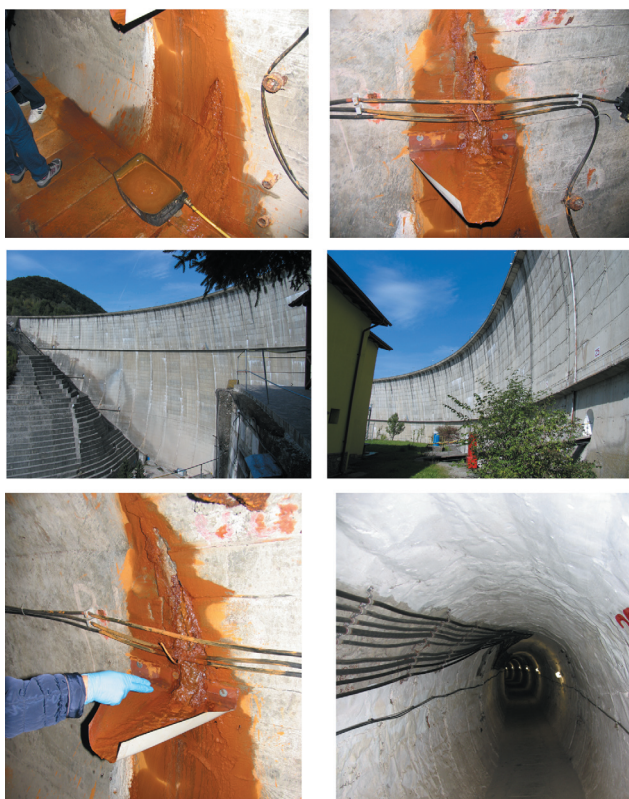


Fig.7. Aspectul spațiilor de unde au fost prelevate probele analizate în prezenta lucrare, al barajului și galeriei acestuia.

și un volum brut de 48 milioane mc. Volumul de atenuare la unda de viitura de 1% este de 5 milioane mc.

Pe pereții de beton ai barajului, în anumite zone se pot observa infiltrații în urma cărora se formează un produs ce poate fi considerat consecință a reacției de alcali-agregate, fenomen ce are loc în mod natural în structura betonului utilizat pentru construcțiile hidrotehnice (Foto 1). Produsul este de culoare albă și are grosimi variabile, pe alocuri de 10 – 20 cm, fapt care sugerează mobilizarea calciului sau a altor minerale din beton, cel mai probabil și a compușilor fierului. De asemenea, în anumite zone unde infiltrația apei este mai accentuată se observă dezvoltarea în masă a unui produs biologic, de natură bacteriană, colorat în ruginiu, cu aspect mâlos, leșios la pipăit, cu miros caracteristic de rugină și umezeală.

#### *Evidențierea și cuantificarea microorganismelor care se dezvoltă în structura barajelor*

Au fost aplicate metodele similare cu cele folosite la analiza probelor de la barajul Dridu.

#### *Izolarea și purificarea ferobacteriilor*

Coloniile care s-au dezvoltat pe mediu Winogradsky având aspect morfologic caracteristic ferobacteriilor au fost preluate în mediile bulion și LB lichid și incubate la 30°C, timp de 3 zile. Tulpinile au fost purificate ulterior prin tehnica epuizării ansei pe mediul LB agarizat și geloză.

#### *Examinarea microscopică a ferobacteriilor*

Observații de *microscopie electronică* au fost efectuate utilizând microscopul electronic cu baleiaj (SEM - JEOL JSPM 5200, Japonia). În acest caz, probele au fost preparate utilizând biomasă obținută din culturi în vârstă de 24 ore, prin centrifugarea acestora timp de 5 minute, la 8500 rpm, urmată de spălare cu apă distilată sterilă și recentrifugare. În vederea examinării, probele au fost metalizate folosind sputter coater (Jeol auto fine coater, JFC-1300). Investigațiile SEM au fost efectuate în condiții de vid înaintat.

#### *Influența temperaturii asupra creșterii tulpinii de ferobacterie selectată*

Determinarea influenței temperaturii s-a efectuat prin cultivarea acesteia la diferite valori de temperatură: 4°C, 15°C, 20°C, 30°C, 37°C, respectiv 45°C, timp de 8 zile și determinarea spectrofotometrică a densității optice la 660 nm, la intervale de 24 ore.

#### *Caracterizarea biochimică a ferobacteriilor (hidrolaze extracelulare)*

*Capacitatea microorganismelor* prezente în probele investigate de a *degrada* anumite substanțe macromoleculare a fost evidențiată prin analiza enzimelor extracelulare implicate în hidroliza amidonului, inulinei, tween 80, cazeinei, pectinei și gelatinei. În acest sens, mediul de cultură (geloză) a fost modificat prin adăugarea în compoziție a substratului.

## REZULTATE

### *Evidențierea și cuantificarea microorganismelor care se dezvoltă în structura barajelor*

În probele prelevate din galeria barajului Paltinu s-a constatat prezența unei comunități bine dezvoltate de bacterii filamentoase aparținând grupului de bacterii fier-oxidante din genurile *Sphaerotilus* / *Leptothrix*.

Aparte de acest grup dominant au fost identificate bacterii heterotrofe ( $2,9 \times 10^2$  UFC/ml), coliformi totali ( $4,3 \times 10^3$  UFC/ml), fungi și ferobacterii ( $1,9 \times 10^3$  UFC/ml). Aspectul culturilor se

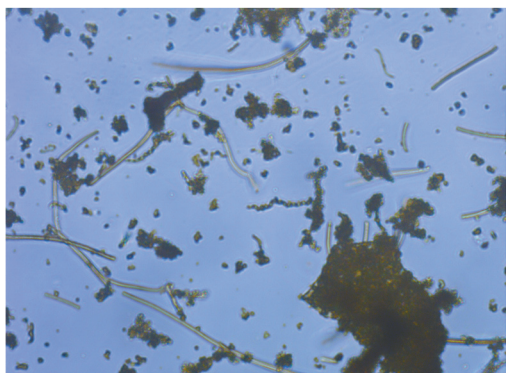
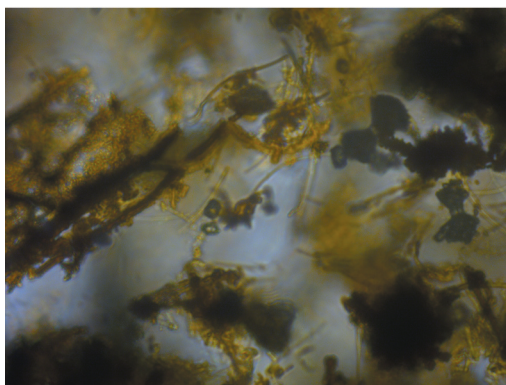


Fig.8. Aspect microscopic al uneia dintre probele investigate (40x)

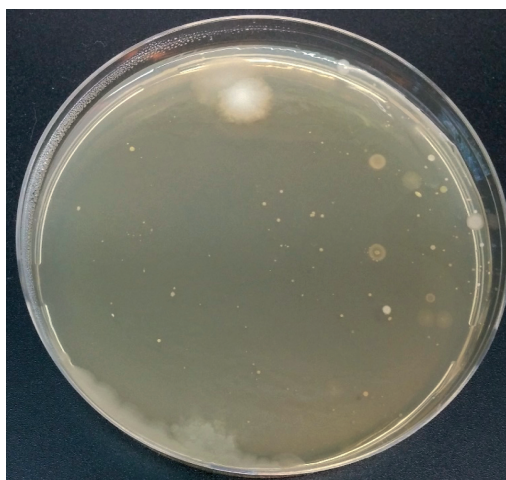


Fig.9 Determinarea numărului total de bacterii heterotrofe aerobe pe mediu de cultură agarizat (geloză).

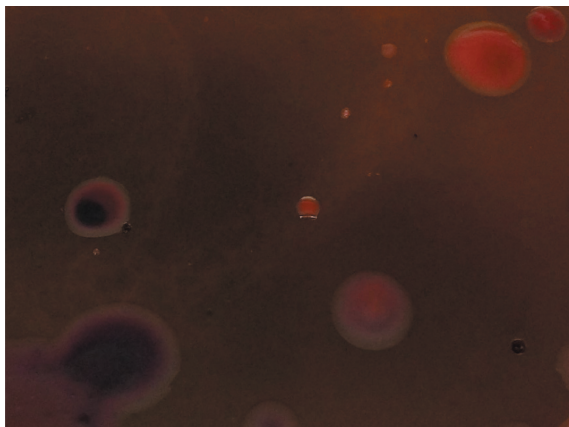


Fig.10. Determinarea numărului probabil de coliformi totali din probă, pe mediul Levine.

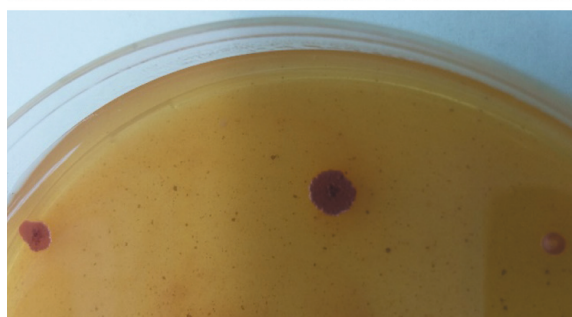
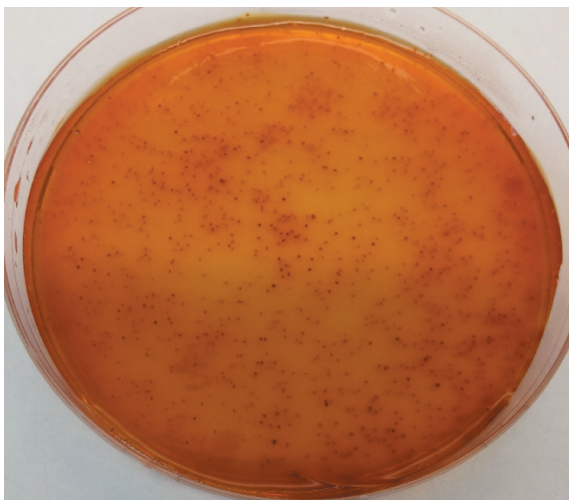


Fig.11 Determinarea numărului probabil de ferobacterii din probă, pe mediul Winogradsky.



Fig.12. Identificarea prezenței mai multor specii de fungi în probele prelevate (mediul YGC).

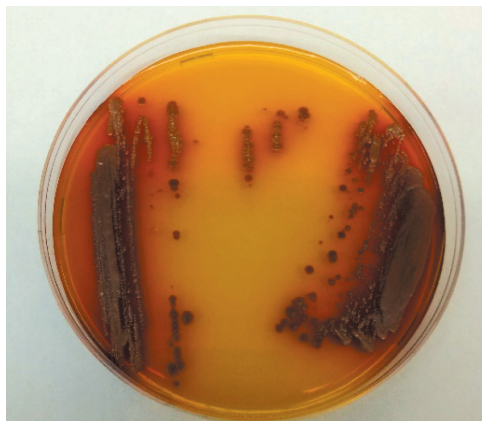


Fig.13 Aspectul coloniilor de ferobacterii dezvoltate pe mediul Winogradsky agarizat.

poate observa în fotografiile inserate în text. În comparație cu probele analizate în luna aprilie, la cele prelevate în luna iunie s-a observat o dezvoltare mai bună a mai multor tipuri de fungi, între care predomină genurile *Aspergillus*, *Penicillium* și *Cladsporium*.

#### *Analiza fizico-chimică a probelor (pH, compoziție chimică prin XRF)*

Valoarea de pH a probelor prelevate de la barajul Paltinu s-a încadrat în intervalul 6,6-7,1. Prin analiza XRF a probelor a fost confirmată existența unor procente înalte de Fe, Ca și Si ce favorizează dezvoltarea ferobacteriilor.

Tabel 6. Compoziția chimică a probei de apă prelevată de la barajul Paltinu

	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	SiO <sub>2</sub>	SO <sub>3</sub>	Cl	K <sub>2</sub> O	CaO	Cr <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	CuO	ReO <sub>2</sub>
	mass%	mass%	mass%	mass%	mass%	mass%	mass%	mass%	mass%	mass%
Paltinu apa	5.7081	19.261	2.5256	3.9627	15.0638	18.6893	5.8742	15.9888	4.6207	8.3058

#### *Izolarea și purificarea ferobacteriilor*

Pe mediul Winogradsky, după 5-7 zile de incubare la 30°C, s-au dezvoltat colonii cu aspect morfologic caracteristic ferobacteriilor, de culoare roșie-grena și luciu metalic.

După incubarea culturilor la 30°C, timp de 3 zile pe geloză, respectiv LB agarizat, s-a constatat modificarea unor aspecte morfologice ale tulpinilor, în funcție de mediul de cultură uti-

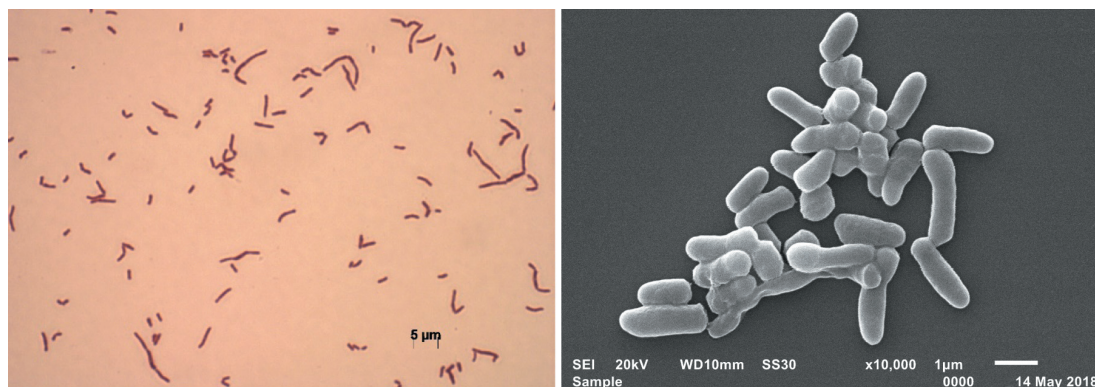


Fig.14. Imagini de microscopie optică ale froturilor colorate Gram (100x) și aspectul SEM al unei tulpini bacteriene izolate.

lizat: pe mediul LB, tulpinile au crescut bine, dezvoltând colonii cu profil plat, rugoase, mate, culoare alb-crem, în timp ce pe geloză, coloniile au avut un aspect morfologic diferit, fiind bombate, lucioase, cu margini întregi, profil bombat, culoare albă.

### Examinarea microscopică a ferobacteriilor

În urma analizei microscopice a frotiurilor colorate prin tehnica de colorare Gram s-a constatat ca tulpinile de ferobacterii izolate sunt reprezentate prin bacili Gram pozitivi, izolați sau cu tendință de grupare în lanțuri, încorporați într-o teacă comună.

### Caracterizarea biochimică a ferobacteriilor (hidrolaze extracelulare)

Tabel 7. Evaluarea capacității de sinteză a unor enzime de către una din tulpinile de ferobacterii izolate.

Caracter fenotipic	Rezultat
Oxidaza	Negativ
Catalaza	Pozitiv
Hidroliza gelatina	Negativ

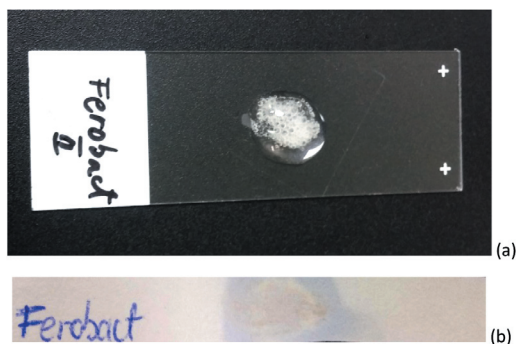


Fig. 15. Testarea activității catalazice (a) și oxidazice (b) a uneia din tulpinile de ferobacterii izolate.

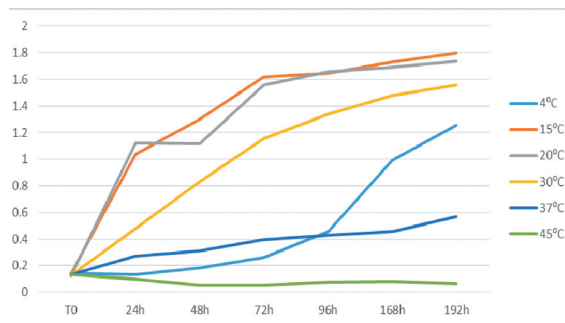


Fig. 16. Influența temperaturii asupra creșterii unei tulpini de ferobacterie izolată de la barajul Paltinu.

### Influența temperaturii asupra creșterii tulpinii de ferobacterie

S-a constatat că tulpina de ferobacterie selectată s-a dezvoltat cel mai bine în intervalul de temperatură 15-20 °C.

## CONCLUZII

Rezultatele obținute în urma analizei XRF a probelor prelevate (Tabel 6) au arătat că acestea prezintă un conținut ridicat de Fe, K, Ca și Si, o compoziție chimică în baza căreia se justifică apariția și dezvoltarea ferobacteriilor, respectiv a microorganismelor care au capacitatea de a metaboliza compuși ai fierului, în situl respectiv.

Analiza „*ex situ*” la momentul prelevării probelor a arătat implicarea ferobacteriilor din genul *Leptothrix* în fenomenul de biocoroziune remarcat în structura barajului Paltinu (Fig.7).

Majoritatea tulpinilor izolate sunt catalazo-pozitive și oxidazo-negative, fiind reprezentate prin bacili Gram pozitivi, cu tendință de grupare în lanțuri, fiind acoperiți de o teacă comună.



## BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- ▶ Cornea, I., Polonic, G., 1979. *Date privind seismicitatea si seismotectonica partii de est a Platformei Moesice*, St. Cerc. Geol. Geofiz. Geogr. 17, 167-176.
- ▶ Ford, H., W. 1978. *Fundamental characteristics of slime and ochre clogging in drainage and irrigation systems*. Paper No. 78-2538. Chicago: Winter Meeting American Society of Agricultural Engineers.
- ▶ Neagu S., Enache M., Cojoc R., 2014, *Extracellular hydrolytic activities of halophilic microorganisms isolated from Balta Albă salt lake*, Rom. Biotechnol. Lett., 19, 8951-8958.
- ▶ Neculau, G., Stan, F.I., Alder, M.J., 2016. *The role of evaporation in evaluating the water reserve of Romanian lakes – a case study*, Lucrarile seminarului geografic “Dimitrie Cantemir”, 41, 5 – 15.
- ▶ Păceșilă, I., Cojoc, R., Enache, M., 2014. *Evaluation of Halobacterial Extracellular Hydrolytic Activities in Several Natural Saline and Hypersaline Lakes from Romania*, British Biotechnology Journal 4(5): 541-550.
- ▶ Polonic, G., Zugravescu, D., Toma, I., 2005. *Dinamica recenta a blocurilor tectonice in zonele de amplasament al constructiilor hidroenergetice din Romania*, St. Cercet. Geofizica, 43, 79-93.
- ▶ Schmidt, B., Sanchez, L.A., Fretschner, T., Kreps, G., Ferrero, M.A., Sineriz, F., Szewzyk, U., 2014. *Isolation of Sphaerotilus-Leptothrix strains from iron bacteria communities in Tierra del Fuego wetlands*, FEMS Microbiol Ecol., 90, 454 – 466.
- ▶ Takeda I., 2011. *Recycling of phosphorus resources in agricultural areas using woody biomass and biogenic iron oxides*, In: Matovic, D., ed., *Biomass – detection, production and usage*, InTech, Croatia, 425-440.
- ▶ Voinitchi C.D., Stematiu, D., Voicu, G., Andrei, B., 2008. *Alkali-aggregate reaction diagnosis in concrete structure. A case study – Dridu dam*, Romanian J of Mater., 38, 98-103.
- ▶ <https://www.des.nh.gov/organization/commissioner/pip/factsheets/dwgb/documents/dwgb-3-21.pdf>
- ▶ \*\*\**Cresterea sigurantei in exploatare a barajului si lacului de acumulare Dridu*, Judetul Ialomita, 2013, Revista Constructiilor, nr. 97, pag. 44
- ▶ Armstrong W., 1964. Oxygen diffusion from the roots of some British bog plants. *Nature* 204:801–2
- ▶ Canfield D.E., Thamdrup B., Kristensen E., 2005. *Aquatic Geomicrobiology*. Amsterdam: Elsevier. 640 pp.
- ▶ Carlile M.J., Dudeney A.W.L., 2000. A microbial mat composed of iron bacteria. *Microbiology* 146:2092–93
- ▶ Chan C.S., Fakra S.C., Edwards D.C., Emerson D., Banfield J.F., 2009. Iron oxyhydroxide mineralization on microbial extracellular polysaccharides. *Geochim. Cosmochim. Acta* 73:3807–16
- ▶ Druschel G.K., Emerson D., Sutka R., Suchecki P., Luther G.W., 2008. Low-oxygen and chemical kinetic constraints on the geochemical niche of neutrophilic iron(II) oxidizing microorganisms. *Geochim. Cosmochim. Acta* 72:3358–70
- ▶ Ehrenberg C.G., 1837. Remarks on the real occurrence of fossil infusoria, and their extensive diffusion. *Taylor’s Sci. Memoirs* 1:400–13, plate V
- ▶ Emerson D., 2009. Potential for iron-reduction and iron-cycling in iron oxyhydroxide-rich microbial mats at Loihi Seamount. *Geomicrobiol. J.* 26:639–47
- ▶ Emerson D., Floyd M.M., 2005. Enrichment and isolation of iron-oxidizing bacteria at neutral pH. *Methods Enzymol.* 397:112–23
- ▶ Emerson D., Ghiorse W.C., 1993. Ultrastructure and chemical composition of the sheath of *Leptothrix discophora* SP-6. *J. Bacteriol.* 175:7808–18
- ▶ Emerson D., Moyer C.L., 2002. Neutrophilic Fe-oxidizing bacteria are abundant at the Loihi Seamount hydrothermal vents and play a major role in Fe oxide deposition. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:3085–93
- ▶ Emerson D., Moyer C.L., 2010. Microbiology of seamounts: common patterns observed in community structure. *Oceanography* 23:148–63
- ▶ Emerson D., Revsbech N.P., 1994. Investigation of an iron-oxidizing microbial mat community located near Aarhus, Denmark: field studies. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:4022–31
- ▶ Emerson D., Weiss J.V., 2004. Bacterial iron oxidation in circumneutral freshwater habitats: findings from the field and the laboratory. *Geomicrobiol. J.* 21:405–14

- ▶ Emerson D., Weiss J.V., Megonigal J.P., 1999. Iron-oxidizing bacteria are associated with ferric hydroxide precipitates (Fe-plaque) on the roots of wetland plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:2758–61
- ▶ Emerson D., Fleming E.J., McBeth J.M., 2010. Iron-oxidizing bacteria: an environmental and genomic perspective. *Annu. Rev. Microbiol.* 64: 561–83
- ▶ Ferris F.G., Hallberg R.O., Lyven B., Pedersen K., 2000. Retention of strontium, cesium, lead and uranium by bacterial iron oxides from a subterranean environment. *Appl. Geochem.* 15:1035–42
- ▶ Fortin D., Langley S. 2005. Formation and occurrence of biogenic iron-rich minerals. *Earth Sci. Rev.* 72:1–19
- ▶ Ghiorse W.C., Ehrlich H.L., 1992. Microbial biomineralization of iron and manganese. In *Iron and Manganese Biomineralization Processes in Modern and Ancient Environments*, ed. R.W. Fitzpatrick, H.C.W. Skinner, 21:75–99. Cremlingen-Destedt, Ger.: Catena-Verlag
- ▶ Hedrich S., Schlomann M., Johnson D. B., 2011. The iron-oxidizing proteobacteria. *Microbiology.* 157 (6): 1551–1564.
- ▶ Kato S., Yanagawa K., Sunamura M., Takano Y., Ishibashi J.-I., et al., 2009. Abundance of *Zetaproteobacteria* within crustal fluids in back-arc hydrothermal fields of the Southern Mariana Trough. *Env. Microbiol.* 11:3210–22
- ▶ Konhauser K., 2007. *Introduction to Geomicrobiology*. Malden, MA: Blackwell. 444 pp.
- ▶ Kucera S., Wolfe R.S., 1957. A selective enrichment method for *Gallionella ferruginea*. *J. Bacteriol.* 74:344–49
- ▶ Little C.T.S., Glynn S.E.J., Mills R.A., 2004. Four-hundred-and-ninety-million-year record of bacteriogenic iron oxide precipitation at sea-floor hydrothermal vents. *Geomicrobiol. J.* 21:415–29
- ▶ Mikutta C., Mikutta R., Bonneville S., Wagner F., Voegelin A., et al., 2008. Synthetic coprecipitates of exopolysaccharides and ferrihydrite. Part I: characterization. *Geochim. Cosmochim. Acta* 72:1111–27
- ▶ Miot J., Benzerara K., Obst M., Kappler A., Hegler F., et al., 2009. Extracellular iron biomineralization by photoautotrophic iron-oxidizing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:5586–91
- ▶ Mouchet P., 1992. From conventional to biological removal of iron and manganese in France. *J. Am. Water Works Assoc.* 84:158–67
- ▶ Mulder E.G., van Veen W.L., 1963. Investigations on the *Sphaerotilus-Leptothrix* group. *Anton. Leeuw.* 29:121–53
- ▶ Neubauer S.C., Emerson D., Megonigal J.P., 2008. Microbial oxidation and reduction of iron in the root zone and influences on metal mobility. In *Biophysico-Chemical Processes of Heavy Metals and Metalloids in Soil Environments*, ed. A. Violante, P.M. Huang, G.M. Gadd, pp. 339–71. Research Triangle Park, NC: Int. Union Pure Appl. Chem.
- ▶ Neubauer S.C., Toledo-Duraacuten G.E., Emerson D., Megonigal J.P., 2007. Returning to their roots: iron oxidizing bacteria enhance short-term plaque formation in the wetland-plant rhizosphere. *Geomicrobiol. J.* 24:65–73
- ▶ Omeregie E.O., Mastalerz V., de Lange G., Straub K.L., Kappler A., et al., 2008. Biogeochemistry and community composition of iron- and sulfur-precipitating microbial mats at the Chefren Mud Volcano (Nile Deep Sea Fan, eastern Mediterranean). *Appl. Environ. Microbiol.* 74:3198–215
- ▶ Rentz J., Turner I.P., Ullman J.L., 2009. Removal of phosphorus from solution using biogenic iron oxides. *Water Res.* 43:2029–35
- ▶ Schmidt C., Vuillemin R., Le Gall C., Gaill F., Le Bris N., 2008. Geochemical energy sources for microbial primary production in the environment of hydrothermal vent shrimps. *Mar. Chem.* 108:18–31
- ▶ Schmidt W.-D., Overbeck J., 1994. Iron bacteria. In *Microbial Ecology of Lake Plüßsee*, ed. J. Overbeck, R.J. Chrost, 105:326–36. Berlin: Springer
- ▶ Sessions A.L., Doughty D.M., Welander P.V., Summons R.E., Newman D.K., 2009. The continuing puzzle of the great oxidation event. *Curr. Biol.* 19:R567–74
- ▶ Sobolev D., Roden E.E., 2001. Suboxic deposition of ferric iron by bacteria in opposing gradients of Fe(II) and oxygen at circumneutral pH. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:1328–34

- ▶ Sobolev D., Roden E.E., 2004. Characterization of a neutrophilic, chemolithoautotrophic Fe(II)-oxidizing alpha-proteobacterium from freshwater wetland sediments. *Geomicrobiol. J.* 21:1–10
- ▶ Spring S., 2006. The genera *Leptothrix* and *Sphaerotilus*. See Ref. 23, pp. 758–77
- ▶ Stoecker K., Bendinger B., Schoning B., Nielsen P.H., Nielsen J.L., et al. 2006., Cohn's *Crenothrix* is a filamentous methane oxidizer with an unusual methane monooxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:2363–67
- ▶ Takeda M., Miyanoiri Y., Nogami T., Oda K., Saito T., et al., 2007. Structural analysis of the fundamental polymer of the sheath constructed by *Sphaerotilus natans*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71:2992–98
- ▶ Templeton A.S., Knowles E.J., Eldridge D.L., Arey B.W., Dohnalkova A.C., et al., 2009. A seafloor microbial biome hosted within incipient ferromanganese crusts. *Nat. Geosci.* 2:872–76
- ▶ Toner B.M., Santelli C.M., Marcus M.A., Wirth R., Chan C.S., et al., 2009. Biogenic iron oxyhydroxide formation at mid-ocean ridge hydrothermal vents: Juan de Fuca Ridge. *Geochim. Cosmochim. Acta* 73:388–403
- ▶ van Veen W.L., Mulder E.G., Deinema M.H., 1978. The *Sphaerotilus-Leptothrix* group of bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 42:329–56
- ▶ Vandamme P., Pot B., Gillis M., de Vos P., Kersters K., Swings J., 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* 60:407–38
- ▶ Wang J., Muyzer G., Bodelier P.L.E., Laanbroek H.J., 2009. Diversity of iron oxidizers in wetland soils revealed by novel 16S rRNA primers targeting *Gallionella*-related bacteria. *ISME J.* 3:715–25
- ▶ Weiss J.V., Emerson D., Backer S.M., Megonigal J.P., 2003. Enumeration of Fe(II)-oxidizing and Fe(III)-reducing bacteria in the root zone of wetland plants: implications for a rhizosphere iron cycle. *Biogeochemistry* 64:77–96
- ▶ Weiss J.V., Rentz J.A., Plaia T., Neubauer S.C., Merrill-Floyd M., et al., 2007. Characterization of neutrophilic Fe(II)-oxidizing bacteria isolated from the rhizosphere of wetland plants and description of *Ferritrophicum radicolica* gen. nov. sp. nov., and *Sideroxydans paludicola* sp. nov. *Geomicrobiol. J.* 24:559–70
- ▶ Xu C., Zhang Y., Cheng G., Zhu W., 2008. Pitting corrosion behavior of 316L stainless steel in the media of sulphate-reducing and iron-oxidizing bacteria. *Mater. Charact.* 59:245–55



# INCREASING DENITRIFICATION CAPACITY OF MICROBIAL POPULATIONS, TO BE FURTHER USED IN RAS, BY SELECTIVE CULTIVATION



*C. Moiescu<sup>1</sup>, M. Jordan<sup>1,2</sup>, M. Cîrnu<sup>1</sup>, I.I. Ardelean<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Institute of Biology Bucharest, Romanian Academy, Splaiul Independenței 296, Bucharest 060031

<sup>2</sup>RAJA Strada Răscoalei 1907, 5, Constanța 900178

## ABSTRACT

Five microbial populations were tested in batch scale experiments for their capacity to remove  $\text{NO}_3$  compounds from wastewaters. After their enrichment in denitrifying microorganisms by selective cultivation, some selected microbial populations showed a 100% efficiency in removing the  $\text{NO}_3$  from the synthetic culture media, thus making them feasible for an efficient removal of nitrogen compounds from RAS waters.

**Key words:** biofiltration, denitrification, Recirculating Aquaculture System

## INTRODUCTION

Recirculating aquaculture system (RAS) is an essential modern technology for farming fish or other aquatic organisms, in which spent water can be reused in the production. The core of RAS is the biofiltration/cleaning of spent water mainly with respect to organic substances, nitrate ( $\text{NO}_3$ ), ammonia ( $\text{NH}_4$ ), and phosphate ( $\text{PO}_4$ ) (Chen et al., 2017; Dalsgaard et al., 2013; Crab et al., 2007; Takaya et al., 2003). Presently, N removal from wastewaters is essentially based on the activity of nitrifying and denitrifying microorganisms. Nitrifying bacteria aerobically oxidize ammonium ( $\text{NH}_4$ ) to nitrate ( $\text{NO}_3$ ), which is then anaerobically reduced by denitrifying bacteria to  $\text{N}_2$  (Münch et al., 1996). Because an anaerobic denitrification step is costly and at times inefficient (Takaya et al., 2003) the use of aerobic denitrifying bacteria could be the solution to overcome this problem. In the last decade it has been an increased interest in using tailored activated sludge with improved specific activities, by enrichment in the desired physiological groups of microorganisms (ammonia oxidizing microorganisms, denitrifying microorganisms etc.). In this paper we focus on improving the aerobic denitrification activity of filtering microbiota mainly by enrichment of this physiological group through selective cultivation using starting microbiota from an aquaculture facility as well as from a waste water plant.

## MATERIALS AND METHODS

**Microbial populations.** The starting consortia of microorganisms to be enriched in (micro) aerophilic denitrifying bacteria were: activated sludge from a municipal wastewater treatment plant (Raja, Constanța), microbiota from Plutonița fish farm biofilters and waters (A1, A2, A3, A4) and an aquaria biofilter (BOD).

**Enrichment** was performed according to literature (Takaya et al., 2003) by using a series of transfers onto different selective media as follows: (1) the first selection was performed on the screening medium (SM) or artificial waste waters (ARS) and after several transfers a (2) second

selection was performed onto denitrification medium (DM). The acetate or ethanol were used as sole carbon source and  $\text{NaNO}_3$  as the main final electron acceptor (Crab et al., 2007; Takaya et al., 2003), in the presence of pH indicators (bromthymol blue or cresol red). The selected consortia of microorganisms were used in the quantitative denitrification studies.

**Reduction of nitrate:** the selected consortia of microorganisms were transferred into a minimal denitrification medium (D-SM) under (micro)aerobic growing conditions. Time-dependent consumption of  $\text{NO}_3^-$  was measured using the Spectroquant® Nitrate test kit (Merck). All the  $\text{NO}_3^-$  concentrations were calculated using a standard curve prepared with Nitrate IC-STD solution (Merck).

**Media composition.** Screening medium (SM) (g/L): sodium acetate, 2.84;  $\text{NaNO}_3$ , 1.62;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.19;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.36;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.27; yeast extract 1; trace element solution, 1.00 ml; pH 7.0-7.2. Artificial waste waters (ARS) (g/L):  $\text{NaNO}_3$ , 0.85; peptone 0.6; meat extract 0.4; urea, 0.1;  $\text{NaCl}$ , 0.03;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.1;  $\text{KCl}$ , 0.014;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.02;  $\text{CaCl}_2$ , 0.0185. Denitrification medium (DM) (g/L): sodium acetate, 4.72;  $\text{NaNO}_3$ , 1.62;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.50;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.42;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.6; casamino acids 5; trace element solution, 2.00 ml; pH 7.0-7.2. Minimal denitrification medium (D-SM) (g/L): sodium acetate, 4.72;  $\text{NaNO}_3$ , 1.62;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.50;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.42; trace element solution, 1.00 ml; pH 7.0-7.2.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Results obtained on fish farm samples

For the selection of denitrifying microorganisms from water samples, a modified protocol from Takaya et al. (2003) was used. Firstly, a primary screening was performed on SM media which allowed for the selection of those microbial populations that contained aerobic denitrifying microorganisms. After this initial selection, a secondary screening on DM media was realized which allowed the enrichment of selected microbial population in aerobic denitrifying microorganisms. The denitrifying capacity of the enriched microbial populations was tested using a minimal denitrification medium (D-SM) that contained sodium acetate as C source,  $\text{NaNO}_3$  as N source, and cresol red as pH indicator. Usually, the denitrification process is followed by an increase in the pH value as a result of protons depletion. In case of microbial populations enriched in denitrifying microorganisms, the denitrification process could be followed by observing the shift in the colour of the culture media, from yellow (pH 7.0) to pink (pH 8.5) as a result of the pH surge determined by the reduction of  $\text{NO}_3^-$  to  $\text{N}_2$  (Fig. 1).

Preliminary microscopic investigations have been done on this microbiota. In Fig. 2a one can see an image of a colony which turned red in the growing medium supplemented with cresol red, thus a candidate for a colony of a denitrifying microorganism, whereas in Fig. 2b one can see that some cells contain polyphosphate (they are reddish in the presence of alkaline methylene blue). In Fig. 2c and d the cells in the same microscopic field are labelled with both SYBER Green and Ethidium bromide homodimer: dead cells are view with red filter whereas total cells are viewed with green filter.

The confirmation of the denitrifying activity of the enriched microbial populations was performed by measuring the rate of  $\text{NO}_3^-$  reduction using a spectrophotometric method. Fig. 3 shows that the denitrification process progressed very fast in the first 24 h, between 69% to

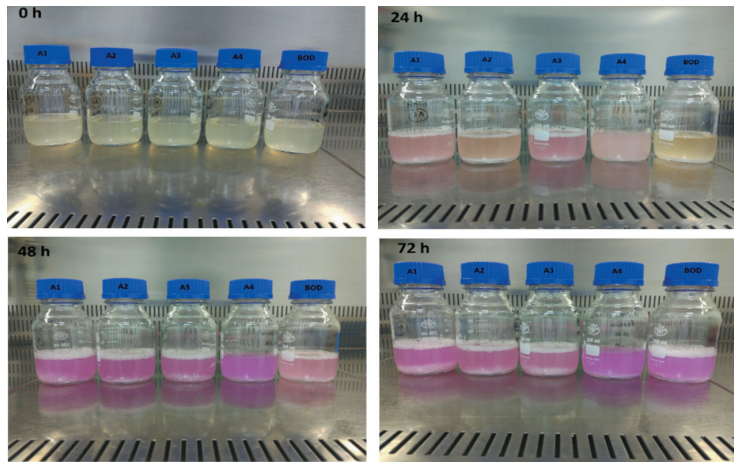


Figure 1. The denitrification process is associated with the alkalisation of the growth medium, indicated by the colour change of the pH indicator (cresol red) from yellow (pH 7.0) to dark pink (pH 8.5).

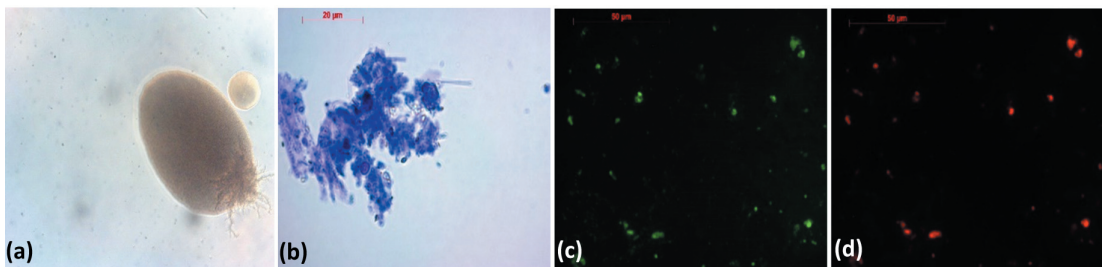


Figure 2. Images of isolates from microbiota biofilters selectively cultivated on artificial wastewater (ARS). (a) Isolated colony on solid ARS supplemented with cresol red. (b) Microscopic image after metachromatic staining with alkaline methylene blue for polyphosphate inclusions. (c, d) Nile-red staining for lipid inclusions (including polyhydroxybutyrate).

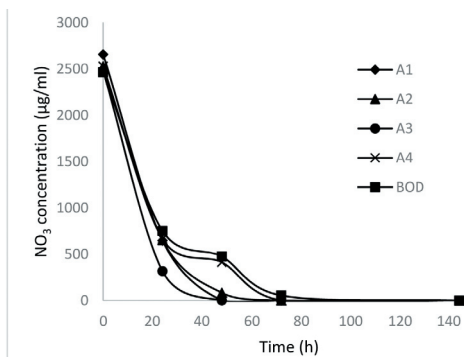


Figure 3. Denitrification by the selected bacterial populations from fish farm waters in (micro)aerobic batch cultures.

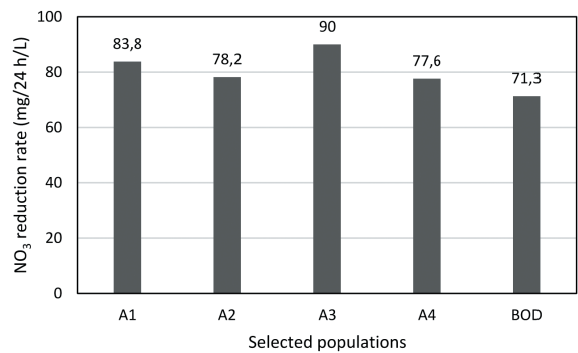


Figure 4. NO<sub>3</sub> removal rates by the selected denitrifying microbial populations from fish farm waters.

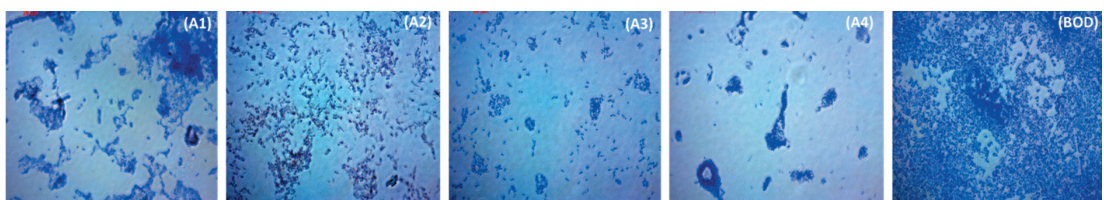


Figure 5. Optical microscopy images of the selected denitrifying bacterial populations from fish farm waters, cultivated on D-SM medium.

87% of the NO<sub>3</sub> being removed, and by the end of the 72 h of incubation 100% of the NO<sub>3</sub> was removed, except for the BOD population where a 93% efficiency was measured.

The enriched denitrifying microbial populations were evaluated microscopically (Fig. 5) at the beginning and at the end of the selection and enrichment process. In the enriched populations it can be observed a homogeneity of the cellular morphology, noting the presence of only two types of bacilli compared to the initial cultures where several cellular morphologies (cocci, bacilli of different sizes, microbial conglomerates, even filamentous forms) could be observed.

## RESULTS OBTAINED WITH MICROBIOTA FROM ACTIVATED SLUDGE

Similar results have been obtained using as starting biological material activated sludge from a wastewater plant, after appropriate enrichment two mixture of populations were obtained with a denitrification activity of 544 mg NO<sub>3</sub>/24 h/L of activated sludge and of 1000 mg NO<sub>3</sub>/24h/L activated sludge, respectively.

## CONCLUSIONS

Five consortia of microorganisms were selected and enriched with respect to denitrification activity, which ranged from 83 to 1000 mg NO<sub>3</sub> consumed/24 h/L, arguing that ongoing experiments will further improve the activity and density of denitrifying bacteria. The isolation of colonies of denitrifying bacteria argues the possibility to purify these bacteria and grow them in axenic cultures, one trend nowadays in improving the quality of biological filtration. The enriched populations together with expected purified strains could be further used to increase the cleaning/filtration capacities in fish farms and municipal waste water plants, as well.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work is funded by ABAWARE Project, financed under the ERA-NET Cofund Water Works 2015 Call. Thanks are also due to Prof. Dr. Nicolae Crăciun (AQUATERRA) for kindly providing microbial samples from Plutonița fish farm.

## REFERENCES

- ▶ Dalsgaard, J., Lund, I., Thorarinsdottir, R., Drengstig, A., Arvonen, K., Pedersen, P.B. (2013). Farming different species in RAS in Nordic countries: Current status and future perspectives. *Aqua Engin*, 53: 2-13.
- ▶ Chen, R., Deng, M., He, X., Hou, J. (2017). Enhancing nitrate removal from freshwater pond by regulating carbon/nitrogen ratio. *Front Microbiol*, 8: 1712.
- ▶ Crab, R., Avnimelech, Y., Defoirdt, T., Bossier, P., Verstraete, W. (2007). Nitrogen removal techniques in aquaculture for a sustainable production. *Aquaculture*, 270: 1–14.
- ▶ Takaya, N., Catalan-Sakairi, M.A.B., Sakaguchi, Y., Kato, I., Zhou, Z., Shoun, H. (2003). Aerobic denitrifying bacteria that produce low levels of nitrous oxide. *Appl Environ Microbiol*, 69: 3152-3157.
- ▶ Münch, E.V., Lant, P., Keller, J. (1996). Simultaneous nitrification and denitrification in bench-scale sequencing batch reactors. *Water Res.*, 30: 277–284.



# ECOLOGICAL ASSESSMENT OF A PERI-URBAN LAKE USING PHYSICOCHEMICAL FACTORS AND ZOOPLANKTON COMMUNITIES



Larisa Florescu, Laura Parpală, Victor Zinevici, Mirela Moldoveanu\*

Department of Ecology, Taxonomy and Nature Conservation; Institute of Biology Bucharest, Romanian Academy, Splaiul Independenței no. 296, sect.6, RO-060031 Bucharest, Romania; larisa.florescu@ibiol.ro, lauraparpala@yahoo.com;

\* Corresponding author. Email: mirelamold@yahoo.com

**Abstract** - The zooplankton of Lake Snagov (Romania) were investigated with the aim to analyze relationships between communities and lake ecological conditions. Community composition and abundance were measured during the annual biological peaks in relation to physico and chemical characteristics of water column. Rotifera was the group with the highest diversity and important contribution in abundance. In May, Ciliata and Cladocera were observed in high abundance correlated with high values of biochemical oxygen demand and chemical oxygen demand. Dissolved oxygen was lower than generally accepted values and biological oxygen demand higher. High abundance of species tolerant to organic compounds (*Carchesium polypinum*, *Bosmina longirostris*, *Keratella quadrata*, *Polyarthra dolychoptera* *Ceriodaphnia pulchella*) was observed. The results indicate that Lake Snagov is organic polluted and it can be classified as mesotrophic. This study re-confirmed the useful role of zooplankton in water monitoring activities.

**Keywords:** copepods; Lake Snagov; mesotrophic lakes; peri-urban lakes; rotifers.

## INTRODUCTION

Zooplankton are key communities in water systems as being essential components of food webs. This biotic level responds to food web changes in algal resources and predation by fish and invertebrates and it has an important role in the flow of nutrients from algae and bacteria to the top of trophic pyramid. Zooplankton composition and abundance can provide information on the ecological health of a lake (Van Egeren et al. 2011) although it was not considered for the assessment of the trophic status within the New Framework Water Directive (2000/60/CE). However, many researchers mention the need to use these communities in these types of studies (Jeppensen et al. 2011; Mialet et al. 2011). Thus, the zooplankton can serve as a valuable indicator of the trophic status of an ecosystem. It can be used faster and with less financial resources for replacing components that are difficult to assess (eg. phytoplakton and fish).

The Lake Snagov is located in the northern part of Ilfov County at about 35 km from Bucharest and less than 18 km away from the International Airport “Henri Coandă”. As a peri-urban ecosystem offers a wide range of services to the nearby inhabitants by enhancing human well-being and health (Postel & Carpenter 1997). The vicinity with Bucharest metropolitan area exposes the lake to an intense navigation. Hence, the diverse anthropogenic influences can affect the natural balance of the Lake Snagov ecosystem as a whole. A large residential area has been developed around the lake consisting in private houses that have morphologically trans-



formed the shoreline areas. This fact decreased the ecological connectivity between terrestrial and aquatic habitats as previously reported worldwide in similar lakes (Song et al. 2017; Yang et al. 2017)

Water quality can pose significant challenges in maintaining multiple ecosystem service benefits while ensuring the overall lake health. Lake Snagov water is regularly monitored for the public health related issues albeit ecologically is still underexplored.

At international level Lake Snagov is classified in IUCN IV category - Natural Reserves - Protected Natural Areas whose aims are the protection and preservation of important natural habitats and species from the floristic, faunistic and hydrological point of view. Lake Snagov has shores and bays where the typical pond vegetation has been preserved. The aquatic and palustric phytocoenoses are characterized by species such as *Nymphaea alba*, *Nuphar lutea*, *Iris pseudacorus*, *Phragmites australis*, *Typha* sp. Anthropogenic pressure in the perimeter of Lake Snagov produces: (1) immediate direct effects, (2) indirect consequences (e.g. water pollution, habitat destruction, of-what-population decline) and (3) long-term impact manifested by the disappearance of some populations or species in the area, as well as the fragmentation of habitats (Lorenz et al. 2017).

The hypothesis of the study was the water quality of the lake decreased, being negatively influenced by the proximity of human settlements. We proposed to use the composition and abundances of zooplankton communities to estimate the ecological response to the changes induced by the anthropogenic influences in a peri-urban lake.

## MATERIALS AND METHODS

### *Study site*

Lake Snagov is a large natural lake (5.75 km<sup>2</sup> surface, 16 km length, 400 m wide and maximum 9 m depth) located at 30 km from Bucharest (Fig. 1). The lake has a stream origin, from Ialomița river (Ștefan *et al.* 2017; Zinevici *et al.* 2014), and is a protected area belonging to Snagov Natural Reserve. The geographical position of the lake is 44°43'34" North latitude and 26°10'40" East longitude.

### *Water samples*

For physico and chemical analyses, the samples were collected on May, July and October, from all sampling points were zooplankton samples were taken.

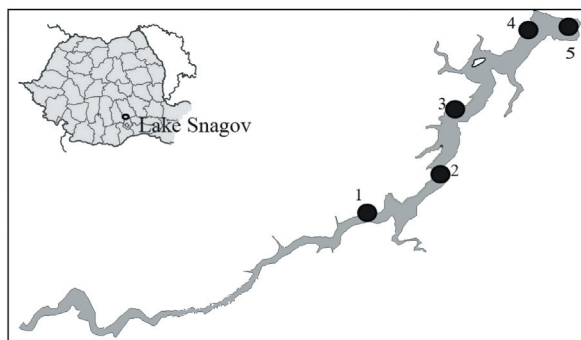


Fig. 1. The Lake Snagov sampling map (1-5 sampling transects with two sampling points: littoral and medial)

Water samples were obtained by mixing into a bucket the water column subsamples, from deepest point until surface, using a Patalas Schindler device. 1L of water per sampling point it was taken in a sterile bottle for laboratory analysis. The samples were kept in cold condition and analysed in laboratory in the same day from the sampling.

Depth and transparency measurements were taken with a Secchi disk, and the temperature with a field thermometer.

**Water Chemical analysis** - The following water chemical analysis using ISO standardized methods were measured: pH (SR ISO 10523-09), conductivity (SR EN 27888-97), dissolved oxygen (DO)(SR EN ISO 25814-99), biochemical oxygen demand (BOD)(SR EN 1899/1-03 /2-02), chemical oxygen demand (COD-Cr)(SR ISO 6060-96), total nitrogen (TN)(SR EN 12260:2004), ammonia-nitrogen ( $\text{N-NH}_4$ )(SR ISO 7150/1-01), ammonia ( $\text{N-NH}_4^+$ )(SR ISO 7150/1-01), nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) (SR EN 26777:2002/C91:2006), nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) (SR ISO 7890/3-00), total phosphorus (TP) (SR EN ISO 6878-2005), orthophosphate ( $\text{PO}_4^{3-}$ )(SR EN ISO 6878:05), and chlorophyll *a* (chl *a*)(SR ISO 10260:1996). The TN: TP ratio was used to determine the limiting nutrient of the primary producers development.

All analysis was carried out commercially at Biotest Laboratory of Romanian National Institute for Research and Development in Industrial Ecology. The reporting of the physicochemical results took into consideration the norms established by the European Water Framework Directive, transposed at national level through Ministry of Environment and Water Management (No 161/2006).

#### *Zooplankton samples*

In order to cover the lake heterogeneity, a total of 50 samples were collected in April, May, July, September and October 2011 from five transects with a littoral and medial sampling points. The transects 1 and 5 were established in the tampon zone of the natural reserve and 2, 3 and 4 make part from the Lake Snagov Natural Reserve.

The zooplankton samples were obtained by filtering of 30 L of water column using a Patalas-Schindler plankton trap (5 L) through a 65  $\mu\text{m}$  gauze planktonic mesh. The content was carefully poured into a planktonic net with collecting bucket allowing concentration. Finally, each zooplankton sample was preserved with 4% formaldehyde solution. The collected samples were then stored for a short period of sedimentation.

#### *Zooplankton analysis*

The concentrated samples were homogenized by stirring and with a pipette 1 ml of subsample were taken for microscopy analysis using a Kolkwitz counting chamber. For each sample, 3 subsamples were analysed. The zooplankton species were identified using with a Zeiss inverted microscope (Axiovert 40 C). The following taxonomic keys were used: Ciliata (Foissner et al. 1991; 1992; 1994), Testacea or testate amoeboid organisms (Grospietsch 1972; Bartoš 1954), Rotifera (Rudescu 1960; Voight 1956), Cladocera (Negrea 1983; Brooks 1959), Copepoda (Dussart & Defaye 2001; Dussart & Defaye 1995; Damian-Georgescu 1963; 1966; 1970).

The abundance expressed as individuals per L (ind. L<sup>-1</sup>) was calculated according to the method described by Edmonson & Winberg (1971):

$$\text{Species abundance} = \frac{\text{individual numbers in 1 mL} \times \text{sample volume (mL)}}{\text{volume of water filtered (L)}}$$

### Statistical analyses

For all statistical test the species composition and abundance were used, in order to reflect the local communities or a habitat over a given period of time (Colwell 2009; Whittaker et al. 2001).

ANOSIM test was applied to compare the variation in the communities (as species composition and abundances) between different sampling times. The distances are converted to ranks and a comparison of the distances is made between groups with distances within groups. Large positive R (up to 1) signifies dissimilarity between groups (Hammer et al. 2009). SIMPER analysis was used to determine the taxonomic groups contribution in defying the periods differences. The method established which taxa are responsible for observed differences assessed by ANOSIM test.

The alpha diversity was assessed using K-dominance, Shannon-Wiener and Evenness indices. The relationships between zooplankton communities and their environment was established by the Canonical correspondence analysis (CCA). For this statistical analysis only May, July and October periods were have been processed.

The data processing was performed with Xlstat 2013, PAST (Hammer et al. 2001) and BiodiversityPro (McAleece et al. 1997).

## RESULTS

Through multivariate analysis we tested whether recognized parameters for water quality assessment are good predictors for zooplankton. The selected statistical procedures were used to highlight the variations in both the total and the group level of zooplankton. The necessity of the selected analyses was justified by the ecological differences characterizing the component groups. For this purpose, the zooplankton communities' analysis was done based on the following statistical methods.

The variations in the mean values of physicochemical parameters during study period, is given in the Table 1.

Table 1. Average values of the environmental parameters

Parameters	May	July	October
DO - Dissolved oxygen (mg O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> )	5.11	3.88	5.93
BOD - Biochemical oxygen demand (mg O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> )	7.91	6.39	6.20
COD-Cr - Chemical oxygen demand-Cr (mg O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> )	25.07	21.85	21.28
N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> - Ammonia Nitrogen (mg N L <sup>-1</sup> )	0.24	0.04	0.21
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> - Nitrite (mg N L <sup>-1</sup> )	0.008	0.57	0.05
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> - Nitrate (mg N L <sup>-1</sup> )	0.93	1.95	0.88
TN - Total nitrogen (mg N L <sup>-1</sup> )	2.25	2.83	1.68
PO <sub>4</sub> <sup>-</sup> - Orthophosphate (mg P L <sup>-1</sup> )	0.03	0.06	0.04
TP - Total phosphorus (mg P L <sup>-1</sup> )	0.08	0.09	0.08
TN:TP	28.12	31.44	21
Chlorophyll <i>a</i> (µg L <sup>-1</sup> )	4.40	6.37	10.07
Conductivity (µs cm <sup>-1</sup> )	499.45	451.04	490.48
pH	7.21	6.77	7.19
Depth (m)	2.12	2.12	2.12
Transparency (m)	1.21	1.26	1.10
Temperature (°C)	18.85	23.2	11.94

The highest dissolved oxygen (DO) value was found in October (5.93 mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>) and minimum in July (3.88 mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>). In May and October, the DO values bellow the optimal range (7 - 9 mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>) accepted for aquatic organisms, whereas in July the values were twice lower. Concentration of biochemical oxygen demand (BOD) gradually decreased from spring (May - 7.91 mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>) to autumn (October - 6.20 mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>). In Lake Snagov, the BOD values were higher than normal values for aquatic systems (3-5 mg L<sup>-1</sup>).

Total phosphorus (TP) concentration showed a narrow range of variation (0.008 – 0.009 mg P L<sup>-1</sup>) while total nitrogen (TN) decreased from July to October (2.83 – 1.68 mg N L<sup>-1</sup>). The total nitrogen did not exceed the typical range (0.9 to 3.15 mg L<sup>-1</sup>) of natural conditions (Kim et al. 2003). Total chlorophyll *a* concentration increased twice from May to October (4.40 – 10.07 µg L<sup>-1</sup>).

Zooplankton communities' analysis revealed 110 species with Rotifera as the dominant group (51.82%) followed by Cladocera (22.20%) and Ciliata (12.73 %). The average of species richness recorded per station increased from Spring months (17 species in April, 24 species in May) to Summer (28 species in July) and decreased in the second part of the year (22 species in September, 21 species in October). The highest species richness was observed in July (64 species) (Table 2).

Table 2 The zooplankton species list recorded in Lake Snagov (IV- April; V- May; VII- July; IX-September; X- October)

	IV	V	VII	IX	X
<b>CILIATA</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>2</b>
<i>Blepharisma steini</i> Kahl, 1932	*				
<i>Carchesium polypinum</i> (Linnaeus, 1758) Ehrenberg, 1831		*			
<i>Codonella cratera</i> (Leidy, 1877) Imhof		*			
<i>Colpoda cucullus</i> (Müller, 1773) Gmelin, 1790					*
<i>Dileptus anser</i> (Müller, 1786) Dujardin, 1841			*		
<i>Epistylis lacustris</i> Imhoff, 1884		*			
<i>Frontonia acuminata</i> (Ehrenberg, 1834)	*				
<i>Ophryoglena flava</i> Ehrenberg, 1833		*			
<i>Paramecium caudatum</i> Müller, 1773					*
<i>Strobilidium gyrans</i> (Stokes, 1887) Kahl, 1932	*				
<i>Tintinnidium fluviatile</i> Stein, 1863	*				
<i>Trachelius ovum</i> (Ehrenberg, 1831) Ehrenberg, 1838	*	*			
<i>Vorticella convallaria</i> (Linnaeus, 1758) Linn. 1767		*			
	<b>IV</b>	<b>V</b>	<b>VII</b>	<b>IX</b>	<b>X</b>
<i>Vorticella microstoma</i> Ehrenberg, 1830	*				
<b>TESTATE AMOEBAE (TESTACEA)</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>5</b>	<b>9</b>	<b>4</b>
<i>Arcella arenaria</i> Greef, 1866	*	*	*	*	*
<i>Arcella hemisphaerica</i> Perty, 1852				*	*
<i>Centropyxis discoides</i> Penard, 1902	*	*	*	*	*
<i>Centropyxis ecornis</i> (Ehrenberg, 1841)				*	*
<i>Centropyxis kolkwitzii</i> Van Oye, 1949			*	*	
<i>Diffugia acuminata</i> Ehrenberg, 1838				*	
<i>Diffugia corona</i> Wallich, 1864			*	*	
<i>Diffugia globulosa</i> Dujardin, 1837, Penard, 1902	*	*		*	
<i>Diffugia oblonga</i> Ehrenberg, 1838			*	*	
<b>ROTIFERA</b>	<b>21</b>	<b>21</b>	<b>37</b>	<b>28</b>	<b>26</b>
<i>Anuraeopsis fissa</i> Gosse, 1851	*	*	*	*	*
<i>Asplanchna priodonta</i> Gosse, 1850			*	*	*
<i>Brachionus angularis</i> Gosse, 1851	*		*	*	*
<i>Brachionus calyciflorus anuraeiformis</i> Brehm, 1909	*				
<i>Brachionus calyciflorus dorcas</i> Gosse, 1851					*
<i>Brachionus diversicornis</i> (Daday, 1883)		*	*	*	*
<i>Brachionus falcatus</i> Zacharias, 1898			*		
<i>Brachionus forficula</i> Wierzejski, 1891			*	*	
<i>Brachionus leydigii</i> Cohn, 1862			*		
<i>Brachionus quadridentatus brevispinus</i> Ehrenberg, 1832			*	*	
<i>Brachionus quadridentatus mehleri</i> (Barrois & Daday, 1894)			*		*

<i>Epiphanes macrourus</i> (Barrois & Daday, 1894)		*	*		
<i>Euchlanis dilatata</i> Ehrenberg, 1832	*		*		*
<i>Filinia aseta</i> Fadeew, 1925	*				
<i>Filinia limnetica</i> (Zacharias, 1889)	*				
<i>Filinia terminalis</i> (Plate, 1886)	*				
<i>Keratella cochlearis</i> (Gosse, 1851)	*	*	*	*	*
<i>Keratella paludosa</i> (Lucks, 1912)		*	*	*	*
<i>Keratella quadrata</i> (Müller, 1786)	*	*	*	*	*
<i>Keratella ticinensis</i> (Callerio, 1920),		*	*	*	*
<i>Lecane acus</i> Harring, 1913					*
<i>Lecane arcuata</i> (Bryce, 1891)	*			*	
<i>Lecane bulla</i> (Gosse, 1851)			*		
<i>Lecane closterocerca</i> (Schmarda, 1859)		*	*		*
<i>Lecane luna</i> (Müller, 1776)		*	*		*
<i>Lecane quadridentata</i> (Ehrenberg, 1832)			*		
<i>Lecane stenroosi</i> (Meissner, 1908)			*	*	
<i>Lecane ungulata</i> (Gosse, 1887)				*	
<i>Lepadella patella</i> (Müller, 1786)		*	*		
<i>Macrochaetus intermedius</i> Rodewald, 1940			*		
<i>Macrotrachella multispinosa</i> Thompson	*			*	
<i>Mytilina bisulcata</i> (Lucks, 1912)			*		
<i>Mytilina ventralis</i> (Ehrenberg, 1832)			*	*	
<i>Notholca acuminata</i> (Ehrenberg, 1832)	*				
<i>Platyas patulus</i> (Müller, 1786), Gillard, 1948			*		
<i>Platyas quadricornis</i> (Ehrenberg, 1832)			*		*
<i>Polyarthra dolichoptera</i> Idelson, 1925	*	*	*	*	*
<i>Polyarthra euryptera</i> Wierzejski, 1891				*	*
<i>Polyarthra major</i> Burckhardt, 1900		*	*	*	*
<i>Polyarthra minor</i> Voigt, 1904	*	*	*	*	*
<i>Polyarthra remata</i> Skorikov, 1896	*	*	*	*	*
<i>Polyarthra vulgaris</i> Carlin, 1943		*	*		
<i>Pompholyx complanata</i> Gosse, 1851		*	*	*	*
<i>Pompholyx sulcata</i> Hudson, 1885				*	
<i>Synchaeta oblonga</i> Ehrenberg, 1832	*				
<i>Synchaeta pectinata</i> Ehrenberg, 1832	*				*
<i>Testudinella patina</i> (Hermann, 1783)	*	*	*		
<i>Trichocerca capucina</i> (Wierzejski & Zacharias, 1893)		*	*	*	*
<i>Trichocerca cylindrica</i> (Imhof, 1891)		*	*	*	*
<i>Trichocerca elongata</i> (Gosse, 1886)				*	*
<i>Trichocerca gracilis</i> (Tessin, 1890)			*	*	
<i>Trichocerca mucosa</i> (Stokes, 1896)				*	
<i>Trichocerca pussila</i> (Jennings, 1903)					*
	IV	V	VII	IX	X
<i>Trichocerca rattus</i> (Müller, 1776)	*	*			
<i>Trichocerca similis</i> (Wierzejski, 1893)	*	*	*	*	*
<i>Trichotria pocillum</i> (Müller, 1766)	*				
<b>CLADOCERA</b>	<b>6</b>	<b>14</b>	<b>17</b>	<b>12</b>	<b>9</b>
<i>Acroperus angustatus</i> Sars, 1863	*		*	*	*
<i>Alona costata</i> Sars, 1862	*	*	*		
<i>Alona rectangula</i> Sars, 1861	*	*	*	*	*
<i>Alonella excisa</i> (Fischer, 1854)	*		*		*
<i>Alonella exigua</i> (Lilljeborg, 1853)			*		
<i>Alonella nana</i> (Baird, 1843)			*		
<i>Bosmina longirostris</i> (Müller, 1785)	*	*	*	*	*
<i>Camptocercus rectirostris</i> Schödler, 1862		*			
<i>Ceriodaphnia pulchella</i> Sars, 1862		*	*	*	
<i>Ceriodaphnia reticulata</i> (Jurine, 1820)				*	
<i>Chydorus sphaericus</i> (Müller, 1776)	*	*	*	*	*
<i>Daphnia cucullata kahlbergensis</i> Schoedler, 1866		*	*	*	*
<i>Daphnia obtusa</i> (Kurz, 1874)		*			
<i>Diaphanosoma orghidani</i> Negrea, 1982		*	*	*	*
<i>Disparalona rostrata</i> (Koch, 1841)			*		
<i>Eurycercus lamellatus</i> (Müller, 1776)		*			
<i>Graptoleberis testudinaria</i> (Fischer, 1848)				*	
<i>Leptodora kindtii</i> (Focke, 1844)		*	*	*	*
<i>Moina micrura</i> (Kurz, 1874)			*	*	*

<i>Pleuroxus aduncus</i> (Jurine, 1820)		*	*	*	
<i>Pleuroxus truncatus</i> (Müller, 1785)		*	*		
<i>Simocephalus vetulus</i> (Müller, 1776)		*	*		
<b>COPEPODA</b>	<b>3</b>	<b>6</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>2</b>
<i>Cyclops furcifer furcifer</i> Claus, 1857			*		*
<i>Cyclops vicinus vicinus</i> Uljanin, 1875		*			
<i>Eudiaptomus gracilis</i> (Sars, 1863)		*			
<i>Eurytemora serrulatus serrulatus</i> (Fischer, 1851)			*		
<i>Eurytemora velox</i> (Lilljeborg, 1853)	*	*		*	
Harpacticoida g.sp.	*	*	*	*	
<i>Mesocyclops crassus</i> (Fischer, 1853)	*	*	*	*	*
<i>Mesocyclops oithonoides</i> (Sars, 1863)		*			

The abundance averages of zooplankton groups varied from 0.10 ind.L<sup>-1</sup> to a significant high abundance of ciliates (3017.86 ind.L<sup>-1</sup>) (Table 3). This value was noticed in May when *Carchesium polypinum* (2994.39 ind.L<sup>-1</sup>) presented a numerical explosion. Also, in the same period was found in a high number, the cladoceran *Bosmina longirostris* (467.96 ind.L<sup>-1</sup>) and other species: *Keratella quadrata* (170.59 ind.L<sup>-1</sup>), *Polyarthra dolychoptera* (43.02 ind.L<sup>-1</sup>), *Ceriodaphnia pulchella* (109.29 ind.L<sup>-1</sup>).

Table 3. The abundance averages of zooplankton (ind. L<sup>-1</sup>) of the sampling periods

	April	May	July	September	October
Ciliata	2.12	3017.86	0.10	0.00	2.57
Testacea	2.54	9.41	5.36	4.08	4.81
Rotifera	99.92	315.72	173.60	80.26	299.44
Cladocera	2.72	699.38	23.70	14.15	59.13
Copepoda	42.84	451.89	351.81	250.55	243.36

The species richness and density sampling periods averages at group level reflected the different responses to environmental conditions of the zooplankton components. As example, copepods were found in low species richness but with a high number in the juvenile stages while ciliates varied in both structural parameters.

One-way ANOSIM with Bray-Curtis distance, showed a strong difference (P=0.0001, global R=0.384) among the groups. The mean ranks values (within groups = 420.8 and between groups=656.2) explain the differences in terms of the specific composition and abundance, which can be noticed from the plot of the distance of the ANOSIM Ranked test (Fig. 2).

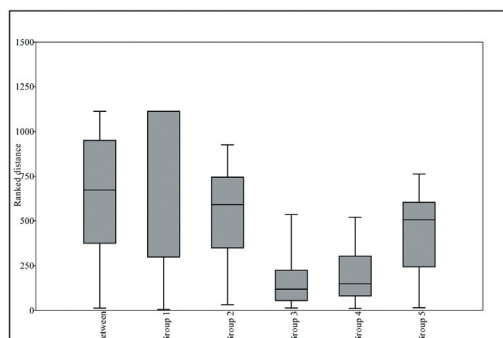


Fig. 2. Ranked Distance of the ANOSIM test (group 1 - April, group 2 - May, group 3 - July, group 4 - September, group 5 - October)

The highest difference was found between May and September ( $R = 0.58$ ;  $P = 0.001$ ) (Table 4). The contribution of each zooplankton group in differentiating traits of the study periods was assessed by Simper analysis. The overall average dissimilarity was 66.8 in which the copepods had the highest value (25.90) and Ciliata (17.27). In other words, the most responsible group was Copepoda (37.77 %) followed by Ciliata (25.85%) and Rotifera (25.25%).

Table 4. ANOSIM R and P values based on abundances of zooplankton communities

	April	May	July	September	November
April		0.001	0.002	0.001	0.005
May	0.52		0.002	0.001	0.005
July	0.53	0.42		0.163	0.253
September	0.52	0.58	0.25		0.28
November	0.42	0.41	0.16	0.17	

\* color code: grey- R-values; white - Bonferrony-Corrected P-values

Using the diversity indices at the group level of the zooplankton communities we could distinguish monthly fluctuations that can be integrated in further analysis (Table 5).

Table 5. Diversity indices (Shannon-Wiener and Evenness) of each zooplankton group

Diversity indices	Taxonomic Group	April	May	July	September	October
Evenness	Ciliata	0.62	0.18	1.00	0.00	0.61
	Testacea	0.86	0.77	0.68	0.71	0.56
	Rotifera	0.31	0.24	0.23	0.28	0.35
	Cladocera	0.75	0.22	0.55	0.43	0.32
	Copepoda	0.27	0.35	0.45	0.46	0.53
Shannon H	Ciliata	1.31	0.05	0.00	0.00	0.20
	Testacea	0.95	0.84	1.22	1.74	0.81
	Rotifera	1.88	1.66	2.20	2.04	2.25
	Cladocera	1.51	1.10	2.24	1.55	1.06
	Copepoda	0.30	1.02	1.00	0.84	0.76

Rotifers were the most diverse group thus confirming their role in defining trends in the total zooplankton. The rotifers, cladocerans and testate amoebas had the high diversity from July to October while ciliates and copepods exhibited a low diversity. In terms of Evenness the testate amoebas showed high values comparing with other groups.

K-dominance curves were used to assess total zooplankton diversity. The highest curves obtained for May and September correspond to the periods characterized by dominant species and low diversity of the total zooplankton communities of Lake Snagov (Fig. 3). The K-dominance curves of early spring (April) and late autumn (October) samples indicate that Snagov Lake has at least two annual time periods with high zooplankton diversity. The highest species diversity was observed in April and October while May and September represented the periods characterized by dominance of some species. For example, excepting the May samples, ciliates and cladocerans had low values of abundances overall the sampled time points.

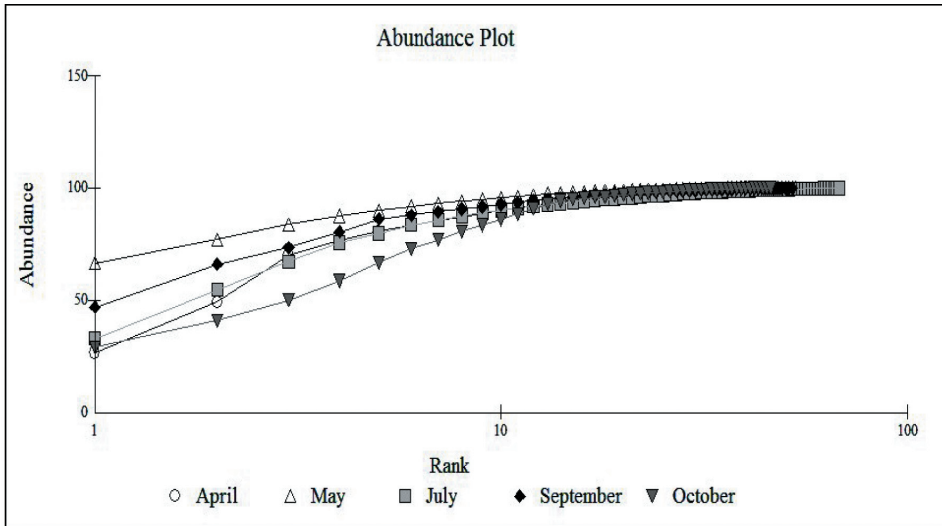


Fig. 3. K - dominance cumulative curves of the zooplankton abundance against of log species rank

The differences in composition of planktonic communities are determined by environmental conditions that influence the competition for food resources (Otto et al. 2014).

The Canonical Correspondence Analysis (CCA) revealed a relationship between zooplankton and explanatory variables. The axis 1 and 2 cumulated together 92.65%. The temperature, transparency, chlorophyll *a* and DO were associated in a significant proportion to axis 1, while the other parameters determined axis 2, such as conductivity, chemical oxygen demand (COD-Cr), orthophosphate, TP, TN, NO<sub>2</sub>, NO<sub>3</sub>, pH, BOD. (Fig. 4). The CCA showed that three important groups of zooplankton (Rotifera, Copepoda and Tested Amoebas) were influenced

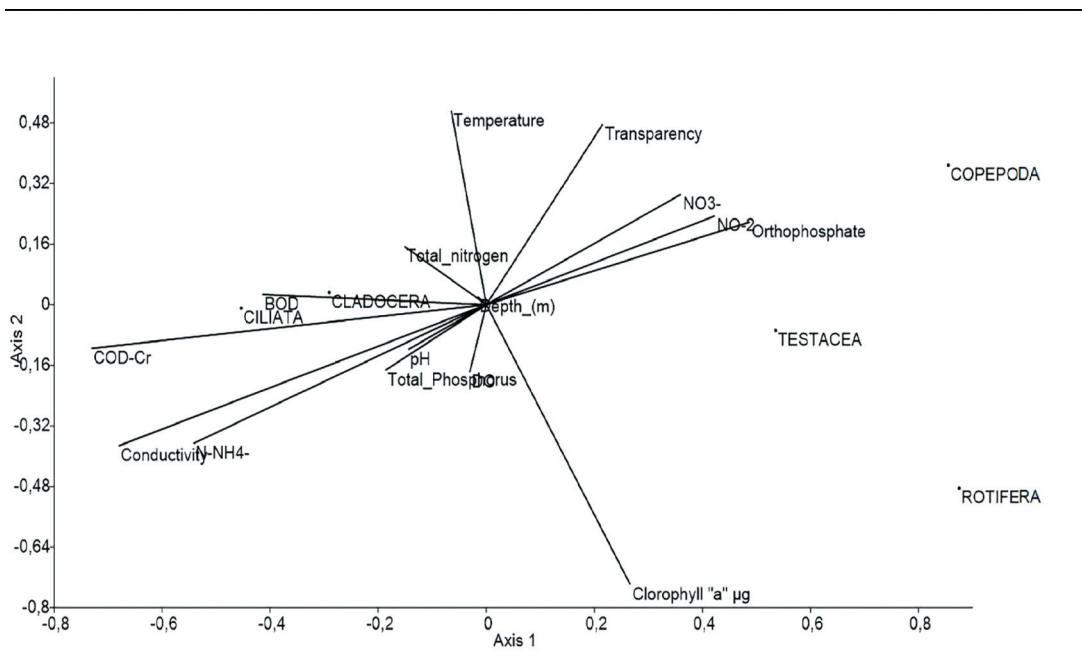


Fig. 4. CCA plot showing the relations between zooplankton communities and environmental parameters



especially by transparency, orthophosphate,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{NO}_3$ , chlorophyll *a*, while TP, TN, conductivity,  $\text{NH}_4$ , COD-Cr and BOD controlled the dynamics of Ciliata and Cladocera. The analysis showed that COD-Cr is the environmental factor with the highest influence on the zooplankton: Ciliata ( $R = 0.616$ ;  $P = 0.014$ ), Cladocera ( $R = 0.539$ ;  $P = 0.03$ ).

## DISCUSSION

Zooplankton communities, as part of the aquatic biotic component, can provide a predictive model of the ecosystem. Zooplankton is an important major grazer in aquatic food webs and also source of fish food, also for other aquatic organisms (Head & Pepin 2010; Beaugrand 2008). Through their rapid turn-over, zooplankton can be used as water quality indicators (Ismail & Adnan 2016). The environmental conditions, through synergic action of the abiotic and biotic components, determine the spatial and temporal distribution of the species (Rebai et al. 2012).

Both DO and BOD are important water quality indicators reflecting the intensity of the oxygen consuming processes (Hudson et al. 2008; Sánchez et al. 2007). The DO can have a strong influence on the biocenosis structure at higher consumers level such as fish. In Lake Snagov the values of dissolved oxygen were lower ( $3.88$ -  $5.93 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ ) than accepted by national legislation. The drop values during the Summer (reached the minimum value,  $2.185 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$  in July) can be considered harmful. In addition, BOD provide clues on the intensity of the biological processes at the sampling moment and about the load of organic matter. Through this, BOD had slightly elevated values confirming the presence of active microbial communities involved in degradation processes.

The TN and TP are the main estimators of eutrophication degree in aquatic ecosystems. In Lake Snagov, **both concentrations have not indicated exceedances of critical loads of eutrophication**. In comparison with other natural lakes ( $\text{TP} = 0.04$  -  $0.510 \text{ mg L}^{-1}$ ;  $\text{TN} = 2.9$  -  $14.6 \text{ mg L}^{-1}$ ) our values were low (Petriki et al. 2017; Vlastos et al. 2017; Liang 2014). However, in our study, TP values were slightly increased, if we take into account that  $0.02 \text{ mg L}^{-1}$  is considered a critical value from which eutrophication can be accelerated (Liang, 2014; Vollenweider 1976). This fact can be also supported by value of chlorophyll *a* above the eutrophication threshold ( $8 \mu\text{g L}^{-1}$ ) in autumn (Table 1). In the eutrophicated natural lakes the chlorophyll *a* values are much higher ( $61$ - $69 \mu\text{g L}^{-1}$ ) (Søndergaard et al. 2018). As a result, the constant maintenance of the TP was supported by relatively low values of chlorophyll *a*, indicating a balance in the development of phytoplankton in the lake.

The TN:TP ratio is used to determine the limiting nutrient for the primary producers development and value 14 indicate the threshold used to determine the source of nutrients (N or P) (Downing & McCauley 1992; Porcella & Bishop 1975). The over 14 values of TN:TP ratio in all our measurements revealed the limiting nature of phosphorus for the development of phytoplankton in the ecosystem.

The seasonal variations of plankton communities can be found in two model types: unimodal - reaching one developmental peak, especially during warm (spring or summer), encountered in green algae and bimodal - with two peaks, as it is found in most of zooplankton communities (Winder & Cloern 2010; Cebrián & Valiela 1999). The bimodal pattern of abundance is known as having the first peak in the beginning of the year and a second in autumn.

In Lake Snagov case, according to the dominant curves, the periods with high diversity that correspond to the characteristics of good diversity and heterogeneity, are found in April and October. These two periods correspond to optimal conditions of zooplankton development, and which could be comparable to those mentioned in the literature. However, the peculiar abundances reported in May with some dominant species much abundant than the other zooplankton components, in our opinion represents an ecosystem imbalance.

This can be highlighted also with reduced diversity but very little surprised by chemical analyses (only conductivity). The abundances of species *Carchesium polypinum* and *Bosmina longirostris* highlights an impact on zooplankton communities in this period. Other studies have reported high growth rate of ciliate, with significant changes in structure and abundance has been indicators of saprobity conditions (Madoni & Zangrossi 2005; Miao et al. 2004; Madoni & Bassanini 1999; Taylor 1983). *Carchesium polypinum*, a colonial species is an indicator of organic pollution and also signals self-purification processes (Kusuoka & Watanabe 1987; Stöessel 1987). The protozoa, in particular ciliates and testacea (tested amoebae), play an important role in microbial food web and detritus degradation, being involved in the processes of treating certain forms of water pollution (Fernandes et al. 2013; Martín-Cereceda et al. 1996). Also, the presence in high densities of small-sized cladoceran *Bosmina longirostris* indicates the eutrophy or organic pollution (Ismail & Adnan 2016; Singh et al. 2013; Pedrozo & Rocha 2005). Among observed other abundant species as *Keratella quadrata*, *Polyarthra dolychoptera*, *Mesocyclops crassus*, *Ceriodaphnia pulchella*, through their cosmopolitan features, tolerates such conditions. In general, the juvenile and nauplii copepods are abundant, as found in many studies in aquatic systems (Milstein et al. 2009), so we cannot appreciate a particular behaviour in our case. Besides, the presence of many accidental species and some dominant ones reflects a certain degree of anthropogenic influences undetected at the chemical level. Normally, due to the high heterogeneity of the lake, with pelagic and littoral zones with different kind of macrophytes, it should be characterized by a high diversity of zooplankton (Zhao et al. 2018).

Thus, dynamics of species is determined by their tolerance to environmental conditions (Marneffe et al. 1998). As we above mentioned, in May it was registered an unexpected “bloom” with *Bosmina longirostris* and *Carchesium polypinum*. The results of CCA confirmed the influence of factors indicating organic pollution in water by following parameters COD-Cr, BOD, conductivity on Cladocera and Ciliata communities. Also, CCA demonstrated a positive relationship of chlorophyll *a* with Rotifera and Testacea and an inverse correlation with Cladocera, Ciliata and Copepoda. These findings strengthen our hypothesis about the unexpected bloom of *Bosmina longirostris* and *Carchesium polypinum*.

Even in mesotrophic conditions, the zooplankton communities presented significant variations from one sampling month to another and their response to environmental conditions confirms the presence of external pressure. A constant monitoring of zooplankton is more effective in catching the perturbations induced by different chemical components such as xenobiotic substances, antibiotics, toxins, PAHs. The complex chemical analysis is not always available.

## CONCLUSIONS

The Lake Snagov emphasizes a mesotrophic state and a good water quality concerning nutrients and chlorophyll a concentration. Otherwise, the DO depletion under the optimal values and the high BOD draws us the attention to processes of biological degradation. The numerical dominance of certain species known with high tolerance of organic pollution support these observations. Our findings indicate that zooplankton brings valuable information in studies of aquatic ecosystems in addition to other parameters and can be considered good bioindicator in water quality monitoring. **By means of these communities, it was evident that May was unfavourable for the biotic component of the system and a recovery trend follows to this period.** So, we believe that Lake Snagov is influenced by anthropogenic impact but without major effects. The lake, by its complexity has the resilience and self-regulation mechanisms.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study was funded by the project “Natural protected area of Snagov Lake – adequate management based on scientific studies, information and awareness rising” (code 17610) and project no. RO1567-IBB02/2015 from the Institute of Biology Bucharest of Romanian Academy.

Authors acknowledge to: Tatiana Dimache and Georgel Petre for the physico and chemical analyses, Sofa Stela for technical support and to the references for critical comments and manuscript revision.

## REFERENCES

- ▶ Bartoš E. 1954. Koreňonožce radu Testacea. Vyd. Slov. Akad. Vied, Bratislava (in Slovak), 190 pp.
- ▶ Beaugrand G., Edwards M., Brander K., Luczak C. & Ibanez F. 2008. Causes and projections of abrupt climate-driven ecosystem shifts in the North Atlantic. *Ecol. Lett.* 111: 1157-1168.
- ▶ Bradl Z. 2005. Freshwater Copepods and Rotifers: Predators and their Prey. *Hydrobiologia.* 546: 475-489.
- ▶ Brooks J.L. 1959. Cladocera pp 587-656 in W.T. Edmondson (ed.): *Freshwater Biology*, John Wiley & Sons, New York.
- ▶ Cebrián J. & Valiela I. 1999. Seasonal patterns in phytoplankton biomass in coastal ecosystems, *J. Plankton Res.*, 21(3): 429-444.
- ▶ Chalkia E. & Kehayias G. 2013. Zooplankton community dynamics and environmental factors in Lake Ozeros (Greece). *Mediterr. Mar. Sci.* 14: 32-41.
- ▶ Colwell R. K. 2012. Biodiversity: concepts, patterns, and measurement, pp.257-263. in Levin S. A. (eds), *The Princeton Guide to Ecology*, Princeton, NJ: Princeton University Press.
- ▶ Damian-Georgescu A. 1963. Fauna Republicii Socialiste Romania, Crustacea. Copepoda. Cyclopidae. Edit. Academiei R.S. România vol IV No 6, București, [Romanian Fauna. Crustacea, vol. IV, Fasc. 6, Copepoda. Cyclopidae, Romanian Academy Publishing House, Bucharest, Romania.], 204 pp.
- ▶ Damian-Georgescu A. 1966. Fauna Republicii Socialiste Romania, Crustacea. Copepoda. Calanoida. Edit. Academiei R.S. România vol IV No 8, București, [Romanian Fauna. Crustacea, vol. IV, Fasc. 8, Copepoda. Calanoida, Romanian Academy Publishing House, Bucharest, Romania], 130 pp.
- ▶ Damian-Georgescu A. 1970. Fauna Republicii Socialiste Romania, Crustacea. Copepoda. Harpacticoida. Edit. Academiei R.S. România vol IV No 11, București, [Romanian Fauna. Crustacea, vol. IV, Fasc. 11, Copepoda. Harpacticoida, Romanian Academy Publishing House, Bucharest, Romania], 248 pp.

- ▶ Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 Establishing a Framework for Community Action in the Field of Water Policy Official J. L 327, 22 December 2000, pp. 0001–0073 ([www.europa.eu.int](http://www.europa.eu.int)).
- ▶ Downing J.A. & McCauley E. 1992. The nitrogen: phosphorus relationship in lakes, *Limnol.Oceanogr.* 37 (5): 936-945.
- ▶ Dussart B. H. & Defaye D. 1995. Copepoda. Introduction to the Copepoda. Vol 7. in Dumont H.J.F. (eds), *Guides to the Identification of the Microinvertebrates of the Continental Waters of the World*. Leiden: Backhuys Publishers, 277 pp
- ▶ Dussart B.H. & Defaye D. 2001. Introduction to the Copepoda, Vol. 16. In: Dumont HJF, editor. *Guides to the identification of the microinvertebrates of the continental waters of the world*. Second edition. Leiden: Backhuys Publishers. 344 pp.
- ▶ Edmonson W.T. & Winberg G.G. 1971. A manual on the methods for the assessment of secondary productivity in freshwaters (IPB Handbook 17), Blackwell Scientific Publications, Oxford and Edinburg, 358 pp.
- ▶ Fernandes I., Duarte S., Cássio F. & Pascoal C. 2013. Effects of riparian plant diversity loss on aquatic microbial decomposers become more pronounced with increasing time. *Microb Ecol.* 4:763–772.
- ▶ Foissner W., Berger H. & Kohmann F. 1992. Taxonomische und Ökologische Revision der Ciliaten des Saprobiensystems. Band II: Peritricha, Heterotrichida, Odontostomatida. Landesamtes für Wasserwirtschaft, Bayer, 502 pp.
- ▶ Foissner W., Berger H. & Kohmann F. 1994. Taxonomische und Ökologische Revision der Ciliaten des Saprobiensystems. Band III: Hymenostomata, Prostomatida, Nassulida. Landesamtes für Wasserwirtschaft, Bayer, 548 pp.
- ▶ Foissner W., Blattee H., Berger H. & Kohmann F. 1991. Taxonomische und Ökologische Revision der Ciliaten des Saprobiensystems. Band I: Cyrtophorida, Oligotrichida, Hypotrichia, Colpodea. Landesamtes für Wasserwirtschaft, Bayer, 478 pp.
- ▶ Grospietsch T.H. 1972. Rhizopoden. Kosmos-Verlag Franckh-Stuttgart, 86 pp.
- ▶ Hammer Ø, Harper D.A.T.& Ryan P.D. 2009. PAST - Palaeontological Statistics, ver. 1.89, 92 pp;
- ▶ Head E. & Pepin P. 2010. Spatial and inter-decadal variability in plankton abundance and composition in the Northwest Atlantic (1958–2006). *J.Plankton Res.* 32 (12): 1633-1648.
- ▶ Hudson N., Baker A., Ward D., Reynolds D.M., Brunson C., Carliell-Marquet C. & Browning S., 2008. Can fluorescence spectrometry be used as a surrogate for the Biochemical Oxygen Demand (BOD) test in water quality assessment? An example from South West England. *Sci Total Environ* 391: 149-158.
- ▶ Ismail A.H. & Adnan A.A.M. 2016. Zooplankton Composition and Abundance as Indicators of Eutrophication in Two Small Man-made Lakes. *Trop Life Sci Res*, 27(1):31-38.
- ▶ Jeppensen E., Nöges P., Davidson T.A., Haberman J., Nöges T, Blank K., Lauridsen T.L., Søndergaard M., Sayer C., Laugaste R., Johansson L.S., Bjerring R. & Amsinck S.L., 2011. Zooplankton as indicators in lakes: a scientific-based plea for including zooplankton in the ecological quality assessment of lakes according to the European Water Framework Directive (WFD). *Hydrobiologia*; 676:279–297.
- ▶ Kim G.H., Chang I.S., Gil G. C., Park H. S. & Kim H. J. 2003. Novel BOD (biological oxygen demand) sensor using mediator-less microbial fuel cell. *Biotechnol. Lett.* 25: 541-545.
- ▶ Kusuoka Y.& Watanabe Y. 1987. Growth and survival of peritrich ciliates in an urban stream. *Oecol.* 73(1): 16-20.
- ▶ Liang X., Zhu S., Ye R., Guo R., Zhu C., Fu C., Tian G. & Chen Y. 2014. Biological thresholds of nitrogen and phosphorus in a typical urban river system of the Yangtz delta, China. *Environ Pollut.* 192:251-258.
- ▶ Lorenz S., Pusch M.T., Miler O. & Blaschke U. 2017. How much ecological integrity does a lake need? Managing the shores of a peri-urban lake. *Landsc Urban Plan.* 164 91–98.
- ▶ Madoni P.& Bassanini N. 1999. Longitudinal changes in the ciliated protozoa communities along a fluvial system polluted by organic matter. *Eur. J. Protistol.* 35:391 – 402.

- ▶ Madoni P.& Zangrossi S. 2005. Ciliated protozoa and saprobial evaluation of water quality in the Taro River (northern Italy). *Ital. J. Zool.*72(1): 21-25.
- ▶ Marneffe Y., Comblin S. & Thomé J. 1998. Ecological water quality assessment of the Bûtgenbach lake (Belgium) and its impact on the River Warche using rotifers as bioindicators. *Hydrobiologia.* 387/388: 459-467.
- ▶ Martín-Cereceda M., Pérez-Uz B., Serrano S. & Guinea A. 2001. Dynamics of protozoan and metazoan communities in a full scale wastewater treatment plant by rotating biological contactors, *Microbiol. Res.* 156: 225–238;
- ▶ McAleece N., Gage J.D.G., Lamshead P.J.D. & Paterson G.L.J. 1997. BioDiversity Professional statistics analysis software. Jointly developed by the Scottish Association for Marine Science and the Natural History Museum London.
- ▶ Mialet B., Gouzou J., Azémar F., Maris T., Sossou C., Toumi N., Van Damme S., Meire P. & Tackx M. 2011. Response of zooplankton to improving water quality in the Scheldt estuary (Belgium.). *Estuar Coast Shelf Sci.* 93:47-57.
- ▶ Milstein A., Wahab M.A., Kadir A., Sagor M.F.H. & Islam M.A. 2009. Effects of intervention in the water column and/or pond bottom through species composition on polycultures of large carps and small indigenous species. *Aquaculture*, 286(3–4):246-253.
- ▶ Miao W., Yu Y., Shen Y. & Zhang X. 2004. Intraspecific phylogeography of *Carchesium polypinum* (Peritrichia, Ciliophora) from China, inferred from 18S-ITS1-5.8S ribosomal DNA, *Sci. China, C, Life Sci.* 47(1):11-17.
- ▶ Negrea Șt. 1983. Fauna Republicii Socialiste Romania, Crustacea. Cladocera. Edit. Academiei R.S. România IV No 12, București, [Cladocera, In: Romanian Fauna, Romanian Academy Publishing House, Bucharest, Romania], 399 pp.
- ▶ Otto S.A., Diekmann R., Flinkman J., Kornilovs G. & Möllmann C. 2014. Habitat Heterogeneity Determines Climate Impact on Zooplankton Community Structure and Dynamics. *PLoS One* 9: 1-11.
- ▶ Pedrozo C. S. & Rocha O. 2005. Zooplankton and water quality of lakes of the Northern Coast of Rio Grande do Sul State. Brazil. *Acta Limnol. Brasiliensia.* 17: 445– 464
- ▶ Petriki O., Lazaridou M. & Bobori D.C. 2017. A fish-based index for the assessment of the ecological quality of temperate lakes. *Ecol Indic.* 78:556-565
- ▶ Porcella D.B. & Bishop A.B. 1975. Comprehensive management of phosphorous water pollution. Ann Arbor Science Publishers, USA. 303pp
- ▶ Postel S. & Carpenter S. 1997. Freshwater Ecosystem Services, pp.195-214. In: Daily G.C. (ed), *Nature's Services: Societal Dependence on Natural Ecosystems*, Island Press Washington, D.C.
- ▶ Romanian Ministry of Environment and Water Management (2006). Disposition of Romanian Ministry of Environment and Water Management no. 161/2006, Monitorul Oficial nr. 511, 13.06.2006; For Normative approval regarding the classification of surface water quality in order to establish ecological status of water bodies.
- ▶ Rudescu L. 1960. Rotatoria. Trochelminthes, Edit. Academiei R. S. România vol II No 2, București, [Rotatoria. The Fauna of Romania. Trochelminthes, Romanian Academy Publishing House, Bucharest, Romania], 1192 pp.
- ▶ Sánchez E., Colmenarejo M.F., Vicente J., Rubio A., Garcia M.G., Travieso L. & Borja R. 2007. Use of the water quality index and dissolved oxygen deficit as simple indicators of watersheds pollution. *Ecol. Indic.* 7: 315-328.
- ▶ Shevtsova L.V. & Guleykova L. V. 2005. Long-term Dynamics of Zooplankton of the Desna River, *Hydrobiol. J.* 41 (4): 3-14.
- ▶ Singh U.B, Ahluwalia A. S., Sharma C., Jindal R. & Thakur R.K. 2013. Planktonic indicators: A promising tool for monitoring water quality (early-warning signals). *Ecology, Environment and Conservation. Ecol. Env. & Cons.* 19. 793-800.
- ▶ Søndergaard M., Lauridsen T.L., Johansson L.S. & Jeppesen E. 2018. Gravel pit lakes in Denmark: Chemical and biological state. *Sci. Total Environ.* 612: 9-17

- ▶ Song K. P., Winters C., Xenopoulos M.A., Marsalek J. & Frost P.C. 2017. Phosphorus cycling in urban aquatic ecosystems: connecting biological processes and water chemistry to sediment P fractions in urban stormwater management ponds. *Biogeochemistry*. 132(1–2): 203–212.
- ▶ Ștefan D.S., Neacșu N., Pincovschi I. & Ștefan M. 2017. Water Quality and Self-purification Capacity Assessment of Snagov Lake, *Revista De Chimie [The Chemistry Journal]*, 68(1):60-64,
- ▶ Stössel F. 1987. Effect of the coefficients of discharge on ciliate populations of a running water contaminated by municipal wastewater. *Arch. Hydrobiol.* 108: 483-497.
- ▶ Taylor W.D. 1983. A comparative study of the sessile, filter-feeding ciliates of several small streams, *Hydrobiologia*. 98(2): 125–133.
- ▶ Van Egeren S.J., Dodson S.I., Torke B. & Maxted J.T. 2011. The relative significance of environmental and anthropogenic factors affecting zooplankton community structure in Southeast Wisconsin Till Plain lakes. *Hydrobiologia*. 668:137–146
- ▶ Vlastos D., Dailianis S., Kindou A., Antonopoulou M., Gianni A. & Zacharias I. 2017. Assessing the environmental/human risk of potential genotoxicants in water samples from lacustrine ecosystems: The case of lakes in Western Greece. *Sci. Total Environ.* 574:246–252
- ▶ Voight M. 1956. Rotatoria – Die Rädertiere Mitteleuropas, Ed Gebrüder Borntraeger – Berlin – Nikolasse, 508 pp.
- ▶ Vollenweider R.A. 1976. Advances in Defining Critical Loading Levels for Phosphorus in Lake Eutrophication. In: *Mem. Ist. Ital. Idrobiol. Dott. Marco De Marchi*. 33: 53-83
- ▶ Whittaker R. J., Willis K. J. & Field R. 2001. Scale and species richness: towards a general, hierarchical theory of species diversity. *J. Biogeogr.* 28: 453–470.
- ▶ Winder M. & Cloern J.E. 2010. The annual cycles of phytoplankton biomass. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 365(1555):3215-3226.
- ▶ Yang Y., Xu C., Cao X., Lin H. & Wang J. 2017. Antibiotic resistance genes in surface water of eutrophic urban lakes are related to heavy metals, antibiotics, lake morphology and anthropic impact. *Ecotoxicology* 26:831–840.
- ▶ Zhao K., Wang L., Riseng C., Wehrly K., Pan Y., Song K., Da L., Pang W., You Q., Tian H., Liu S. & Wang Q. 2018. Factors determining zooplankton assemblage difference among a man-made lake, connecting canals, and the water-origin river, *Ecol Indic*, 84: 488-496.
- ▶ Zinevici V., Florescu L., Parpală L. & Moldoveanu M. 2014. The zooplankton of Lake Snagov (România): diversity, structure and production, *Romanian Journal of Biology – Zoology*; 59(2): 129-142.



# ASPARTATE TRANSCARBAMOYLASE OBTAINED FROM A PSYCHROPHILIC BACTERIUM (*RUGAMONAS SP.*) ISOLATED FROM AN ANTARCTIC LAKE



Victoria I. Păun<sup>1</sup>, Georgiana Necula-Petrăreanu<sup>1</sup>, Antonio Mondini<sup>1</sup>, Cristina Purcărea<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Molecular Microbiology, Institute of Biology, Department of Microbiology, Romanian Academy, Bucharest, Romania

## ABSTRACT

Because most of the biosphere is permanently at low temperatures with almost 11% of the Earth's surface being covered by polar ice-caps and glaciers, knowing the metabolic activity of the microorganisms found at temperatures below 0° is fundamental in establishing their exact role in the environment. Microorganisms that possess the ability to survive and proliferate in harsh environments are defined as extremophiles. The adaptation mechanisms found in this type of microorganisms have been of higher importance for the scientific community for some time, especially because of the high thermal stability their enzymes possess, which makes them valuable for biotechnological applications.

The ones that are adapted to low temperatures are known as psychrophiles, and their enzymes have a low energy consumption which gives them an advantage, mostly because it is believed that psychrophilic microorganisms could be of great use in genetic engineering of thermolabile proteins. Pyrimidines are present in every type of organism, contributing to the *de novo* synthesis of nucleic acids. Pyrimidine nucleotide biosynthesis pathway is one of the oldest metabolic pathways found in almost every type of species. Aspartate carbamoyltransferase (E.C. 2.1.3.2) plays a role in the regulation of pyrimidine nucleotide biosynthesis by catalyzing the first specific step in the biosynthesis pathway of UMP (Uridine monophosphate).

The purpose of this paper was to obtain Aspartate transcaramoylase from *Rugamonas sp.* PAMC27505 – a psychrophilic bacterial strain, isolated from a lake located on King George Island, Antarctica. To do so, the objectives were as follows: (1) analyzing the structure of the amino acid sequence of ATCase from *Rugamonas sp.* PAMC27505; (2) amplifying the pyrB gene which encodes for ATCase; (3) cloning the catalytic subunit part of pyrB gene in pHAT2 vector and obtaining the pATCR plasmid; (4) obtaining the recombinant ATCase via genetic expression in *Escherichia coli* BL21(DE3) and optimizing the expression protocol for the heterologous soluble protein.

## INTRODUCTION

Extremophiles are capable of survival and proliferation in environments with extreme physical (temperature, pressure, radiation) and geochemical (salinity, pH, redox potential) parameters. Most extremophiles are Prokaryotes, belonging to Archaea and Bacteria taxonomic domains (Horikoshi & Bull, 2011; Stan-Latter, 2012; Vermelho *et al.*, 2015). Extremotroph organisms are much more diverse and have the capability to tolerate and grow in extreme conditions but cannot grow optimally in extreme habitats (Mueller *et al.*, 2005; Horikoshi & Bull, 2011). Both types of organisms were classified based on the environment in which they can be found (Ta-

ble 1). More so, extremophiles have different metabolic and structural characteristics based on the extreme environment in which they survive (Horikoshi et al., 2011; Seckbach et al., 2013).

Psychrophilic microorganisms are widespread particularly in frozen soil, snow and ice from polar regions, on the surface and in the intestine of marine fish, and in springs, lakes and soils from temperate regions (Zarnea & Popescu, 2011). In 1975, Richard Morita was the first scientist to define the term “psychrophily” and to establish the difference between psychrophiles and psychrotolerant organisms (Morita, 1975). The 1975 definition for psychrophiles: “organisms having an optimal temperature for growth at about 15° or lower, a maximal temperature for growth at about 20°, and a minimal temperature for growth at 0° or below” (Morita, 1975) is used even now, but the temperature variation should be reconsidered mostly because of the high number of psychrophilic bacteria isolated from a lot of different habitats, not just cold ones (Helmke & Weyland, 2004; Nogi, 2011).

Organisms from all three domains of life – Archaea, Prokarya and Eukarya – produce and use Aspartate transcarbamoylase (ATCase, E.C.2.1.3.2) an enzyme specialized to catalyze the reaction between carbamoyl phosphate and aspartate for the formation of N-carbamoyl-L-aspartate – precursor in the pyrimidine *de novo* biosynthetic pathway (Jones et al., 1955). ATCase catalyzes the first specific step of the UMP biosynthesis pathway and is the main regulatory site of the pyrimidine biosynthetic pathway from most organisms (Cunin et al., 1985; Ladjimi et al., 1985). Most studies regarding the structure and function were carried out on the *Escherichia coli* ATCase, which became the prototype of allosteric enzymes (Lipscomb & Stevens, 1990; Vickrey et al., 2002). The gene *pyrB* encodes for the catalytic subunit of ATCase, while for the *E. coli* enzyme it was shown that the catalytic and regulatory polypeptide chains are encoded by *pyrB* and *pyrI* cistrons respectively, which in turn forms a bicistronic operon where the catalytic cistron is proximal-promoter (Perbal & Hervé, 1972; Roof et al., 1982). ATCase is a ubiquitous enzyme, catalyzing the same reaction in all organisms, but it also shows a remarkable polymorphism (Purcarea et al., 2003). Bacterial ATCase can be classified into: 1) Class A, 480-kDa dodecamers, consisting of two catalytic trimers and six regulatory subunits, 2) Class B, 310-kDa dodecamers, with two catalytic trimers and three regulatory dimers that have a role in binding allosteric effectors, like in the case of *E. coli* ATCase (Wiley & Lipscomb, 1968) and 3) Class C, unregulated 100-kDa catalytic trimers, *B. subtilis* specific enzyme, coded by *pyrB* gene and consists of three identical 34-kDa polypeptide chains, with no associated regulatory subunits and no allosteric inhibition and activation (Schurr et al., 1995).

Table 1. Classification of extremophiles based on the environment in which they grow and proliferate. (after Horikoshi & Bull, 2011)

Extremophilic microorganism	Specific environmental characteristics
Acidophile	Optimum pH: $\leq 3-4$
Alkaliphile	Optimum pH: $\geq 10$
Endolithic	Living in or inside stones
Halophile	$\geq 1$ M NaCl concentration
Hyperthermophile	Optimum temperature: $\geq 80^{\circ}\text{C}$
Hypolithic	Living inside rocks in the cold deserts
Metallo-tolerant	Tolerates a high concentration of heavy metal ions
Oligotroph	Environments with very low levels of nutrients
Piezophile	Optimum hydrostatic pressure: $\geq 40$ Mpa
Psychrotolerant (Eurypsychrophile)	Temperatures $\geq 25^{\circ}\text{C}$ and $\leq 15^{\circ}\text{C}$
Psychrophile (Stenopsychrophile)	Optimum temperature: $\leq 10^{\circ}\text{C}$ , maximum temperature: $20^{\circ}\text{C}$



Extremophilic microorganism	Specific environmental characteristics
Radioresistant	Survives high doses of radiation
Thermophile	Optimum growth temperature: 60°C - 85°C
Toxitolerant	Tolerates high levels of toxic agents (organic solvents)
Xerophile	Grows in conditions with low water concentrations

An important cellular control mechanism is regulation of a metabolic pathway with the help of allosteric enzymes. ATCases play a pivotal role in cellular metabolism because: they catalyze a unique metabolic reaction, they modify the reaction rate as a response to the cellular environment and are the key enzymes of this pathway. ATCase regulation implies binding signaling molecules to the regulatory site, which in turn modifies the catalytic activity (*Lipscomb & Kantrowitz, 2012*). A study from 1998, showed that the ATCase from a psychrophilic bacterial strain *TAD1* (isolated from continental frozen water in Antarctica) has a 26% higher activity at 0° than it has at 30° (*Sun et al., 1998*). In comparison with the *E. coli* ATCase, the kinetic properties of the *TAD1* enzyme suggest that the high activity at low temperatures might be a result of an increased catalytic efficiency, property which might be a direct result of a discrete modification at the catalytic site since the psychrophilic enzyme is as stable at high temperatures as its homologue from the mesophilic bacteria *Escherichia coli* (*Sun et al., 1998*). It was shown that *TAD1* psychrophilic bacterium possesses an ATCase that has the unusual ability to catalyze the carbamylation of the amino-group of aspartate at low temperatures, while being submitted to allosteric regulation via CTP and UTP feedback inhibition (*Sun et al., 1998*). Unlike the *E. coli* ATCase, ATP has no stimulating role over the psychrophilic enzyme (*Thiry & Hervé, 1978*).

## MATERIALS AND METHODS

### *Rugamonas* sp. PAMC27505 strain

*Rugamonas* genus included in the Pseudomonadaceae family was described and appointed to this family for the first time in 1986 by Austin and Moss, while also describing the first species of the genus, *Rugamonas rubra* (*Austin & Moss, 1986, 1987*). In culture up to 7 days old, 0,8-0,9 x 2,4-4,0 µm Gram-negative rods with rounded ends, motile by means of one or more sub-polar/polar flagella are forming, while after 7 days the motility is reduced and intracellular granules of prodigiosin start to develop. Chemoorganotrophic organisms with respiratory metabolism but never fermentative, catalase and oxidase producers. Anaerobic reduction of nitrates to N<sub>2</sub>, with growth occurring in NaCl 0,0-0,5% (w/v). It does not secrete arginine decarboxylase, but some strains of *Rugamonas rubra* can produce lysine and ornithine decarboxylases. The first isolation was from river water and based on experiments done in 1984 by Austin and Moss, it was shown that as the culture grows older the bacterial cells become pleomorphic.

*Rugamonas* sp. PAMC27505 strain belonging to the Korea Polar Research Institute (KOPRI) microbial collection was isolated from a lake from King George Island, South-Shetland Islands, Antarctica. For its cultivation two types of growing media were used: Reasoner's 2A (R2A) agar and broth, and Luria-Bertani (LB) agar and broth. It was first grown in R2B, at 15° for 48 hours, after which time it was transferred on R2A and kept at 15°, for 7 days. Alternatively, the strain was transferred in LB broth and agar, and incubated at 17° for 48 hours and 7 days respectively, to determine its ability to grow on media other than those specifically for water-isolated bacteria. Both culture types were stored at -80° in 50% (w/v) Glycerol.

### **Genomic and plasmid DNA extraction**

Genomic DNA (gDNA) from *Rugamonas sp.* PAMC27505 strain's biomass was isolated using DNeasy Blood&Tissue Kit (Qiagen, USA) following the standard protocol modified with two additional lysis steps. For the preliminary chemical lysis step, the biomass obtained after centrifugation x 7,000 rpm, 30 minutes, was resuspended in Mutanolysin 5-U/ $\mu$ L and incubated at 37° for 1 hour in a Thermomixer R (Eppendorf, USA). Cell disruption was then performed in special 2-mL tubes for mechanical lysis (AnalytikJena, Germany) in the presence of small ceramic lysis beads innuSPEED Lysis Tube X (AnalytikJena, Germany) and 180- $\mu$ L of ATL Buffer, for 12 minutes, at 20°C, and 50 Hz-power, using a SpeedMill PLUS homogenizer (AnalytikJena, Germany). The obtained lysate cells were further processed according to the manufacturer's protocol. The gDNA integrity was verified by PCR amplification of 16S rRNA gene using the universal set of primers for prokaryotes 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCT-CAG-3') and 1512R (5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3') (Edwards *et al.*, 1989; Felske *et al.*, 1998). The cloning was done using pHAT2 bacterial expression vector. The concentrations and purity ( $A_{260}/A_{280}$  ratio) of both gDNA and plasmid DNA, were determined spectrophotometrically using a NanoDrop 1000 (ThermoFischer Scientific, USA).

### **PCR gene cloning**

For the amplification of the target gene, a set of primers were designed and used: 505PYRBF (5'-ATATCCATGGTTAATCCGCAACTG-3') and 505PYRBR (5'-TATGAAGCTTCATCCT-TGATTTCCCG-3'). PCR amplification was done with 2 different DNA-polymerase, DreamTaq DNA Polymerase (5-U/ $\mu$ L) for a preliminary annealing-temperature optimization step and Pfu DNA Polymerase (2,5-U/ $\mu$ L, recombinant) for the final PCR amplification step for obtaining the target-amplicon. All the PCR amplifications were performed using a Mastercycle proS vapo.protect (Eppendorf, USA). The obtained amplified gene was purified using the standard protocol of PureLink PCR Purification Kit (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, USA).

Both the pHAT2 vector and the amplified *pyrB* gene were enzymatically digested using FastDigest *NcoI/HindIII* (ThermoFisher Scientific, USA) restriction enzymes at 37° for 2 hours, and the obtained products were purified again using PureLink PCR Purification Kit (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, USA). After the enzymatic digestion step, the pHAT2 vector was dephosphorylated using FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphate 1 U (ThermoFisher Scientific, USA), by incubation at 37° for 10 minutes. The reaction was stopped at 75° for 5 minutes. All incubation steps were done using a Thermomixer R (Eppendorf, USA). Ligation of the insert into pHAT2 vector (3:1 molar ratio) was done with 5-Weiss U/ $\mu$ L T4 DNA Ligase (ThermoFisher Scientific, USA), and the reaction was incubated at 20° for 2 hours.

The ligation mix was inserted into *E. coli* DH5 $\alpha$  competent cells (Mix&Go Competent *E. coli* cells, Zymo Research, USA) following the manufacturer transformation protocol to identify, isolate and amplify the pATCR construct. The resulting cells were inoculated on LB-agar media in the presence of 100- $\mu$ g/mL ampicillin, for 16 hours at 37°. After 16 hours, three resulting colonies were transferred into LB-broth with ampicillin, incubated at 37° for 16 hours, and the obtained biomass was used for plasmid extraction using the Zyppy Plasmid Miniprep kit (Zymo Research, USA). The result of ligation was verified by enzymatic digestion using FastDigest *HindIII* (ThermoFisher Scientific, USA), which will produce a fragment of 5409 bp.

### ***E. coli* gene expression**

The bacterial expression of pATCR construct took place using *E. coli* BL21(DE3) strain (BioLabs, USA). After transformation, the BL21(DE3)pATCR was inoculated in 1-mL LB-broth with 100- $\mu$ g/mL ampicillin at 37° for 16 hours. The obtained inoculum was transferred in fresh LB-broth media with ampicillin in a 1:100 ratio (w/v) and incubated in the same conditions up to O.D.<sub>600</sub> = 0.6, at which time 0.5-mM Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) was added for induction, and the protein expression was determined at 15°, 20° and 37° for 3 and 16 hours respectively. After this, the cells were centrifugated and resuspended in 50-mM Tris-HCl buffer, pH 7 and sonicated using SONOPLUS (Bandelin, Germany) with the following protocol: 55% power, 5 cycles with 5 seconds impulse and 60 seconds break. The cellular extract was centrifugated for 30 minutes at 13,000 rpm, and the soluble fraction was separated from the insoluble one. The latter was resuspended in 50-mM Tris-HCl buffer, pH 7 and the two fractions were analyzed with SDS-PAGE electrophoresis using a Mini-PROTEAN Tetra Cell vertical gel electrophoresis (BioRad Laboratories, USA). The bands were visualized using staining/distaining solutions Coomassie Brilliant Blue (BioRad Laboratories, USA) and 10% Acetic acid.

#### *Sequencing of pyrB gene and bioinformatic methods for analysing the protein structure*

The PCR amplicon representing the *pyrB* gene from *Rugamonas sp.* PAMC27505 strain inserted into the pHAT2 vector was sequenced with the universal 16S rRNA gene primers mentioned above to verify the accuracy of the PCR amplification. The sequencing was done by MACROGEN Amsterdam, with the Sanger method. The primary structure of ATCase protein from *Rugamonas sp.* PAMC27505 was analyzed using EMBOSS Needle online program ([http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss\\_needle/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/)) for the global pair-alignment and Clustal OMEGA EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) for multiple alignment. The amino-acid composition for the interest protein and three other ATCase (*E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aquifex aeolicus*) was analyzed using ProtParam EXPASY (*Gasteiger et al., 2005*). The amino-acid sequences for *E. coli*, *P. aeruginosa* and *A. aeolicus* were found under the NCBI accession numbers: 85676994, 15595599 and 2983068 respectively.

## **RESULTS AND DISCUSSIONS**

### *Analysis of the protein sequence and homology*

The genomic sequence of *Rugamonas sp.* PAMC27505 strain was previously determined by the KOPRI Institute, when they observed the existence of *pyrB* gene which codifies for the catalytic subunit (c) from ATCase and the absence of *pyrI* gene that codifies for the regulatory subunit (r) usually part of the dodecameric enzyme from *E. coli*. The nucleotide sequence of *pyrB* gene from the Antarctic strain tested in this experiment consists of 966 base pair, and the primary structure of the enzyme is made of 321 amino-acids.

The conservation degree of the primary structure and active sites from the psychrophilic ATCase (ATC.505) was determined based on the amino-acid pair-alignment between our ATCase and the catalytic subunit from two mesophilic bacteria *E. coli* and *Pseudomonas aeruginosa* and one hyperthermophile bacterium *Aquifex aeolicus*. The pair-alignment between ATC.505 and ATC.*E.coli* indicated a partial conservation between the two bacterial enzymes based on the identical and similar amino-acids from the polypeptide sequences. Also,

the catalytic site amino-acids from *E. coli* ATCase (Ser<sup>53</sup>, Thr<sup>54</sup>, Arg<sup>55</sup>, Thr<sup>56</sup>, Ser<sup>81</sup>, Lys<sup>85</sup>, Arg<sup>106</sup>, His<sup>135</sup>, Arg<sup>168</sup>, Arg<sup>230</sup>, Gln<sup>232</sup>) are completely conserved in the psychrophilic ATCase. Because *Rugamonas sp.* belongs to the Pseudomonadaceae taxonomic family, the pair-alignment between the enzyme from *Rugamonas* PAMC27505 and the one from *Pseudomonas aeruginosa* (ATC.505 – ATC.*P.aer*) showed a much higher conservation degree for both the identical amino-acid sequences and the similar ones. More so, the comparative analysis of the primary structure between the psychrophilic enzyme and the one from the hyperthermophile *Aquifex aeolicus* (ATC.505-ATC.*Aq.aeol*) showed the presence of a comparable number of conserved amino-acids, similar to the *E. coli* enzyme. The multiple alignment for the primary structure of the four ATCase from *Rugamonas* PAMC27505, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Aquifex aeolicus* indicated 57 identical amino-acids and 75 similar ones, corresponding to 38-45% conservation percentage between these enzymes (Fig. 1). The fact that all the amino-acids from the catalytic site are conserved among the four types of ATCase (Fig. 1) suggest that this pyrimidine nucleotide biosynthesis pathway key enzyme was conserved along the phylogenetic evolution of the Bacteria domain.

The identity and similarity percentages of the amino-acid sequences from the *Rugamonas* PAMC27505 enzyme and the mesophilic and hyperthermophile ATCase (Table 2) indicate a

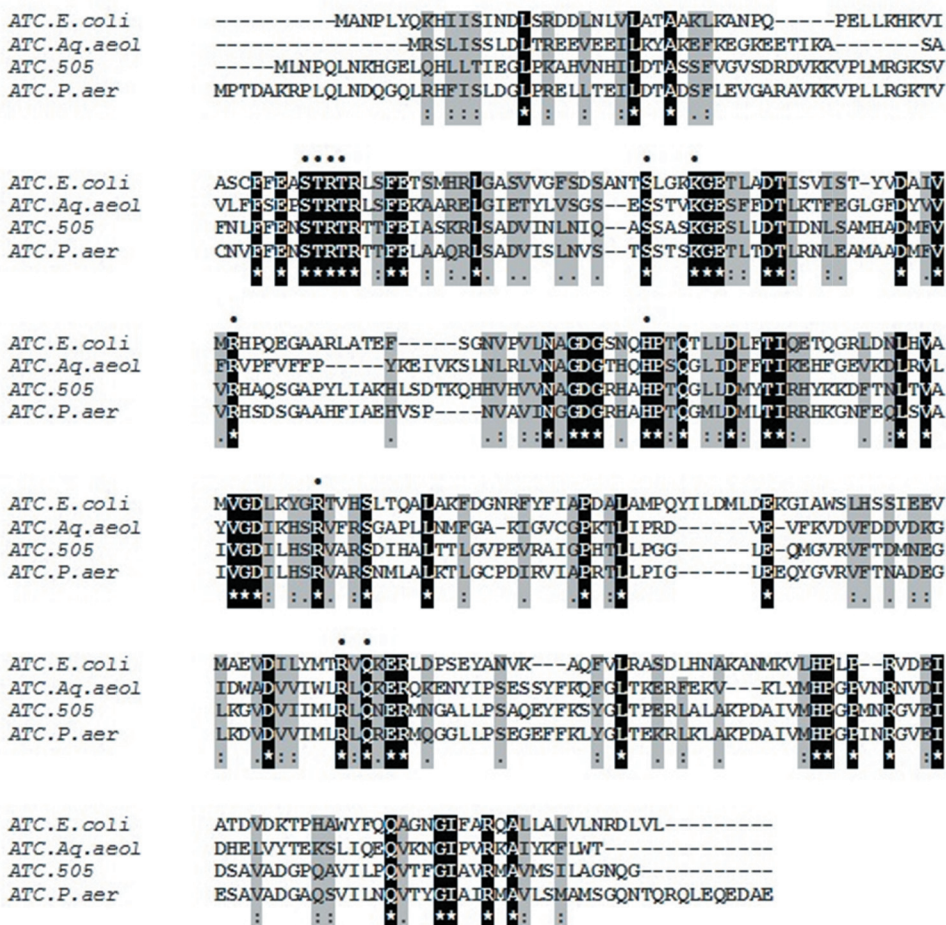


Fig. 1: Multiple alignment between ATCase primary structures from all 4 bacterial strains; identical (black) and similar (grey) amino-acids and active sites (•).

much higher sequence conservation between the psychrophile and *Pseudomonas aeruginosa* (63% identity, 76.3% similarity) than compared to the enzyme from *E. coli* and *Aquifex aeolicus*. Still, the comparable identity and similarity percentages (33-37% identity interval, 49-52% similarity interval) between the psychrophilic enzyme and the mesophilic and hyperthermophilic ones suggest the conservation of ATCase in multiple types of microorganisms, regardless of those microorganism's optimum growth temperature.

Table 2. Identity and similarity degree between the *Rugamonas sp.* PAMC27505 amino-acid sequence and the ATCase from *E. coli*, *P. aeruginosa* and *A. aeolicus*.

	% Identity	% Similarity
<i>Escherichia coli</i>	32.6 %	49.6 %
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	63.0 %	76.3 %
<i>Aquifex aeolicus</i>	36.7 %	52.1 %

Based on this comparative analysis the conclusion can be drawn that ATCase from *Rugamonas sp.* is homologous with the *P. aeruginosa* enzyme, which is in accordance with both species belonging to the same family (Pseudomonadaceae). Thus, is possible for ATCase to associate with dihydroorotase (DHO) forming a dodecameric (atc)<sub>6</sub>(dho)<sub>6</sub> system inside the psychrophilic bacterial cell just like the enzymatic complex identified in *Pseudomonas aeruginosa* (Schurr et al., 1995).

The amino-acid composition analysis (Table 3) of the four types of ATCase was done based on the same sequences as described above. A significant difference can be seen in the content of Cysteine (Cys), Glutamic acid (Glu), Histidine (His) and Proline (Pro) of the *Rugamonas sp.* PAMC27505 ATCase. Cys, amino-acid with a role in the formation of disulfide bridges, is absent (0%) in the composition of the psychrophilic enzyme, unlike the percentage observed for *P. aeruginosa*, *E. coli* and *A. aeolicus* (0.6%, 0.3% and 0.6% respectively), which might indicate a slightly higher flexibility of the psychrophilic enzyme.

Table 3. The ATCase amino-acid content found in *Rugamonas PAMC27505*, *E. coli*, *P. aeruginosa* and *A. aeolicus*.

Amino acid	PAMC27505		<i>P. aeruginosa</i>		<i>E. coli</i>		<i>A. aeolicus</i>	
	No.	Percentage (%)	No.	Percentage (%)	No.	Percentage (%)	No.	Percentage (%)
Ala (A)	28	8.7	29	8.7	34	10.9	29	8.7
Arg (R)	17	5.3	25	7.5	15	4.8	25	7.5
Asn (N)	15	4.7	13	3.9	15	4.8	13	3.9
Asp (D)	18	5.6	19	5.7	21	6.8	19	5.7
Cys (C)	0	0.0	2	0.6	1	0.3	2	0.6
Gln (Q)	12	3.7	15	4.5	14	4.5	15	4.5
Glu (E)	12	3.7	21	6.3	14	4.5	21	6.3
Gly (G)	25	7.8	25	7.5	15	4.8	25	7.5
His (H)	17	5.3	9	2.7	11	3.5	9	2.7
Ile (I)	19	5.9	18	5.4	15	4.8	18	5.4
Leu (L)	35	10.9	39	11.7	38	12.2	39	11.7
Lys (K)	14	4.4	12	3.6	15	4.8	12	3.6
Met (M)	13	4.0	12	3.6	9	2.9	12	3.6
Phe (F)	10	3.1	11	3.3	12	3.9	11	3.3
Pro (P)	15	4.7	13	3.9	12	3.9	13	3.9
Ser (S)	20	6.2	20	6.0	20	6.4	20	6.0
Thr (T)	18	5.6	21	6.3	18	5.8	21	6.3
Trp (W)	0	0.0	0	0.0	2	0.6	0	0.0
Tyr (Y)	5	1.6	3	0.9	8	2.6	3	0.9
Val (V)	28	8.7	27	8.1	22	7.1	27	8.1
Pyl (O)	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Sec (U)	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0

**Table 4.** The total ionic amino-acids number and the pI values of *Rugamonas*, *P. aeruginosa*, *E. coli* and *A. aeolicus* ATCase.

ATCase	<i>Rugamonas sp.</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>A. aeolicus</i>
Asp+Glu (-)	30	40	35	43
Arg+Lys (+)	31	37	30	43
Arg + Lys + His (+)	48	46	41	49
pI	8.07	6.32	6.12	7.04

Regarding the ionic residues, the *Rugamonas* ATCase contains a much lower Glu (3.7%) compared to the enzyme from *P. aeruginosa* and *A. aeolicus*, and 47-53% higher His than the other analyzed enzymes. The low total number of ionic amino-acids (Table 4) from the *Rugamonas sp.* enzyme compared to that from the other three enzymes, particularly to that from the hyperthermophile bacteria, could be correlated with the low number of ionic bonds characteristic for all enzymes that function in low temperature. In accordance with the much higher number of cationic amino-acids compared to the anionic ones found in *Rugamonas* ATCase, especially the high value of His (Table 4), the isoelectric point value of the antarctic enzyme is basic (pI = 8.07), contrary to the mesophilic and hyperthermophilic enzymes. Thus, *Rugamonas sp.* PAMC27505 ATCase has a positive global charge.

#### Cloning of the psychrophilic ATCase gene

The concentration and purity of the gDNA based on the spectrophotometric determination was of 47,6-ng/ $\mu$ L and  $A_{260}/A_{280} = 1,87$  respectively. The cloning of *pyrB* gene from *Rugamonas* PAMC27505 strain inside pHAT2 bacterial expression vector took place in a few successive steps. In the first step, the optimum PCR amplification conditions for *pyrB* gene were established by gradient PCR, using DreamTaq DNA polymerase reaction mix at three different annealing temperatures (48°, 54° and 56°). After the gradient PCR amplification, the resulted amplicons were analyzed by 1% agarose electrophoresis gel and the obtained DNA fragment corresponds to the theoretical one of 966 bp for the *pyrB* gene from *Rugamonas sp.* (Fig. 2).

Based on the gradient PCR results, the optimum annealing temperature for the *pyrB* gene primer set of 56° was established. A second PCR amplification step at 56° annealing temperature was performed using Pfu DNA polymerase, chosen to avoid any amplification error that might occur. After purification of the obtained amplicon, as described in Materials and methods, *pyrB* amplicon was at a concentration of 10.4-ng/ $\mu$ L, in a 50- $\mu$ L final volume.

The linearization of the pHAT2 vector (4443 bp) was verified by 1% agarose electrophoresis gel. After purification, the insert had a concentration of 6.3-ng/ $\mu$ L and the vector had a 11.8-ng/ $\mu$ L concentration, in 50- $\mu$ L final volume. After the purification, the pHAT2 *NcoI/HindIII* vector was dephosphorylated to optimize the ligation step. For the ligation step, the molar ration 1:3 (V: I) was used. The pATCR clone was analyzed via enzymatic digestion using *HindIII* restriction enzyme to verify the ligation efficacy and the newly-obtained pATCR plasmids dimension (5409 bp) (Fig. 3). To verify for the possible PCR amplification errors, the pATCR construct was sequenced using *pyrBF* primer, by Sanger method (Macrogen, Amsterdam), which confirmed the absence of mutations inside the nucleotide sequence of *pyrB* gene that codifies for *Rugamonas sp.* PAMC27505 ATCase.

The *pyrB* gene from pATCR clone was expressed in *E. coli* BL21(DE3) strain as described in Methods. After the transformation of the colonies and the induction step, the cellular extracts

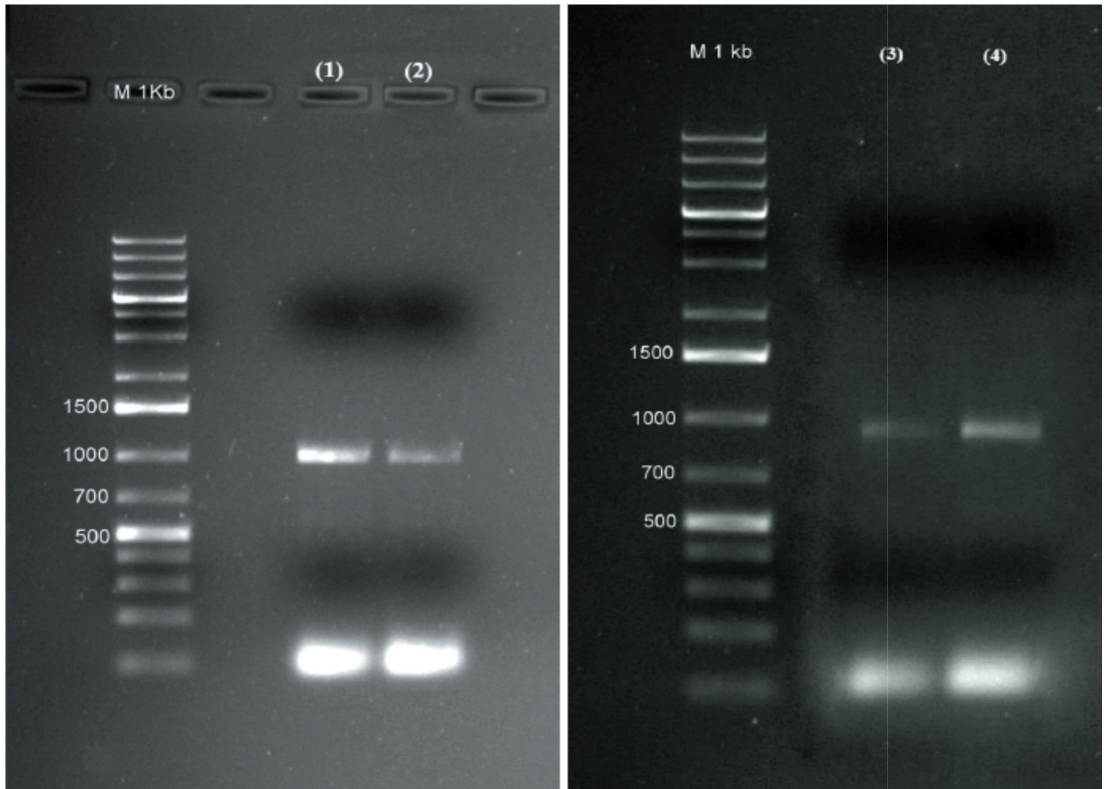


Fig. 2: Gradient PCR at (1,3) 54°, (2) 48° and (4) 56° annealing temperatures for pyrB gene, viewed in 1% agarose electrophoresis gel, 100V, 45 mins, 1 Kb molecular marker.

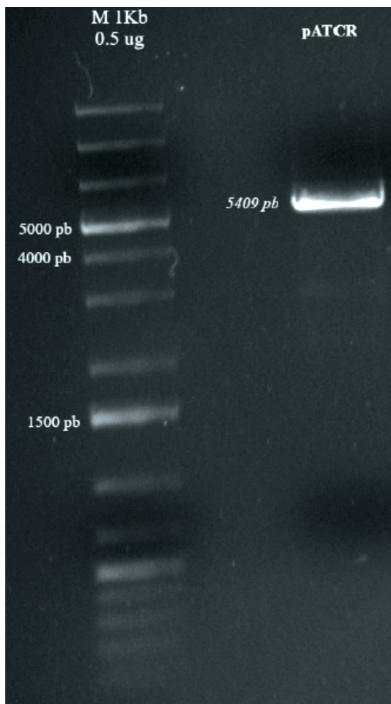


Fig. 3: pATCR construct after linearisation using HindIII restriction enzyme, viewed after migration in 1% agarose electrophoresis gel. The plasmid dimension of > 5000 bp is shown with the help of 1 Kb molecular marker.

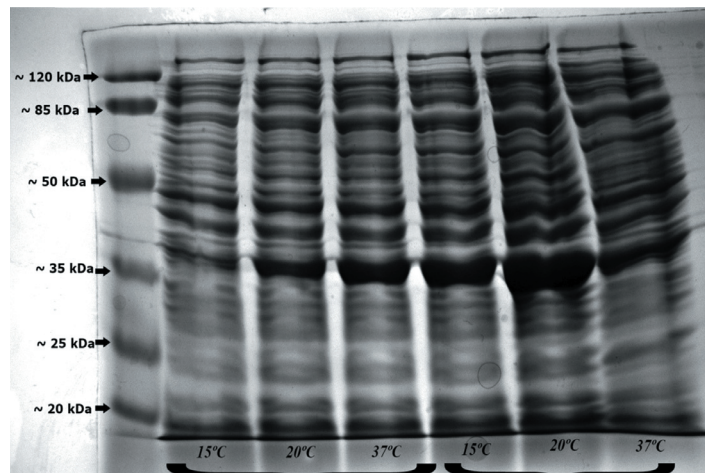


Fig. 4: Soluble fraction of recombinant Rugamonas sp. ATC. SDS-PAGE electrophoresis gel, Coomassie Brilliant Blue staining, 10% acetic acid destaining solution.

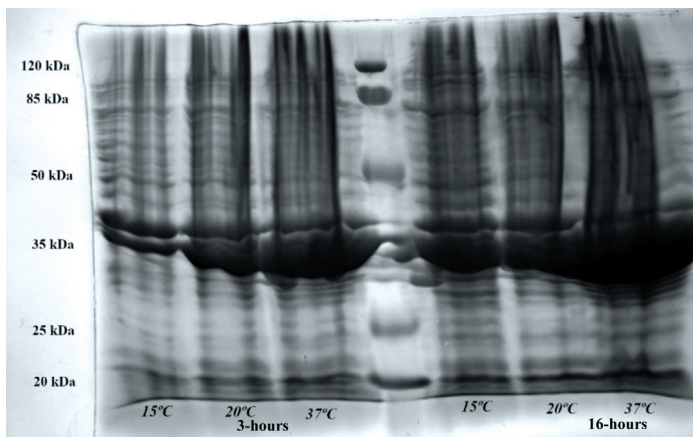


Fig. 5: Insoluble fraction of recombinant *Rugamonas sp.* ATC. SDS-PAGE electrophoresis gel, Coomassie Brilliant Blue staining, 10% acetic acid destaining solution.

were analyzed using SDS-PAGE electrophoresis, which showed the presence of soluble recombinant protein obtained based on the tested induction conditions, at 35-kDa molecular mass (Fig. 4). From the electrophoretic profile of the pATCR soluble fraction the optimum genetic expression conditions were revealed, respectively of induction at 15° and 20° for 16 hours. The insoluble fraction content was obtained based on the induction step temperature (Fig. 5).

## CONCLUSIONS

The primary structure homology analysis showed the amino-acids that form the catalytic active site of native *E. coli* ATCase (Ser<sup>53</sup>, Thr<sup>54</sup>, Arg<sup>55</sup>, Thr<sup>56</sup>, Ser<sup>81</sup>, Lys<sup>85</sup>, Arg<sup>106</sup>, His<sup>135</sup>, Arg<sup>168</sup>, Arg<sup>230</sup>, Gln<sup>232</sup>) being completely conserved in ATCase from the psychrophilic bacterial strain *Rugamonas sp.* PAMC27505. The conservation of the catalytic site in different types of microorganisms, independent of the optimum growth temperature (psychrophile *Rugamonas sp.* PAMC27505, mesophilic *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, and hypermetrophilic *Aquifex aeolicus*) suggest the ubiquity of this key enzyme part of the pyrimidine nucleotides *de novo* synthesis metabolic pathway. The primary structure analysis indicated a high amino-acid conservation degree between *Rugamonas sp.* ATCase protein sequence and the one from *Pseudomonas aeruginosa*, which is a direct result of *Rugamonas sp.* belonging to Pseudomonadaceae family.

For psychrophilic microorganisms to survive, their enzymes need to be more flexible than other similar enzymes, and in the case of the psychrophilic ATCase cysteine was absent while proline was in a higher percentage, which confers the studied enzyme higher flexibility, favorizing in return the catalyzation at low temperatures. *Rugamonas sp.* PAMC27505 ATCase showed a positive global charge based on the isoelectric point value (pI = 8.07), in accordance with the higher content of cationic amino-acids opposed than anionic ones, representing a characteristic of the low-temperature adapted proteins.

The *pyrB* gene was successfully cloned in the pHAT2 bacterial expression vector and the recombinant protein was expressed in *E. coli* BL21(DE3) competent cells. More so, the optimum expression conditions for obtained the soluble protein were as follows: 15° and 20° for 16 hours, with 0.5-mM IPTG induction.



## AKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank KOPRI Institute for the *Rugamonas* sp. PAMC27505 cells, nucleotide sequence and protein amino-acid sequence.

## REFERENCES

- ▶ Austin DA, Moss MO (1986) Numerical taxonomy of red-pigmented bacteria isolated from a lowland river, with the description of a new taxon, *Rugamonas rubra* gen. nov., sp. nov. *J. Gen. Microbiol.* 132:1899-1909.
- ▶ Austin DA, Moss MO (1987). Validation of the publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB. List No. 23. *Int. J. Syst. Bacteriol.*37:179–180; in Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol 2 The Proteobacteria, Part B The Gammaproteobacteria, Editia II. - Garrity G.M., Bell J.A., Lilburn T. (eds.). Genus VII. Rugamonas. 407-408.
- ▶ Cunin R et al. (1985) Structure-function relationship in allosteric aspartate carbamoyl-transferase from *Escherichia coli*. I. Primary structure of a *pyrI* gene encoding a modified regulatory subunit. *J Mol Biol.* 186:707-13.
- ▶ Edwards U et al. (1989) Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids. Res.* 17:7843-7853.
- ▶ Felske A et al. (1998) Phylogeny of the main bacterial 16S rRNA sequences in Drentse A grassland soils (The Netherlands). *Appl. Environ. Microbiol.* 64:871-879.
- ▶ Gasteiger E et al. (2005) Protein identification and analysis tools on the ExPASy Server; in John M. Walker (ed): The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press. 571-607.
- ▶ Helmke E, Weyland H (2004) Psychrophilic versus psychrotolerant bacteria—occurrence and significance in polar and temperate marine habitats. *Cell Mol Biol.* 50:553 – 561.
- ▶ Horikoshi K et al. (2011) Extremophiles Handbook. Springer: Tokio, Japan, p. 1247. ISBN 978-4-431-53897-4. doi:10.1007/978-4-431-53898-1.
- ▶ Horikoshi K. and Bull A.T. (2011). Prologue: Definition, categories, distribution, origin and evolution, pioneering studies, and emerging fields of extremophiles; in Extremophiles Handbook – Horikoshi K., Antranikaian G., Bull A.T., Rob F.T., Stetter K.O.(Eds). Springer-Tokio, Japan. p. 4-14.
- ▶ Jones ME, Spector L, Lipmann F (1955) Carbamoyl-phosphate, the carbamoyl donor in enzymatic citrulline synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 77:819 - 820.
- ▶ Ladjimi MM et al. (1985) Structure-function relationship in allosteric aspartate carbamoyl-transferase from *Escherichia coli*. II. Involvement of the C-terminal region of the regulatory chain in homotropic and heterotropic interactions. *J Mol Biol.* 186:715 - 24.
- ▶ Lipscomb WN, Stevens RC (1990) Allosteric control of quaternary states in *E. coli* aspartate transcarbamoylase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*171(3):1312-318.
- ▶ Lipscomb NW, Kantrowitz RE (2012) Structure and mechanisms of *Escherichia coli* Aspartate Transcarbamoylase. *Acc Chem Res.* 45(3):444-453. doi:10.1021/ar200166p.
- ▶ Morita RY (1975) Psychrophilic bacteria. *Bacteriol Rev.* 39:144 – 167.
- ▶ Mueller DR et al. (2005) Extremotrophs, extremophiles and broadband pigmentation strategies in a high arctic ice shelf ecosystem. *FEMS Microbiol Ecol.* 53:73-87.
- ▶ Nogi Y (2011) Taxonomy of psychrophiles; in Extremophiles handbook. – Horikoshi K., Antranikaian G., Bull A.T., Rob F.T., Stetter K.O. (Eds). Springer: Tokio, Japan, p. 778 - 787.
- ▶ Perbal B, Hervé G (1972) Biosynthesis of *Escherichia coli* aspartate transcarbamoylase. I. Parameters of gene expression and sequential biosynthesis of the subunits. *J Mol Biol.* 70:511-529.
- ▶ Purcarea C et al. (2003) *Aquifex aeolicus* Aspartate Transcarbamoylase, an enzyme specialized for the efficient utilization of unstable Carbamoyl Phosphate at elevated temperature. *J Biol Chem.* 278(52):52924-52934.

- ▶ Roof DW, Foltermann FK, Wild RJ (1982) The Organization and Regulation of the *pyrBI* Operon in *E. coli* includes a Rho-Independent Attenuator Sequence. *Mol Gen Genet.* 187:391–400.
- ▶ Schurr MJ et al. (1995) Aspartate transcarbamoylase genes of *Pseudomonas putida*: requirement for an inactive dihydroorotase for assembly into the dodecameric holoenzyme. *J. Bacteriol.* 177:1751-1759.
- ▶ Seckbach J, Oren A, Stan-Lotter H (2013) Polyextremophiles: Life under multiple forms of Stress. Springer: Dordrecht, The Netherlands, p. 634. ISBN 978-94-007-6488-0.
- ▶ Stan-Latter H (2012) Physicochemical boundaries of life; in Adaptation of Microbial Life to Environmental Extremes. Stan-Latter H., Fendrihan S. (Eds). Springer-Verlag: New York, NY, USA, p. 1 - 14.
- ▶ Sun K et al. (1998) Properties of aspartate transcarbamoylase from TAD1, a psychrophilic bacterial strain isolated from Antarctica. *FEMS Microbiol Lett.* 164:375-382.
- ▶ Thiry L, Hervé G (1978) The stimulation of *Escherichia coli* aspartate transcarbamoylase activity by adenosine triphosphate. Relations with the other regulatory conformational changes: a model. *J. Mol. Biol.* 125:515-534.
- ▶ Vermelho AB, Dalmaso ZLG, Ferreira D (2015) Review: Marine Extremophiles: A source of hydrolases for biotechnological applications. *Mar. Drugs* 13:1925-1965. doi:10.3390/md13041925.
- ▶ Vickrey JF, Hervé G, Evans DR (2002) *Pseudomonas aeruginosa* Aspartate Transcarbamoylase. *J Biol Chem.* 277(27):24490–24498. doi:10.1074/jbc.m200009200
- ▶ Wiley DC, Lipscomb WN (1968) Crystallographic determination of symmetry of Aspartate Transcarbamoylase. *Nature.* 218:1119-1121.
- ▶ Zarnea G, Popescu OV (2011) Dictionar de Microbiologie generala si Biologie moleculara. Editura Academiei Române, Bucuresti. ISBN 978-973-27-2135-3.



# MONITORING OF THE CALLIMORPHA (EUPLAGIA) QUADRIPUNCTARIA (PODA, 1761) (INSECTA: LEPIDOPTERA) IN THE MĂCIN MOUNTAINS NATIONAL PARK (ROMANIA)



Minodora Manu<sup>1\*</sup>, Nicolae Lotrean<sup>2</sup>, Marilena Onete<sup>1</sup>, Roxana Nicoară<sup>1</sup>, Florian Bodescu<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Romanian Academy, Institute of Biology Bucharest, Department of Ecology, Taxonomy and Nature Conservation, Splaiul Independenței Street, no. 296, Bucharest, Romania; e-mail: minodoramanu@gmail.com; marilena.onete@gmail.com; roxana.ion@ibiol.ro

<sup>2</sup>Argeș County Museum, Armand Călinescu Street, no. 44, 110047, Pitești, Argeș, Romania, e-mail: lotrean\_n@yahoo.com

<sup>3</sup>Multidimension S.R.L., Intr. Tg. Frumos Street, no. 3-5, Bucharest, Romania, e-mail: florianbodescu@gmail

## INTRODUCTION

In 2007, Romania joined to the European Community. In the field of the nature protection, national legislation had to correlate with a European one (especially with Council Directive 92/43/EEC on 21 May 1992 on the conservation of natural habitats and of wild fauna and flora). In order to accomplish this task, the Romanian Government, approved the emergency ordinance no. 57 from 20 June 2007, regarding the protected sites status, conservation of natural habitats, flora and wild fauna, with one completion (law no. 49 from 7 April 2011) and ministry order no.1.964/2007, concerning the establishment of community importance protected sites as part of the European ecological network Natura 2000 in Romania. In these national and European legislation, species *Callimorpha (Euplagia) quadripunctaria* (Poda, 1761) is listed in annex II, as „animal species of community interest whose conservation requires the designation of special areas of conservation”. In the same time, this species is listed also in annex I of resolution 6 (1998) of the Bern Convention listing the species requiring specific habitat conservation measures (year of revision 2011).

*Callimorpha quadripunctaria* hibernates as a caterpillar and the adult appears in June and flies till September. The caterpillars are polyphagous, but prefer Boraginaceae such as *Echium* or *Lithospermum*. It is thermophilous species, being identified in wet meadows or pastures, with bushes; in edge forests or clearings, in riparian areas with abundance vegetation. It flies during the day, on the *Eupatorium cannabinum* bushes or *Mentha sp.* (Iorgu et al., 2015).

According to the EUNIS, its distribution on our continent is wide, being recorded in: England, France, Spain, Belgium, Germany, Italy, Luxemburg, Netherland, Slovakia, Poland, Portugal, Greece, Central and East Europe. In Romania, according to many inventory studies, *Callimorpha quadripunctaria* was identified in all biogeographical regions, till 1000 meters altitude (Szekely, 2010; Iorgu et al., 2015).

On national level, according to Iorgu et al., 2015, the conservation status of this species was evaluated as favourable in alpine, steppic and continental bioregions, but unfavorable in pan-nonic ones. In this context, we consider that the monitoring of *Callimorpha quadripunctaria* will bring new and precious information about the conservation status of this butterfly, especially in a protected area as Măcin Mountains National Park (ROSCI0123).

The main objectives of this study were:

- the analysis of the *Callimorpha quadripunctaria* populations structure and dynamics;
- the analysis of environmental factors (air and soil temperature, air humidity, slope, exposure, cloud cover, tree canopy, wind speed, wind direction),
- inventory and quantification of the intensity of threats and future pressures;
- establishment of specific conservation measures.

## MATERIALS AND METHODS

### Study area

The Măcin Mountains National Park (MMNP) is located in the in the South-East of Romania, in Dobrogea region (45°8'49" N and 28°19'51"E) (Fig. 1). It has an area of 11151.82 hectares. More details regarding the study area were already published, in 2016, by Manu et al. According to the management plan for the MMNP, the following twelve Natura 2000 habitats were described: Eastern white oak forests (91AA); Euro-Siberian steppe woods with *Quercus* spp. (91I0\*); Pannonian-Balkan Turkey oak – sessile oak forests (91M0); Dacian oak and hornbeam forests (91Y0); Dobrogean beech forests (91X0); Ponto-Sarmatian deciduous thickets (40C0\*); Ponto-sarmatic steppes (62C0\*); Pannonic salt steppes and salt marshes (1530); Siliceous rock with pioneer vegetation of the *Sedo-Scleranthion* or *Sedo albi-Veronicion dillenii* (8230); Caves not open to the public (8310); Moesian silver lime woods (91Z0) and Siliceous rocky slopes with chasmophytic vegetation (3220) (Gafta & Mountford, 2008).



Fig. 1. Geographical position of Măcin Mountains, Dobrogea region- Romania

### Climatic data

In monitoring study we analyzed the following abiotic factors: exposition (Ex.), air temperature (A.t.), soil temperature (S.t.), air relative humidity (A.h.), cloud-cover (Nb.), wind speed (W.s.) and wind direction (W.d.) (Table 1). Air temperature and relative humidity were measured with a wireless thermo-hygrometer HTS55 Irox. Soil temperature was recorded with a Step System thermometer (Fig. 2). Wind speed was quantified using the Beaufort wind scale

(the numbers 0 to 12 indicating the strength of the wind from force 0 (calm) to force 12 (hurricane)) (Huler, 2004). The percentage of sky covered by clouds was also taken into consideration (Wikstrom *et al.*, 2009). Climate data were recorded each time, at the starting point of each monitored transect. The same instruments were used in both study years: 2014 and 2015.



Soil thermometer (A)

Wireless thermo-hygrometer (B)

Fig. 2. Soil thermometer (A) and air thermo-hygrometer (B) used in MMNP

### Monitoring method

Monitoring of the *Callimorpha quadripunctaria* was accomplished using the transect method (van Sway *et al.*, 2012; Iorgu *et al.*, 2015). These were chosen in order to keep the habitat requirements of this species (Fig. 3).



*Callimorpha quadripunctaria* on a beech bark

*Callimorpha quadripunctaria* on *Eupatorium cannabinum*

Fig 3. *Callimorpha quadripunctaria* identified in MMNP

The wet habitats near to the water courses were chosen. These were found near or in the deciduous forests with *Quercus sp.*, *Fagus sp.*, where the following host plants were identified: *Eupatorium cannabinum*, *Plantago sp.*, *Trifolium sp.*, *Urtica sp.*, *Mentha sp.*, *Sambucus ebulus* (Fig. 4). Ten transects were investigated. The length of one transect was by 1000 m and the width by 50 meters (Table 1). Transect were covered during the day, between 9.00 a.m. and 10.00 p.m. The *Callimorpha quadripunctaria* was photographed in the field, without any disturbance. The same transects were investigated in both year (2014 and 2015), in order to detect the intensity of the disturbing factors that occurred from one year to the next and also the differences in the population structure of *Callimorpha quadripunctaria* (Fig. 5). In order to analyze the population parameters, numerical abundance (number of individuals/transect) was determined.



*Mentha sp., Sambucus ebulus, Eupatorium cannabinum*

*Eupatorium cannabinum*

Fig. 4. Characteristic habitats for species *Callimorpha quadripunctaria*.

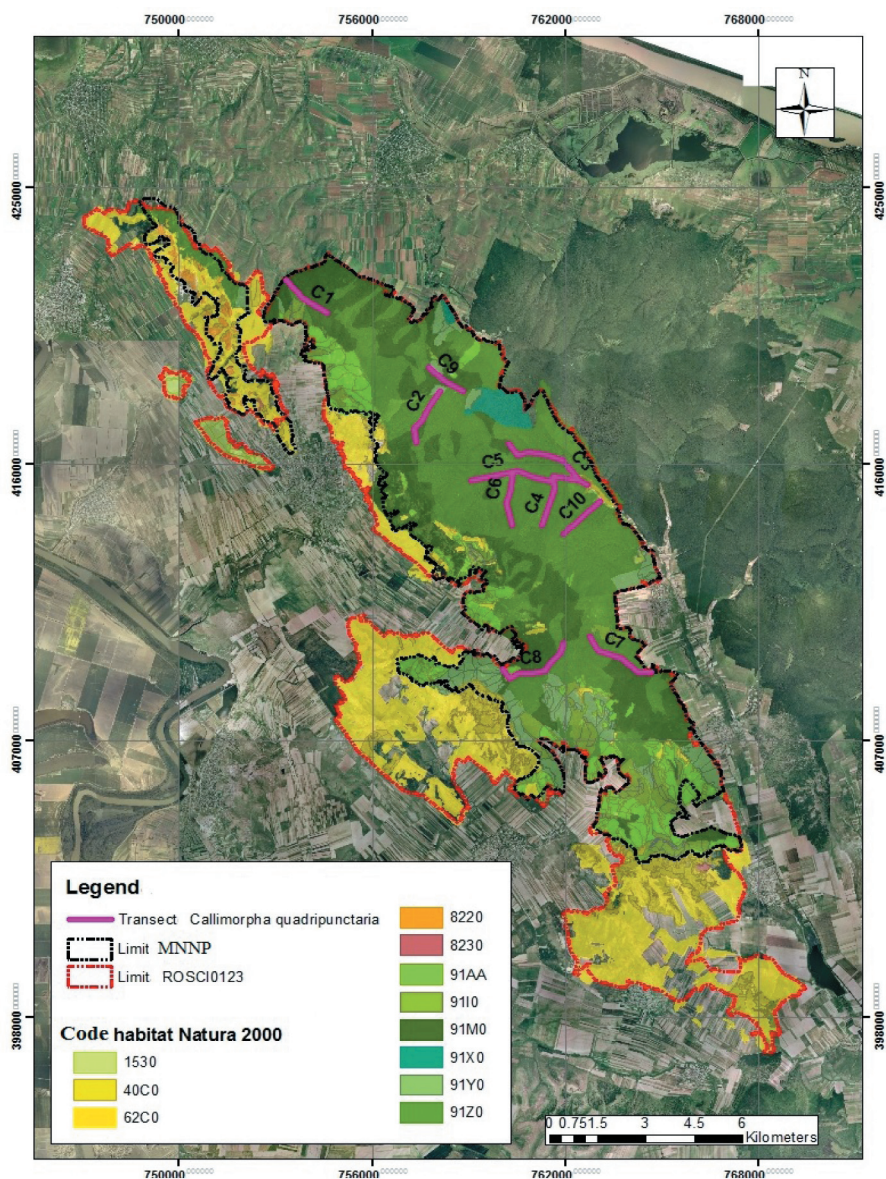





















Fig. 5. The investigated monitoring transects for *Callimorpha quadripunctaria*, 2014-2015.

Table 1: Description of monitoring transects for *Callimorpha quadripunctaria* in MMNP-2014 and 2015

No. transect	GIS coordinates	Habitat	Toponym	Photo 2014	Photo 2015
1	N: 45.21694 E: 028.27986 Alt: 176 m	Deciduous forest edge+ riparian area	Valea Seacă		
2	N: 45.18866 E: 028.34147 Alt: 139 m	Deciduous forest edge	Valea Nifonului- „La brazi”		
3	N: 45.19017 E: 028.33710 Alt: 129	Deciduous forest edge+ riparian area	Nifon- Dealul cu Drum		
4	N: 45.17744 E: 028.32372 Alt: 216 m	Deciduous forest edge+ riparian area	Nifon- Dealul cu Drum		
5	N: 45.19297 E: 028.31304 Alt: 165 m	Deciduous forest edge+ riparian area	Nifon- Dealul cu Drum		
6	N: 45.13290 E: 028.36390 Alt: 137 m	Deciduous forest edge	Nifon-village		

No. transect	GIS coordinates	Habitat	Toponym	Photo 2014	Photo 2015
7	N: 45.13665 E: 028.30652 Alt: 152 m	Deciduous forest edge	Nifon-village		
8	N: 45.13376 E: 028.35622 Alt: 157 m	Deciduous forest edge	Greci		
9	N: 45.21938 E: 028.29016 Alt: 163 m	Deciduous forest edge + forest clearing	Valea Seacă		
10	N: 45.18453 E: 028.34692 Alt: 122 m	Deciduous forest edge + riparian area	Nifon		




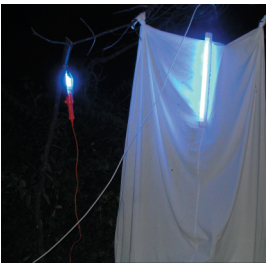



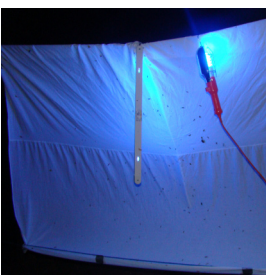
Legend: Alt. = Altitude

The entomological net was used for the capturing of the *Callimorpha quadripunctaria* species. The inventory and monitoring of this butterfly was made in the night as well, using light traps, located in 4 points. These points were chosen taking into account of the feeding areas (habitats with *Eupatorium cannabinum*, *Plantago* sp., *Trifolium* sp., *Urtica* sp., *Mentha* sp., *Sambucus ebulus* ). The same points were researched in 2014 and 2015 (Table 2).

The used materials were: maps, entomologic net, photo camera, GPS, soil thermometer, air thermo-hygrometer, field notebook, pen, binocular magnifier, batteries, roulette, luminous screen, electric generator, neon, light bulb.



Table 2: The night observation points/traps for *Callimorpha quadripunctaria*, in MMNP- 2014 and 2015

No. trap	GIS coordinates	Habitat	Toponym	Photo 2014	Photo 2015
1	N: 45.19017 E: 028.33710 Alt: 129	Deciduous forest edge + riparian area	Valea Nifonului- „La brazi”		
2	N: 45.18866 E: 028.34147 Alt: 139 m	Deciduous forest edge + riparian area	Valea Nifonului- „La brazi”		
3	N: 45.17704 E: 028.26711 Alt: 78 m	Deciduous forest edge + meadow	Greci		
4	N: 45.18146 E: 028.26163 Alt: 81 m	Deciduous forest edge + meadow	Greci- Dealul cu Drum		

Legend: Alt. = Altitude

Monitoring transects and night traps were located in Stereo '70 projection system using GPS Garmin 76CSx. Each time when we have one in the field, the monitoring started from the same GPS point (Fig. 6).

### Population parameters

The following population parameters was described for *Callimorpha quadripunctaria*: relative abun-

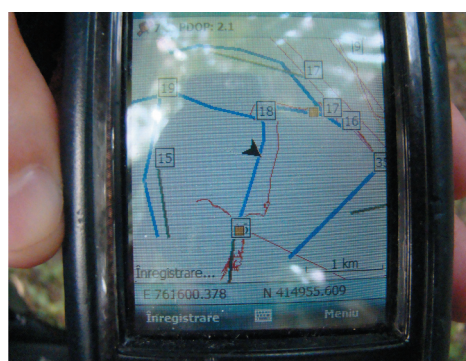


Fig. 6. GPS used for monitoring of *Callimorpha quadripunctaria*.

dance (A%), frequency (F%), constancy (C%), dominance (D%), variation coefficient (CV%), numerical density (no. of ind./sq.m.), similarity (index Jaccard – q).

The relative abundance (A%) was calculated using the formula:  $A_r = n / N * 100$ , where n – number of a taxon from one transect; N- total number of individuals of all taxa from one transect. The obtained values, which are expressed in percentage, highlight the proportion in which each species participates in the structure of the studied biocenosis. The relative abundance of a species is not always directly correlated with its importance in the functioning of biocenosis, meaning that the most abundant species are not always the most important and vice versa (Botnariuc & Vădineanu, 1982).

Frequency (F) of a *Callimorpha quadripunctaria* was calculated using the formula:

$F = p / P * 100$ , in which: p = number of transects where this species was found; P = total number of transects.

Taking into account of the frequency values, species could be grouped in 10 frequency classes: 1 (1-10%); 2 (11-20%); 3 (21-30%); 4 (31-40%); 5 (41-50%); 6 (51-60%); 7 (61-70%); 8 (71-80%); 9 (81-90%); 10 (91-100%).

The dominance index (%) was calculated using the formula:  $D = 100\% * n/N$ , where: n = number of individuals of one species in all transects; N = total number of individuals of all species in all transects. Dominance classes for the identified species were: eudominants with  $D > 10.0\%$  (D5); dominants with D of 5.1.10.0% (D4); subdominants with D of 2.1.5.0% (D3); recedents with D of 1.1.2.0% (D2), and subrecedents with  $D < 1.1\%$  (D1) (Engelmann 1978).

The constancy index (%) was obtained using the formula:  $C = 100\% * pA/P$ , where: pA = number of transects with species A; P = total number of transects. The species were classified in 4 constancy classes: euconstant species with C of 75.1.100% (C4); constant species with C of 50.1.75% (C3); accessory species with C of 25.1.50% (C2); and accidental species with C of 1.25% (C1) (Selvin & Vacca 2004).

Variation coefficient (CV %) shows the temporal variation of the numerical abundances of the investigated species, during the study period. Its calculation was made using the following formula:  $CV = 100 * s / x$ ; in which s – standard deviation; x- arithmetic average of the taxon abundance from all 10 transects. The  $Cv < 10\%$  shows a homogeneous population;  $Cv > 30\%$  shows a heterogeneous population;  $Cv = 10-20\%$ , shows a relative homogeneous population and a  $Cv = 20-30\%$ , shows a relative heterogeneous population.

Density (per 1 ha) was calculated using the formula (no. of individuals/no. of transects) \* 1 ha/surface area of one transect (Botnariuc & Vădineanu 1982). The surface area of the soil core was 1000 X 50 meters.

The results were analyzed with the aid of Past 3.18 software, to calculate the Jaccard index J for mite communities from the 10 studied transects (Hammer, 2001).

$$J = c / (a + b - c),$$

where: a = number of species in transect A; b = number of species in transect B; c = number of species common to transect A and B.

In order to calculate all these parameters, other butterflies species were identified, as “accompanying species” within each transect (Tables 5,6,7).

## RESULTS AND DISCUSSIONS

Species *Callimorpha quadripunctaria* was identified in 2014 and 2015, in transects located in the following Natura 2000 habitats: Pannonian-Balkan Turkey oak – sessile oak forests (91M0); Dacian oak and hornbeam forests (91Y0); Euro-Siberian steppic woods with *Quercus* spp. (91I0\*); Eastern white oak forests (91AA); Dobrogean beech forests (91X0) and Ponto-Sarmatian deciduous thickets (40C0\*) (Tables 3, 4). It was located and monitored in the deciduous forest edge+riparian area; only deciduous forest edge; deciduous forest edge+forest clearing and forest edge+meadows.

If we make a comparison between numerical abundances obtained in the two years of study, we observed that in 2014, *Callimorpha quadripunctaria* preferred forest edge+riparian area and forest edge+forest clearing habitats. In 2015, its distribution was uniform in all four types of habitats (Fig. 8).

Taking into account of the tree canopy, we observed that the *Callimorpha quadripunctaria* preferred open, sunny habitats, but with high air humidity, located close to the water source (Tables 3, 4).

Analyzing the population parameters in period 2014-2015, we observed that we counted 8 individuals during the day transects and 2 individuals on night traps. If we report the numerical density for 10 ha, in all period of study was obtained 1.6 ind./10 ha and a relative abundance by 2.68%. If we take into consideration the frequency of *Callimorpha quadripunctaria* for the period 2014-2015, we discovered that it belongs to the class 5 (50%), being an accessory species ( $C = 50\%$ ), but also subdominant ( $D = 2,68\%$ ). The variation coefficient shows that its population is heterogeneous ( $Cv > 30\%$ ) (Table 5).

The population size in period 2014-2015 was estimated, taking into account of the area of favorable habitats (using habitats distribution map and forest management plans). These habitats were estimated on a total area by 5974 ha. Considering that on each 10 ha we identified 1.6 individuals of *Callimorpha quadripunctaria*, if we extrapolate this result on the total area of the favorable habitat, the population size was by 956 individuals.

All identified individuals of *Callimorpha quadripunctaria* were adults (Fig. 7, 9).

If we make a comparison between population parameters recorded in both years of study, we observed that in 2014 the numerical abundance was by 6 individuals, the relative abundance was by 8.2%, numerical density by 1 individual/10 ha and an ecological density (reported on the favorable habitat) by 4 individuals/10 ha. In 2015, these parameters recorded more decreased values, as following: the numerical abundance was by 4 individuals, the relative abundance was by 1.21%, numerical density by 0.6 individual/10 ha and an ecological density (reported on the favorable habitat) by 2.4 individuals/10 ha (Tables 6, 7). These differences may be due, first of all, to the climatic changes, as: the more increased air (maximum value by 33,6°C) and soil (maximum value by 29,4°C) temperatures from 2015; and more decreased air humidity (till 50%) (Tables 6, 7).

If we analyze the *Callimorpha quadripunctaria* species affiliation to a frequency class, we observed that in both years, it was included in class 3 ( $F = 30\%$ ). Even, if in 2014 the numerical abundance was higher, due to the fact that the species was identified in the same number

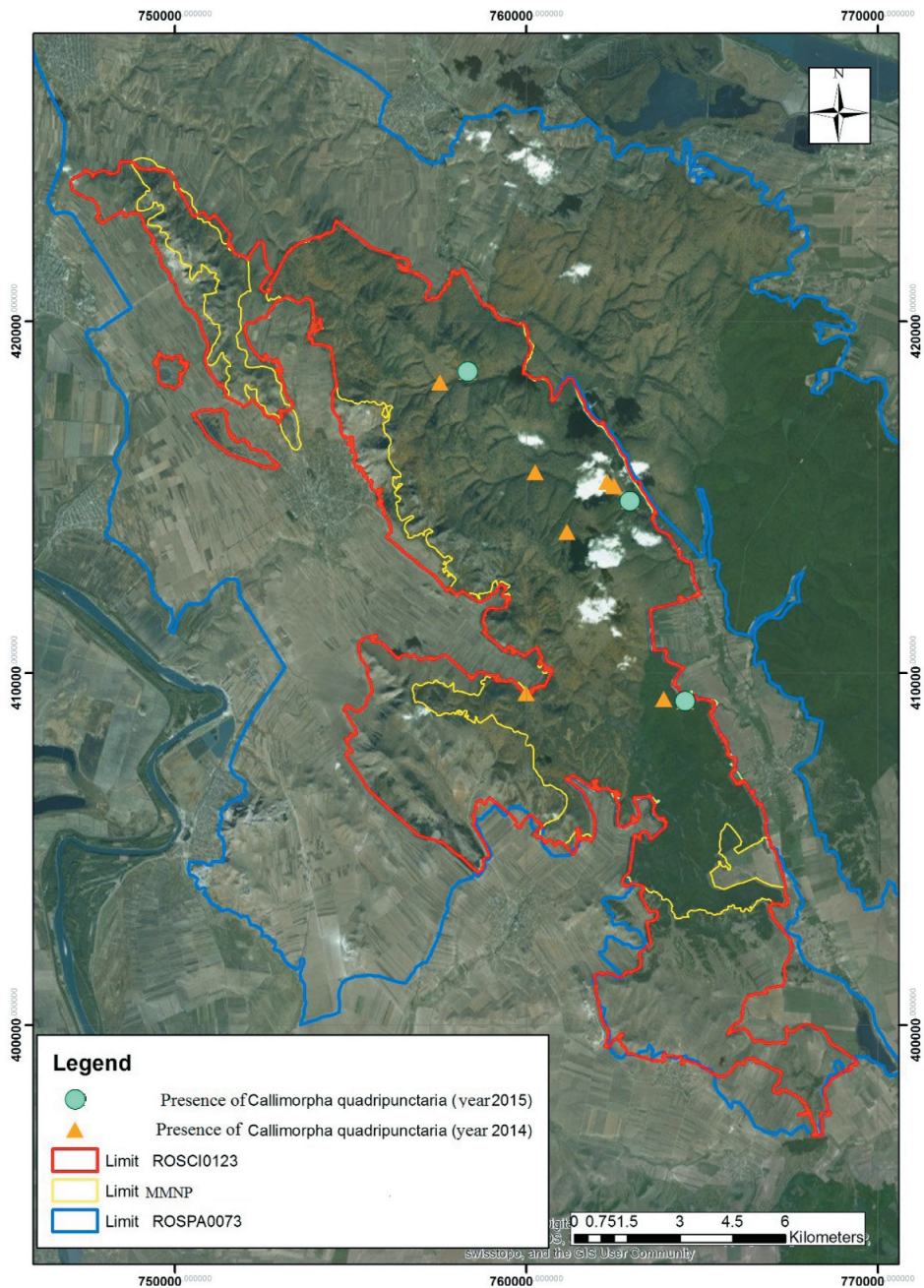


Fig. 7. Distribution of the *Callimorpha quadripunctaria*, in period 2014-2015

of transects in both years, the comparative analysis of the frequencies had similar results. So in 2014, as well as in 2015, *Callimorpha quadripunctaria* was declared accessory species ( $C = 30\%$ ). If we take into discussion the dominance, in 2014 the butterfly was classified as dominant species and in 2015 as subdominant. This modification is due to the more increased number of accompanying species from 2015 (18 species, with a numerical abundance of 237 individuals), in comparison with 2014 (16 species and 61 individuals) (Tables 6, 7).

Analyzing the monthly dynamics of the number of individuals, identified from the day transects, we observed that in July and August were favorable months for females of *Callimor-*

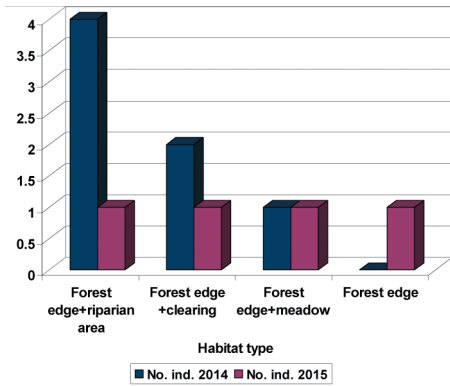


Fig. 8. Distribution of the numerical abundances, taking into account the type of habitat, 2014-2015

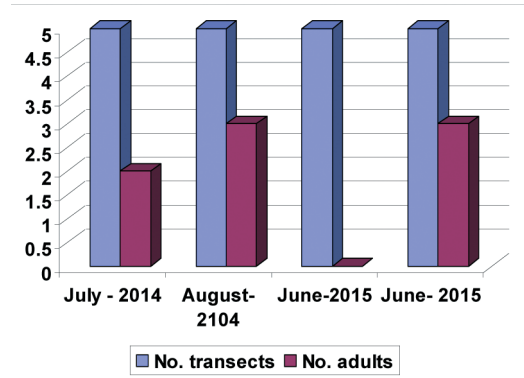


Fig. 9. Distribution of the numerical abundances 2014-2015

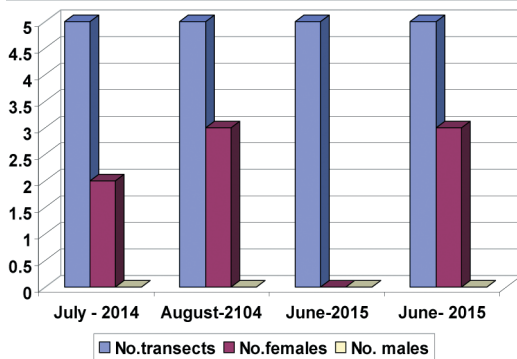


Fig. 10. Monthly dynamics of the numerical abundances of individuals, taking into account the sex, 2014-2015

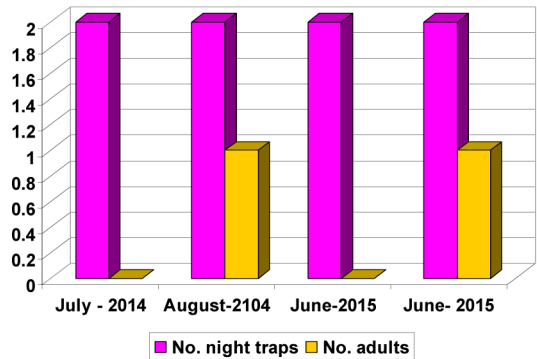


Fig. 11. Monthly dynamics of the numerical abundances of individuals from night traps, 2014-2015

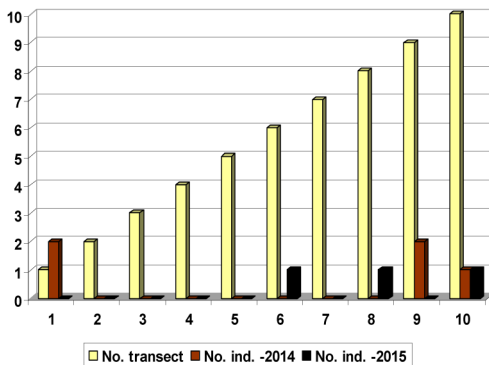


Fig. 12. Distribution of the numerical abundances from investigated transects, 2014-2015

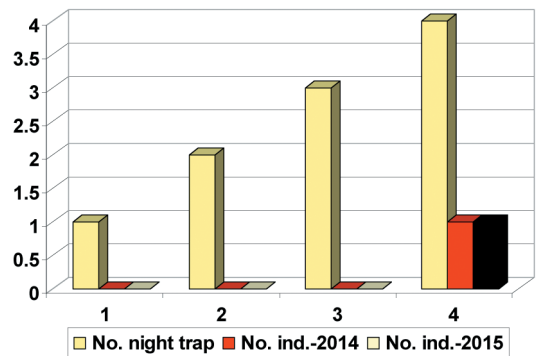


Fig. 13. Distribution of the numerical abundances from night traps, 2014-2015

*pha quadripunctaria*. On the opposite was June, when any mature individuals was identified (Fig. 9, 10). Monitoring with night traps, determined identification of a single female in August 2014 and of another one, in July 2015 (Fig. 11). In the first year of study in July, the air and soil temperatures was more decreased, in comparison with the same month from 2015 ( $19^{\circ}\text{C}$  and respectively  $15^{\circ}\text{C}$ , in the first year; and more than  $30^{\circ}\text{C}$  and  $29^{\circ}\text{C}$ , in 2015) (Tables 8, 9).

Comparing the numerical abundances obtained in each year, for all ten transects, we noticed that in the last transect the values were similar. In the first and nine transects, in the second year, no more specimen has been identified. We mentioned that in transect no. 10, the

anthropic impact was significant: the host plants (*Eupatorium cannabinum*, *Mentha sp.*, *Sambucus ebulus*) for species *Callimorpha quadripunctaria* has been mown just in the monitoring period (Fig. 12, Tables 3, 6, 7).

Comparing the Jaccard similarity index (presence/absence of the species), we observed that in 2014, the highest values were obtained between butterfly populations from transects 9-10 and 6-7-8 ( $q = 0.9$  respectively  $q= 0.6$ ). In the next year the situation was changed. In 2015, the highest value of this index was recorded between populations from transects 3-9 and 1-4 ( $q = 0.62$  respectively  $q=0.51$ ) (Fig. 14 A, B). If in the first year of study the air humidity recorded similar values in transects 9 and 10 (70%, 77%), on populations from transects 6, 7 and 8, this similarity was due not only from closed values of this parameter (62%-68%), but in the same time to the cloud cover (30%-35%), to the coverage (60%-70%) and to the same type of habitat (forest edge) (Table 8). In 2015, the similar environment conditions (especially the air humidity) and the transect analysis from the same type of habitat (forest edge+riparian area) determined the grouping of the butterfly populations (Table 9).

If we analyze the numerical abundances obtained on night traps, which were located in the same type of habitat and on the closed geographical coordinates, in 2014 and 2015, we observed that the results were similar (Fig. 13).

Analyzing the variation coefficient (temporal variation of the numerical abundance of each taxon, identified in all period of study), we demonstrated that the species *Callimorpha quadripunctaria* had heterogeneous populations, in both years: 2014 and 2015. If in 2014, the calculation of the dispersion index Morisita, showed that the population of *Callimorpha quadripunctaria* had a grouped distribution,  $IM = 1.8$  (possible corelated with the type of habitat, environment factors and trophic sources). In 2015 this index recorded more decreased value ( $IM < 1$ ), changing the type of distribution in uniform,  $IM < 1$  (species being identified in three types of habitats, near water sources, often temporally and with high air humidity  $>50\%$ ). Modification of the dispersion type was due to the significant influence of the environment factors. *Callimorpha quadripunctaria*, being a mobile species, can get to the trophic sources, but its dispersion could change due to the high values of the air temperatures and to the low values of the air humidity, recorded in 2015.

Table 4: Anthropic impact on some monitoring transects of *Callimorpha quadripunctaria*, 2015.

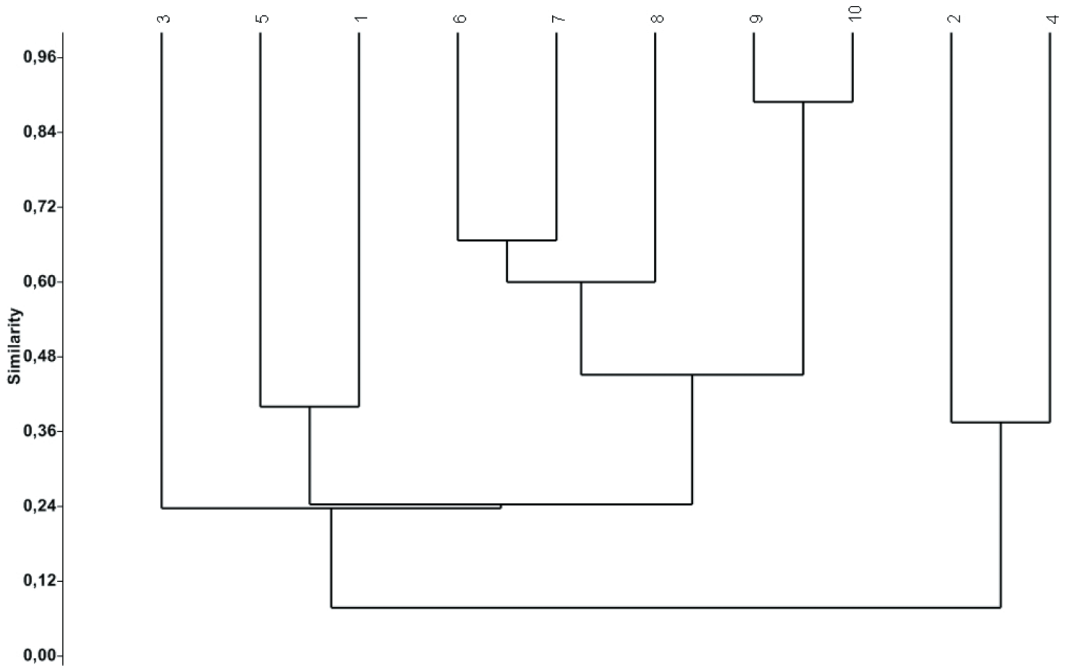
No. transect	Impact	Photo
1	Destruction of the habitat of the species <i>Callimorpha quadripunctaria</i> (of the host plants by mowing and hive storage).	

No. transect	Impact	Photo
2	Destruction of the forest edge vegetation due to exploitation, storage of wood waste, soil stripping, and to forest road enlargement.	

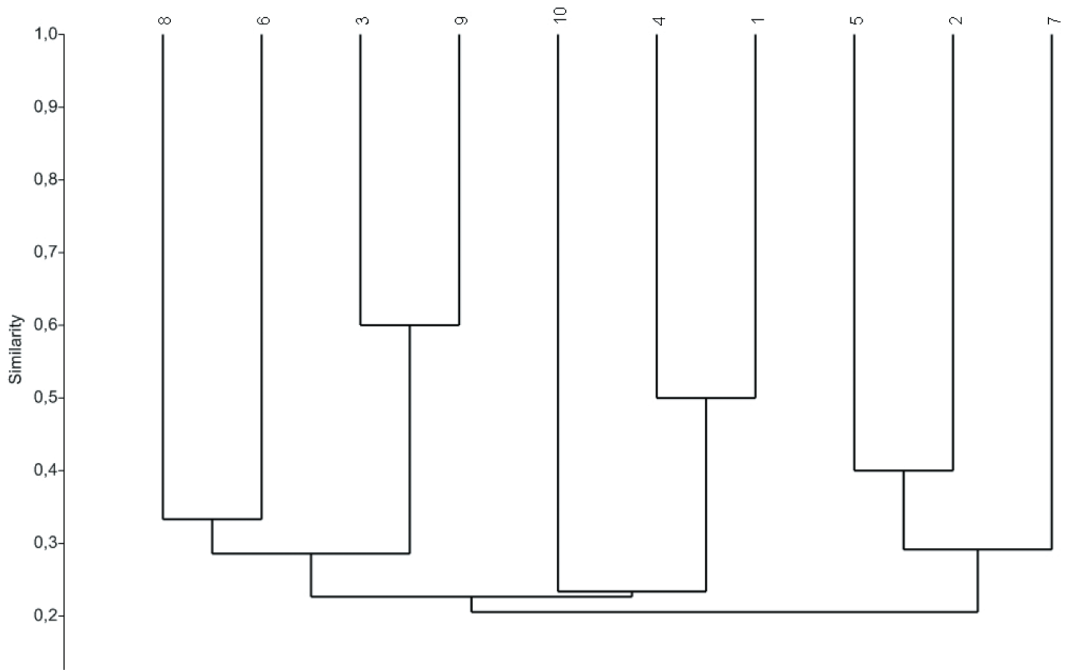
If we take into consideration the influence the exposition of the investigated transects on the numerical abundances of *Callimorpha quadripunctaria*, we observed that in 2014 and 2015, this species preferred the plateau areas. This phenomenon was explicable due to the fact that the favorable habitats for this butterfly (forest edges and sunny clearings) were located on plane surfaces. In the same time, we observed that the species *Callimorpha quadripunctaria* was identified in habitats with North-West and East exposure and with slopes between 1% and 30%, in both years of study. In these areas, even if the slope is more pronounced (and the areas are not flat), the hydrological web is more developed, which creates favorable conditions for the developing of riparian habitats (Fig. 15, 16).

The most important factor that influenced the distribution of the species *Callimorpha quadripunctaria* was air humidity. In both years were preferred habitat where the air humidity was between 76% and 80%. On night traps, located in forest edge and meadows, the air humidities were more decreased (54%-60%), only two individuals were identified (Fig.17). The air humidity is strongly correlated with air temperature. The air temperature interval favorable to the species *Callimorpha quadripunctaria* was by 24,8°C-27°C (Fig. 20). If we put into discussion the soil temperature, the interval 20°C – 23°C was preferred by the monitored species, If in 2014, the highest number of individuals was recorded on soil temperatures up to 23°C, in 2015, which was driest and warmer (up to 30°C), *Callimorpha quadripunctaria* recorded a lower numerical abundance (Fig. 19).

If we take into analysis the cloud cover, we observed that on lower values that 40% were recorded the highest values of numerical abundances. On higher values of this environment parameter, the butterfly species recorded one individual per each transect, but in rest (Fig.18). The *Callimorpha quadripunctaria* was identified in both years, when there was no wind or when its intensity was very low (1-2 on Beaufort scale).



A. Jaccard index of similarity, 2014



B. Jaccard index of similarity, 2015

Fig. 14. Jaccard index of similarity, 2014-2015.



Table 5: Population parameters of the *Callimorpha quadripunctaria* and of the its accompanying day butterflies species, from the period 2014-2015.

Species	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Ind	nos	x	x/sq.m...	CV	A%	C%	F%	D%				
<i>Pontia edusa</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0.1	0.2	316.23	0.34	10	10	0.34				
<i>Aglais urticae</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	2	1	4	3	0.4	0.8	174.80	1.34	30	30	1.34				
<i>Aphantopus hyperantus</i>	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	5	5	0.5	1	105.41	1.68	50	50	1.68				
<i>Arachnia levana</i>	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	3	3	0.3	0.6	161.02	1.01	30	30	1.01				
<i>Argynnis pandora</i>	0	1	0	3	0	0	0	0	0	0	4	2	0.4	0.8	241.52	1.34	20	20	1.34				
<i>Argynnis paphia</i>	1	3	2	13	1	3	1	1	4	9	38	10	3.8	7.6	106.57	12.75	100	100	12.75				
<i>Callimorpha quadripunctaria</i>	2	0	0	0	0	1	0	1	2	2	8	5	0.8	1.6	114.87	2.68	50	50	2.68				
<i>Aglais io</i>	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	6	6	0.6	1.2	86.07	2.01	60	60	2.01				
<i>Lasiommata megera</i>	0	0	2	0	0	1	1	1	1	1	7	6	0.7	1.4	96.42	2.35	60	60	2.35				
<i>Leptidea sinapis</i>	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	3	3	0.3	0.6	161.02	1.01	30	30	1.01				
<i>Ochlodes sylvanus</i>	3	0	1	8	3	0	0	0	0	0	15	4	1.5	3	172.85	5.03	40	40	5.03				
<i>Pararge aegeria tircis</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	3	4	2	0.4	0.8	241.52	1.34	20	20	1.34				
<i>Pieris brassicae</i>	0	1	0	3	0	0	0	0	0	2	6	3	0.6	1.2	179.16	2.01	30	30	2.01				
<i>Pieris rapae</i>	6	3	5	19	3	24	51	5	5	6	127	10	12.7	25.4	119.99	42.62	100	100	42.62				
<i>Polygonia c-album</i>	1	0	1	2	0	2	0	0	1	1	8	6	0.8	1.6	98.60	2.68	60	60	2.68				
<i>Vanessa atalanta</i>	2	0	1	2	1	3	1	0	4	0	14	7	1.4	2.8	96.42	4.70	70	70	4.70				
<i>Vanessa cardui</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0.1	0.2	316.23	0.34	10	10	0.34				
<i>Amata phegea</i>	0	2	0	0	4	0	0	0	0	0	6	2	0.6	1.2	224.98	2.01	20	20	2.01				
<i>Celestrina argiolus</i>	0	0	0	0	2	2	0	0	0	2	6	3	0.6	1.2	161.02	2.01	30	30	2.01				
<i>Colias croceus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	1	0.2	0.4	316.23	0.67	10	10	0.67				
<i>Iphiclydes podalirius</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0.1	0.2	316.23	0.34	10	10	0.34				
<i>Lycaena dispar</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0.1	0.2	316.23	0.34	10	10	0.34				
<i>Maniola jurtina</i>	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	3	3	0.3	0.6	161.02	1.01	30	30	1.01				
<i>Pieris napi</i>	3	0	0	22	0	0	0	0	0	0	25	2	2.5	5	276.65	8.39	20	20	8.39				
Total												298											
												100											

nos= number of samples with individuals.

Table 6: Population parameters of the *Callimorpha quadripunctaria* and of the its accompanying day butterflies species, from the period 2014.

Species	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Ind	nos	x	x/sqm.	CV	A%	C%	F%	D%	
<i>Callimorpha quadripunctaria</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	2	1	5	3	0.5	1	170	8.20	30	30	8.2	
<i>Aglais io</i>	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	4	4	0.4	0.8	129	6.56	40	40	6.56	
<i>Ochlodes sylvanus</i>	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	3	3	0.3	0.6	161	4.92	30	30	4.92	
<i>Lasiommata megera</i>	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	6	6	0.6	1.2	86.1	9.84	60	60	9.84	
<i>Polygonia c-album</i>	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	5	5	0.5	1	105	8.20	50	50	8.2	
<i>Pieris brassicae</i>	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	2	2	0.2	0.4	211	3.28	20	20	3.28	
<i>Argynnis paphia</i>	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	8	8	0.8	1.6	52.7	13.11	80	80	13.1	
<i>Argynnis pandora</i>	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	2	2	0.2	0.4	211	3.28	20	20	3.28	
<i>Leptidea sinapis</i>	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	3	3	0.3	0.6	161	4.92	30	30	4.92	
<i>Pieris rapae</i>	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	5	5	0.5	1	105	8.20	50	50	8.2	
<i>Pontia edusa</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0.1	0.2	316	1.64	10	10	1.64	
<i>Arachnia levana</i>	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	3	3	0.3	0.6	161	4.92	30	30	4.92	
<i>Parage aegeria tircis</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0.1	0.2	316	1.64	10	10	1.64	
<i>Vanessa cardui</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0.1	0.2	316	1.64	10	10	1.64	
<i>Vanessa atalanta</i>	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	5	5	0.5	1	105	8.20	50	50	8.2	
<i>Aphantopus hyperantus</i>	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	5	5	0.5	1	105	8.20	50	50	8.2	
<i>Aglais urticae</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	2	0.2	0.4	211	3.28	20	20	3.28	
Total											61					100				

nos= number of samples with individuals.

Table 7.: Population parameters of the *Callimorpha quadripunctaria* and of the its accompanying day butterflies species, from the period 2015.

Species	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Ind.	nos	x	x/mp.	CV	A%	C%	F%	D%			
<i>Callimorpha quadripunctaria</i>	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	3	3	0.3	0.6	161	1.266	30	30	1.266			
<i>Amata phegea</i>	0	2	0	0	4	0	0	0	0	0	6	2	0.6	1.2	225	2.532	20	20	2.532			
<i>Aglais urticae</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	2	2	0.2	0.4	210.8	0.844	20	20	0.844			
<i>Argynnis pandora</i>	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	2	1	0.2	0.4	316.2	0.844	10	10	0.844			
<i>Argynnis paphia</i>	0	2	2	13	0	2	0	0	3	8	30	6	3	6	142.3	12.66	60	60	12.66			
<i>Aglais io</i>	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	2	2	0.2	0.4	210.8	0.844	20	20	0.844			
<i>Maniola jurtina</i>	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	3	3	0.3	0.6	161	1.266	30	30	1.266			
<i>Ochlodes sylvanus</i>	2	0	0	8	2	0	0	0	0	0	12	3	1.2	2.4	210.8	5.063	30	30	5.063			
<i>Pieris brassicae</i>	0	0	0	2	0	0	0	0	0	2	4	2	0.4	0.8	210.8	1.688	20	20	1.688			
<i>Pieris napi</i>	3	0	0	22	0	0	0	0	0	0	25	2	2.5	5	276.6	10.55	20	20	10.55			
<i>Pieris rapae</i>	5	2	5	19	3	24	50	5	4	5	122	10	12.2	24.4	124.5	51.48	100	100	51.48			
<i>Polygonia c-album</i>	0	0	0	2	0	1	0	0	0	0	3	2	0.3	0.6	225	1.266	20	20	1.266			
<i>Vanessa atalanta</i>	1	0	1	2	0	2	0	0	3	0	9	5	0.9	1.8	122.3	3.797	50	50	3.797			
<i>Lasioommata megera</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0.1	0.2	316.2	0.422	10	10	0.422			
<i>Iphiclidides podalirius</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0.1	0.2	316.2	0.422	10	10	0.422			
<i>Celestrina argiolus</i>	0	0	0	0	2	2	0	0	0	2	6	3	0.6	1.2	161	2.532	30	30	2.532			
<i>Lycaena dispar</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0.1	0.2	316.2	0.422	10	10	0.422			
<i>Pararge aegeria tircis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	1	0.3	0.6	316.2	1.266	10	10	1.266			
<i>Colias croceus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	1	0.2	0.4	316.2	0.844	10	10	0.844			
Total											237											100

nos= number of samples with individuals.

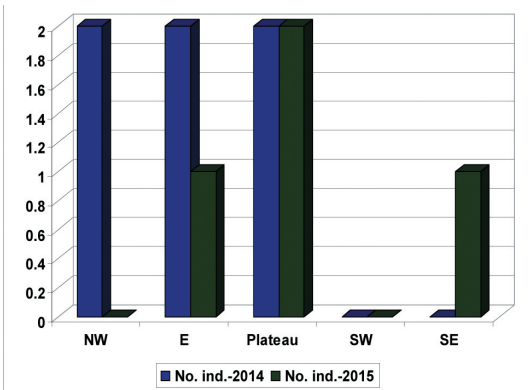


Fig. 15. Distribution of the numerical abundances, taking into account of the exposure, 2014 – 2015.

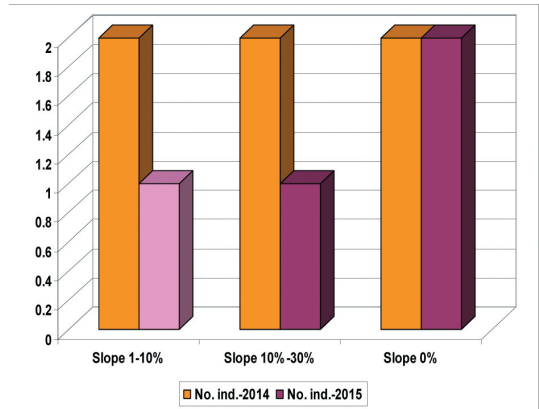


Fig. 16. Distribution of the numerical abundances, taking into account of the slope, 2014 - 2015.

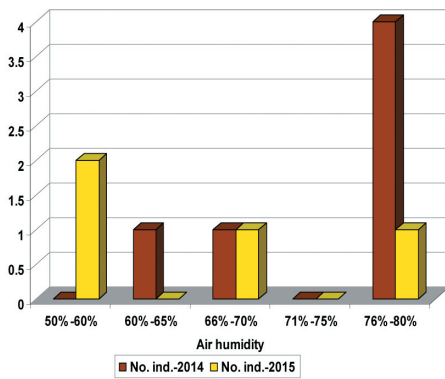


Fig. 17. Distribution of the numerical abundances, taking into account of the air humidity, 2014 – 2015.

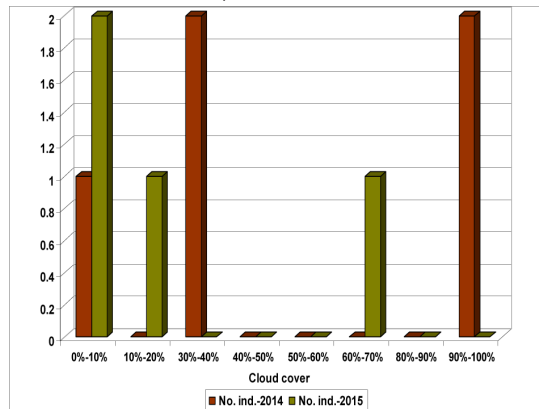


Fig. 18. Distribution of the numerical abundances, taking into account of the cloud cover, 2014 - 2015.

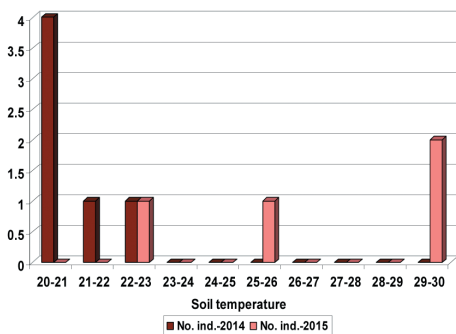


Fig. 19. Distribution of the numerical abundances, taking into account of the soil temperature, 2014-2015.

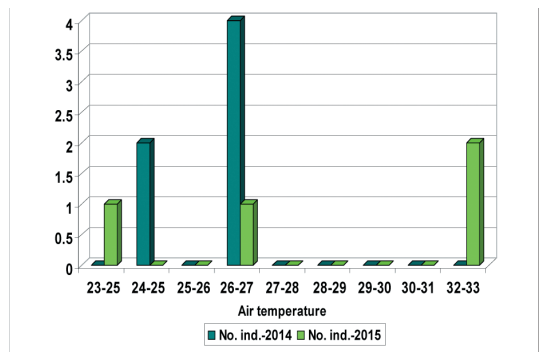


Fig. 20. Distribution of the numerical abundances, taking into account of the air temperature, 2014-2015.

Table 8: The structure of field informations (day transects) for monitoring of the species *Callimorpha quadripunctaria* in 2014.

No. transect	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
No. individuals	2 ♀	0	0	0	0	0	0	0	2 ♀	1 ♀
Date	6.07.2014	7.07.2014	6.07.2014	8.07.2011	9.07.2014	7.08.2014	8.08.2014	10.08.2014	9.08.2014	9.08.2014
Hour	9.04	10.12	12.30	11.15	9.47	9.32	10.04	9.23	11.43	11.43
Latitude	45.21694	45.18866	45.18980	45.17744	45.19297	45.13290	45.13376	45.13665	45.21938	45.18453
Longitude	028.27986	028.34147	028.33904	028.32372	028.31304	028.36390	028.35622	028.30652	028.29016	028.34692
Altitude	176 m	139 m	130 m	216 m	165 m	137 m	157 m	152 m	163 m	122 m
Relief	Slope	Plateau	Plateau	Slope	Slope	Slope	Slope	Plateau	Slope	Plateau
Exposure	NW	-	-	SW	SW	SE	SE	-	E	-
Slope %	5	-	-	5	5	10	10	-	30	-
Canopy%	0	0	0	0	0	60	60	70	0	0
Toponymy	Valea Seacă	Valea Nifonului- „La brazi”	Nifon- Dealul cu Drum	Nifon- Dealul cu Drum	Nifon- Dealul cu Drum	Nifon- village	Nifon-village	Greci	Valea Seacă	Nifon
Habitat	Forest edge + riparian area	Forest edge	Forest edge + riparian area	Forest edge + riparian area	Forest edge + riparian area	Forest edge	Forest edge	Forest edge	Forest edge + riparian area	Forest edge + clearing
Natura 2000 habitat	91MO	91IO	91AA	91IO	91IO	91MO	91MO + 91IO	91MO + 91IO	91MO + 91IO + 91YO	91 AA
Air temperature (°C)	26,3 °C	30,6 °C	29,9 °C	28,6 °C	29,7 °C	26,3 °C	25,8 °C	22,1 °C	24,8 °C	26,5 °C
Soil temperature (°C)	20,8 °C	26,5 °C	26,7 °C	26,1 °C	24,1 °C	21,2 °C	20,9 °C	28,2 °C	20,7 °C	22,3 °C
Air humidity %	76	65	73	60	72	68	65	62	77	70
Cloud cover %	25	75	85	80	5	35	35	30	95	5
Wind speed	1	0	0	0	1	1	2	0	0	0
Wind direction	SE	-	-	-	SE	SE	SE	-	-	-

N = North, W = West, E = East, S = South

Table 9: The structure of field informations (day transects) for monitoring of the species *Callimorpha quadripunctaria* in 2015.

No. transect	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
No. individuals	0	0	0	0	0	1♀	0	0	1♀	1♀
Date	26.06.2015	27.06.2015	26.06.2015	18.07.2015	19.07.2015	19.07.2015	27.06.2015	17.06.2015	18.07.2015	18.07.2015
Hour	8.30	8.56	11.23	11.36	9.15	14.32	11.14	9.34	14.15	16.25
Latitude	45.21694	45.18866	45.18980	45.17744	45.19297	45.13290	45.13376	45.13665	45.21938	45.18453
Longitude	028.27986	028.34147	028.33904	028.32372	028.31304	028.36390	028.35622	028.30652	028.29016	028.34692
Altitude	176 m	139 m	130 m	216 m	165 m	137 m	157 m	152 m	163 m	122 m
Relief	Slope	Slope	Plateau	Slope	Slope	Slope	Slope	Plateau	Slope	Plateau
Exposure	NE	SW	-	SW	SW	SE	SE	-	E	-
Slope %	5	10	-	5	5	10	10	-	30	-
Canopy%	0	50	0	0	0	60	60	65	0	0
Toponymy	Valea Seacă	Valea Nifonului- „La brazi”	Nifon- Dealul cu Drum	Nifon- Dealul cu Drum	Nifon- Dealul cu Drum	Nifon-village	Nifon-village	Greci	Valea Seacă	Nifon
Habitat	Forest edge + riparian area	Forest edge	Forest edge + riparian area	Forest edge + riparian area	Forest edge + riparian area	Forest edge	Forest edge	Forest edge	Forest edge + riparian area	Forest edge + clearing
Natura 2000 habitat	91M0	91I0	91AA	91I0	91I0	91M0	91M0 + 91I0	91M0 + 91I0	91M0 + 91I0 + 91Y0	91 AA
Air temperature (°C)	22,5 °C	23 °C	25,6 °C	26,5 °C	23,2 °C	26,7 °C	25,1 °C	22,1 °C	23,1 °C	33,6 °C
Soil temperature (°C)	22,1 °C	22,4 °C	24,2 °C	26,1 °C	22,7 °C	25,2 °C	24,4 °C	21,2 °C	22,8 °C	29,4 °C
Air humidity %	69	64	71	60	67	50	51	62	77	67
Cloud cover %	50	0	0	80	0	0	30	10	95	15
Wind speed	1	3	0	0	0	0	3	1	2	1
Wind direction	SE	SE	-	-	-	-	SE	SE	SE	SE

N = North; W = West; E = East; S = South

Table 10. The structure of field informations (night transects) for monitoring of the species *Callimorpha quadripunctaria* in 2015.

No. transect	1	2	3	4
No. individuals	0	0	0	1
Date	7.07.2014	6.07.2015	9.08.2015	10.08.2015
Hour	22.17	22.17	20.5	21.23
Latitude	45.17704	45.1902	45.17704	45.18146
Longitude	28.3371	28.3371	28.26711	28.26163
Altitude	129	129	78	81
Relief	Plateau	Plateau	Slope	Plateau
Exposure			SW	
Slope %			5	
Canopy %	0	0	5	15
Toponym	Valea Nifonului "La brazil"	Valea Nifonului "La brazil"	Greci	Greci- "Dealul cu drum"
Habitat	Forest edge + riparian area	Forest edge + riparian area	Forest edge + riparian area	Forest edge + meadow
Natura 2000 habitat	91 AA	91 IO	62CO	62CO
Air temperature	19°C	19 °C	27.2°C	26.7°C
Soil temperature	15°C	15 °C	23.4 °C	21.3 °C
Air humidity %	73	73	40	60
Cloud cover	0	0	0	0
Wind speed	0	0	0	0
Wind direction				

Table 11. The structure of field informations (night transects) for monitoring of the species *Callimorpha quadripunctaria* in 2015.

No. transect	1	2	3	4
No. individuals	0	0	0	1
Date	27.06.2015	26.06.2015	19.07.2015	18.07.2015
Hour	22.23	22.52	21.15	23.31
Latitude	45.17704	45.19017	45.17704	45.18146
Longitude	28.3371	28.3371	28.26711	28.26163
Altitude	129	129	78	81
Relief	Plateau	Plateau	Slope	Plateau
Exposure			SW	
Slope %			5	
Canopy %	0	0	5	15
Toponym	Valea Nifonului "La brazil"	Valea Nifonului "La brazil"	Greci	Greci- "Dealul cu drum"
Habitat	Forest edge + riparian area	Forest edge + riparian area	Forest edge + riparian area	Forest edge + meadow
Natura 2000 habitat	91 AA	91 IO	62CO	62CO
Air temperature	21.2 °C	23.4 °C	30.2 °C	32.1 °C
Soil temperature	20.2 °C	22.2 °C	29.2 °C	29.2 °C
Air humidity %	63	55	44	54
Cloud cover	0	0	0	0
Wind speed	1	0	0	0
Wind direction	SE			

If we take into consideration the identified the actual pressure, according to the Salafsky et al., 2008, five of them were identified, grouped according to their intensity level (high, medium, small or no pressure), each being assigned conservation measures, as following (Fig. 21):

- forest roads; we recommend reducing the intensity of the existing forest road use, especially during the monitoring period, to ensure the conservation of the riparian area. Prohibition of stationing of any kind of machinery (apiaries, logging equipment), thus eliminating the negative impact they may have (destruction of riparian and forest edge vegetation).
- touristic activities; some transects as those from Seaca Valley are located on the edge of the forest road, which is circulated by tourists and cyclists. Especially in the monitoring period, we recommend limiting the number of tourists and / or monitoring them.
- microclimate aspects: dryness. In order to keep the specific microclimate of the research area, with a higher air humidity, the vegetation from the forest edge and from riparian area must be conserved. In the same time the water source will be maintained in good conditions, prohibiting its capture or drainage.
- grazing; in the monitorized area we observed the animals transit. We recommend the extensive/traditional grazing, in order to preserve the mosaic aspect of the habitat, avoiding overgrazing.
- wood removal. We recommend the maintaining of the mosaic aspect of the habitats, by keeping of the forest edges, riparian areas and by prohibiting forestry exploitation, which may affect the habitat of the species.

In the same time the threats of *Callimorpha quadripunctaria* were identified, grouped according to their intensity level (high, medium, small or no threats) (Fig. 22):

- New forest roads. We recommend the prohibiting the construction of new forest roads.
- Catching / obstructing the water supply. Because the habitat of this species is strongly correlated with a water source, we recommend its maintenance, so as to avoid clogging or obstructing it.
- Waste; the construction of special places for trash and this must be collected frequently.
- Wood removal. The prohibiting of forest cuts and maintenance of the forest edge habitats.
- Use of chemicals. The conservative measures are: limiting the use of fertilizers, chemical treatments and controlled use of organic fertilizers. Biocides with low toxicity and high specific selectivity will be used only in extreme cases as the ultimate pest control solution.
- Fire. Due to the drought and tho the tourists flow, the danger of the fires is higher, being possible the destruction of the favorable habitats. This is the reason for prohibiting fire in the forest.
- Habitat destruction. We observed in investigated transects/habitats the presence of numerous apiaries and cars. We recommend limiting their access, so as not to destroy the characteristic vegetation.
- Overgrazing. We recommend the extensive/traditional grazing, in order to preserve the mosaic aspect of the habitat (represented by areas covered by shrubs alternating with areas covered by grass vegetation), avoiding overgrazing.



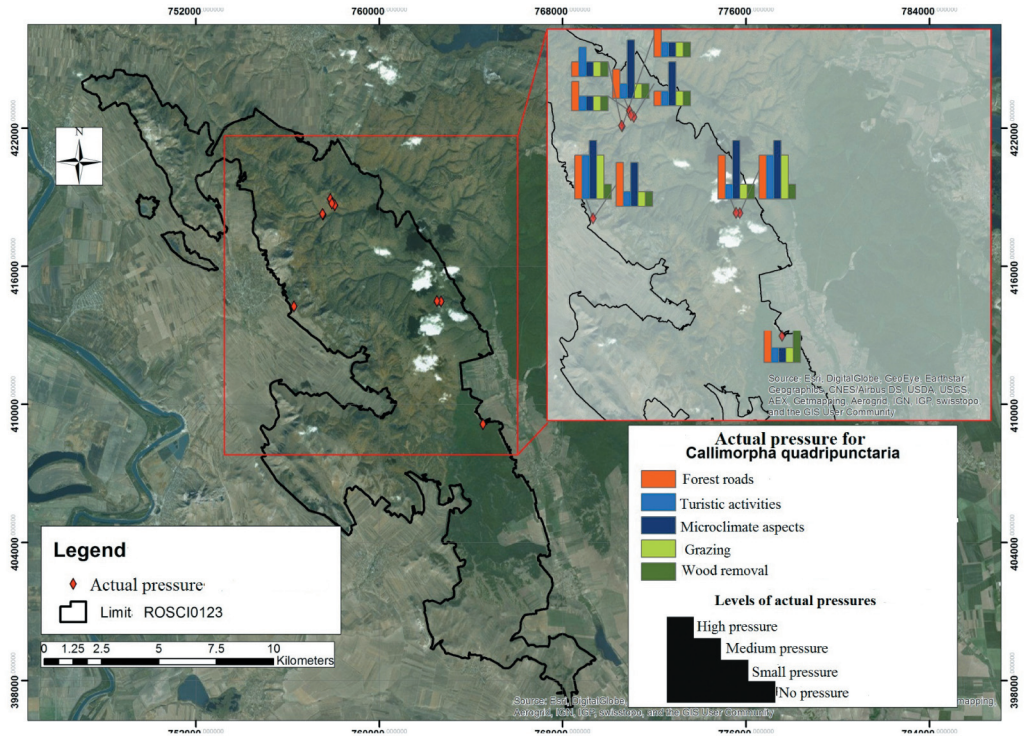


Fig. 21. Actual pressures on the species *Callimorpha quadripunctaria*.

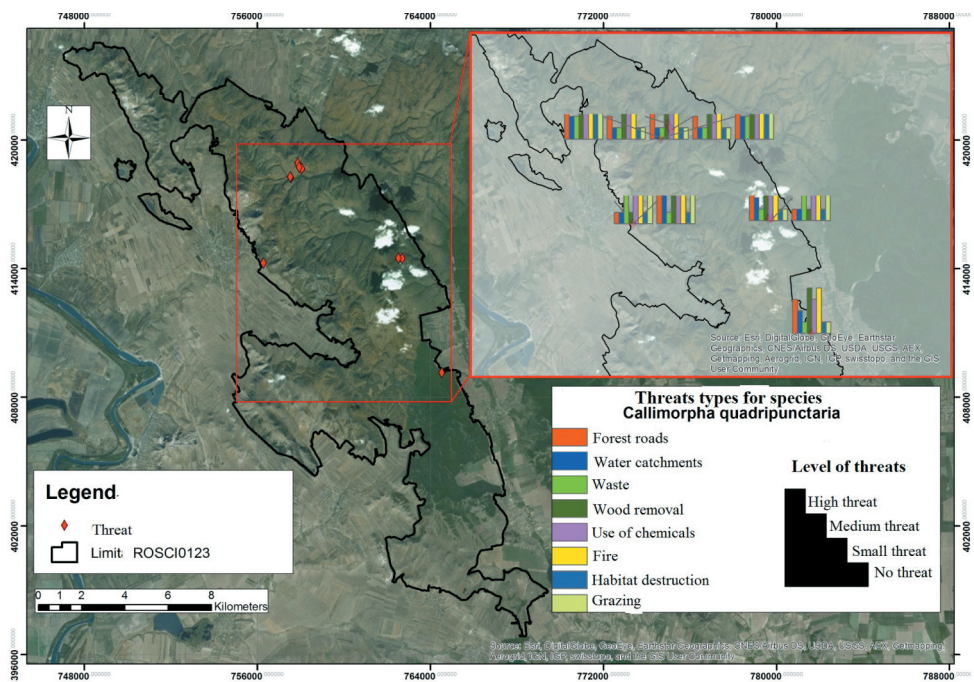


Fig. 22. Threats on the species *Callimorpha quadripunctaria*.

## CONCLUSIONS

The monitoring of the species *Callimorpha quadripunctaria* was made using the transect method. In 2014 and 2015, its monitoring was made on the same transects every year. Those were chosen taking into account of the habitat and ecological preferences of the species *Callimorpha quadripunctaria*. This species was identified in the following Natura 2000 habitats: Pannonian-Balkan Turkey oak – sessile oak forests (91M0); Dacian oak and hornbeam forests (91Y0); Euro-Siberian steppic woods with *Quercus* spp. (91I0\*); Eastern white oak forests (91AA); Dobrogean beech forests (91X0) and Ponto-Sarmatian deciduous thickets (40C0\*).

The species *Callimorpha quadripunctaria* was monitorized in four type of habitats: deciduous forest edge+riparian area; only deciduous forest edge; deciduous forest edge+forest clearing and forest edge+meadows. It preferred forest edge+riparian area and forest edge+forest clearing habitats. In generally, was proved that this butterfly prefers sunny plateau areas, without wind and with a air humidity higher than 50%. Another observed phenomen was that the species preferred the habitats with North-West and East exposure, with slopes between 1% and 30%, areas where the hydrological web was well developed, maintaining in good conditions the riparian habitats. In the same time was discovered that the favorable air temperature interval for *Callimorpha quadripunctaria* was by 24,8°C-27°C.

Although the favorable habitats for species *Callimorpha quadripunctaria* were chosen, the environment and anthropic factors influenced the structure and dynamics of the butterfly populations. The severe drought from the second year of study (2015), correlated with the ecological degradation of the investigated habitats, determined a decreasing of the numerical abundances of the species and a modification of population parameters.

Considering the annual dynamics, the most favorable year for *Callimorpha quadripunctaria* was 2014, in comparison with 2015, due to the most increased air humidity and to the lowest air temperatures. Analyzing the monthly dynamics, we observed that species was not found in June, recommending that its monitoring to start in the middle of the July, when host plant *Eupatorium cannabinum* is blooming. Another important observed aspect is the facts that all water sources from MMNP are temporary, influencing the microclimate of the area.

In this study, the actual pressure, threats on the species and the conservation measures were identified. The main identified pressure were: the presence of forest roads, touristic activities, drought, grazing and forest cutting. As the future threats we identified: building of the new forest roads, new forest cuttings, forest fires, overgrazing, chemical treatments for forest pest and catching or obstructing of the water supply. The most important conservation measures are: the prohibiting of any for of deforestation, of forest fires and overgrazing, the maintenance thought traditional/extensive grazing of the mosaic structure of the habitats, reducing the intensity of forest roads use, especially in the monitoring period, in order to protect the riparian areas. In the favorable habitats for *Callimorpha quadripunctaria*, it is we don't recommend the stationary of any type all big cars (apiaries or logging equipment), eliminating their negative impact on the riparian or forest edge vegetation. We also recommend the monitoring of the tourists and limiting their number.

If environment conditions will be more favorable and the anthropic impact will decrease, in the same time maintaining the proposed conservative measures, species *Callimorpha quadripunctaria* will be able to increase its population effective. In the actual condition, we estimate that the tendency of population size for the next 2-3 years will be stationary.

**Acknowledgements.** This study was carried out within the framework of project RO1567-IBB01/2018, from the Institute of Biology Bucharest of Romanian Academy and from POS MEDIU, code SMIS-CSNR 36253 – *Providing a favourable conservation status for species and habitats in the Măcin Mountains Natural Park: “Implementation of the monitoring plan for nine protected species of community interest in Măcin Mountains National Park and overlapped Natura 2000 sites”, 2014–2015; beneficiary: Administration of Măcin Mountains National Park.*

## BIBLIOGRAPHY

- ▶ BERN Convention, 1979. Convention on the Conservation of European Wildlife and Natural Habitats.
- ▶ Botnariuc N., Vădineanu A., 1982. Ecologie [Ecology]. Editura Didactică și Pedagogică, București (in Romanian).
- ▶ Engelmann H. D., 1978. Zur Dominanzklassifizierung von Bodenarthropoden [Dominance classification of the epigeal arthropods]. *Pedobiologia* 18: 378–380.
- ▶ EUNIS, the European Nature Information System (available at: <https://eunis.eea.europa.eu/index.jsp>)
- ▶ Gafta D., Mountford J.O., 2008, Manual de interpretare a habitatelor Natura 2000 din România (Romanian Manual for Interpretation of EU Habitats). Cluj-Napoca: Risoprint. ISBN 978-973-751-697-8.
- ▶ Habitat Directive, 92/43/EEC of 21 May 1992 on the conservation of natural habitats and of wild fauna and flora: Official Journal of E.U., 22.7.92 (L: 206/7): 7–50. (available at: [http://ec.europa.eu/environment/nature/legislation/habitatsdirective/index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/environment/nature/legislation/habitatsdirective/index_en.htm)).
- ▶ Hammer Ø., Harper D.A.T., Ryan P.D., 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica* 4: 9 pp.
- ▶ Huler S., 2004. Defining the Wind: The Beaufort Scale, and How a 19th-Century Admiral Turned Science into Poetry. Crown. ISBN 1-4000-4884-2.
- ▶ Iorgu I. Ș. (Ed.), Surugiu V., Gheoca V., Popa O.P., Popa L.O., Sîrbu I., Părvulescu L., Iorgu E.I., Mancu C.O., Fusu L., Stan M., Dascălu M.M., Székely L., Stănescu M., Vizauer T.C., 2015. Ghid sintetic pentru monitorizarea speciilor de nevertebrate de interes comunitar din România. Asociera S.C. Compania de Consultanță și Asistență Tehnică S.R.R. și S.C. Integra Trading S.R.L., Bucharest, 159pp. (in Romanian).
- ▶ Manu M., Lotrean N., Badiu D., Bodescu F., Nicoară R., Onete M., 2016. Monitoring of the saproxylic beetles *Rosalia alpina* (Linnaeus, 1758) (Coleoptera: Cerambycidae) using visual method in Măcin Mountains National Park - Romania. *Romanian Journal of Zoology*, 61 (1-2): 43-59.
- ▶ Salafsky N., Salzer D., Stattersfield A.J., Hilton-Taylor C., Neugarten R., Butchart S.H.M., Collen B., Cox N., Master L.L., O'connor S., Wilkie D., 2008. A Standard Lexicon for Biodiversity Conservation: Unified Classifications of Threats and Actions. *Conservation Biology*, 22: 897–911.
- ▶ Selvin S., Vacca A., 2004. Biostatistics. How it works. Pearson Education, UK.
- ▶ Székely L., 2010. Moth of Romania I. Editura Tipo, Brașov, 264 pp.
- ▶ UNDP/GEF PROJECT: Enhancement of the national system of protected areas in Romania – the best management practices in Măcin Mountains National Park. Atlas Project no. 047111. (June 2006 – December 2007).
- ▶ Van Sway C., Brereton T., Kirkland P., Warren M., 2012. Manual for Butterfly Monitoring. London; pp. 14

- ▶ Wikstroem A., Milberg B., Bergman K.O., 2009. Monitoring of butterflies in semi-natural grasslands: diurnal variation and weather effects. *Journal of Insect Conservation*, 2 (13): 203-211.
- ▶ \*\*\* Romanian Official Monitor no. 442 from 29 June 2007. Emergency ordinance no. 57 from 20 June 2007 on the protected sites status, on conservation of natural habitats, flora and wild fauna.
- ▶ \*\*\* Romanian Official Monitor no. 262 from 13 April 2011. Law no. 49 from 7 april 2011 for the approval of the emergency ordinance no. 57/2007 on the protected sites status, on conservation of natural habitats, flora and wild fauna.
- ▶ \*\*\* Romanian Official Monitor, part I, no. 98 bis/7.ii.2008. Romanian environmental protection and sustainable development ministry order no.1.964/2007 concerning the establishment of comunitary importance protected sites as part of the European ecological network natura 2000 in Romania.
- ▶ \*\*\*<http://www.parcmacin.ro/plan-management>

REZUMATE  
—*LIMBA ROMÂNĂ*—

# IZOLAREA ȘI CARACTERIZAREA UNEI TULPINI BACTERIENE CU POTENȚIAL BIOTEHNOLOGIC

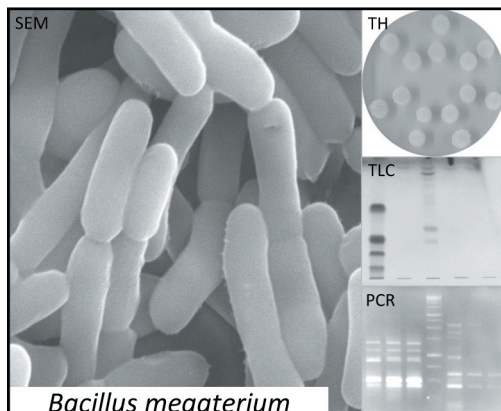
Mihaela Marilena Stancu

Institutul de Biologie București al Academiei Române, Splaiul Independenței nr. 296, sector 6, București, România, e-mail mihaela.stancu@ibiol.ro

Biodegradarea petrolului și produselor petroliere este un proces complex, a cărui evoluție depinde de natura și de concentrația hidrocarburilor existente și de interacția dintre factorii de mediu (temperatură, oxigen sau alți acceptori de electroni, nutrienți, salinitate, pH, umiditate, presiune hidrostatică) și factorii biologici (diversitate bacteriană, metabolism). Petrolul și produsele petroliere care sunt deversate adesea în mediul înconjurător (sol, apă) au un conținut mare de hidrocarburi alifaticе și aromatice care sunt toxice pentru majoritatea bacteriilor. Cu toate acestea, există unele tulpini de bacterii Gram-pozitive, inclusiv din genul *Bacillus*, care sunt capabile să tolereze și/sau să degradeze diferite hidrocarburi alifaticе și aromatice.

Tulpina *Bacillus megaterium* IBB<sub>Po17</sub> (KX499518) a fost izolată dintr-o probă de șlam petrolier. *Bacillus megaterium* IBB<sub>Po17</sub> a tolerat foarte bine prezența în mediu atât a hidrocarburilor alifaticе (ciclohexan, hexan, decan, hexadecan), cât și a celor aromatice (toluen, stiren, etilbenzen) cu log  $P_{OW}$  (logaritmul coeficientului de distribuție al hidrocarburi într-un amestec 1-octanol și apă) cuprins între 2,64 și 9,15. Toxicitatea hidrocarburilor testate a fost invers corelată cu log  $P_{OW}$ . Hidrocarburi alifaticе (log  $P_{OW}$  3,35-9,15) au fost mai puțin toxice pentru *Bacillus megaterium* IBB<sub>Po17</sub>, comparativ cu cele aromatice (log  $P_{OW}$  2,64-3,17).

Ca rezultat al expunerii celulelor de *Bacillus megaterium* IBB<sub>Po17</sub> la hidrocarburi alifaticе și aromatice au fost observate modificări la nivel celular (pori membranari, spori, biofilme). *Bacillus megaterium* IBB<sub>Po17</sub> a produs amilaze, proteaze și celulaze, iar în urma expunerii celulelor bacteriene la hidrocarburi alifaticе și aromatice nu au fost observate modificări semnificative la nivelul profilului enzimatic. Rezultatele studiilor de cromatografie în strat subțire și de electroforeză în gel de poliacrilamidă au evidențiat apariția unor modificări la nivelul profilului lipidic și respectiv proteic, ca rezultat al expunerii celulelor de *Bacillus megaterium* IBB<sub>Po17</sub> la hidrocarburi alifaticе și aromatice. *Bacillus megaterium* IBB<sub>Po17</sub> a produs și eliminat în mediu surfactanți, iar surfactanții sintetizați au activitate foarte bună. Dintre cele opt gene catabolice testate (*alkB*, *alkM*, *alkB1*, *alkM1*, *todM*, *xylM*, *ndoM*, *C23DO*), la *Bacillus megaterium* IBB<sub>Po17</sub> au fost detectate doar genele *alkB1* și *ndoM*. Datorită capacității sale de a tolera atât hidrocarburi alifaticе, cât și hidrocarburi aromatice și de a produce surfactanți, tulpina de



*Bacillus megaterium* izolată ar putea fi folosită în bioremedierea mediilor poluate cu petrol și produse petroliere.

**Cuvinte cheie:** *Bacillus*, hidrocarburi, toleranță, mecanisme.

**Abrevieri:** SEM (microscopie electronică de baleaj), TH (toleranță hidrocarburi), TLC (cromatografie în strat subțire), PCR (reacția de polimerizare în lanț).

# TRIBUL CHRYSOMELINI (COLEOPTERA: CHRYSOMELIDAE) ÎN ROMÂNIA

Sanda Maican<sup>1</sup>, Rodica Serafim<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institutul de Biologie București al Academiei Române, Departamentul de Ecologie, Taxonomie și Conservarea Naturii

<sup>2</sup>Muzeul Național de Istorie Naturală „Grigore Antipa” București

Subfamilia Chrysomelinae include aproximativ 3.000 de specii și subspecii aparținând la 130 de genuri, majoritatea fiind larg răspândite în zonele temperate și în cele tropicale. Unele specii populează zonele deșertice și cele de tundră. Chrysomelinele sunt clasificate în două triburi: Chrysomelini și Timarchini. Tribul monotipic Timarchini este răspândit în vestul Regiunii Palaearctice și în Nearctic, iar reprezentanții tribului Chrysomelini se întâlnesc în toate regiunile (Bouchard *et al.*, 2011; Reid, 2014).

Lucrarea prezintă date noi referitoare la prezența speciilor de Chrysomelini (subtriburile Chrysomelina, Gastrophysina, Phratorina și Prasocurina) în România, pe baza studiului materialului conservat în colecțiile entomologice ale Muzeului Național de Istorie Naturală “Grigore Antipa” și Institutului de Biologie București. Cea mai mare parte a materialului este inclusă în Colecția veche de Coleoptere Palaearctice și în recent înființata Colecție de Chrysomelidae din patrimoniul muzeului (Maican & Serafim, 2017).

În fauna României au fost semnalate până în prezent 23 de specii de Chrysomelini, încadrate în opt genuri (Maican, 2005; Kippenberg, 2010).

Analiza taxonomică a materialului, reprezentat de peste 4.000 de exemplare de Chrysomelini, a evidențiat prezența a 25 de specii din genurile *Chrysomela*, *Plagioder*, *Plagiosterna*, *Gastrophysa*, *Phratora*, *Neophaedon*, *Phaedon* și *Prasocuris*.

Prezentarea sistematică a speciilor (conform *Catalogului Coleoptelor Palaearctice*, Kippenberg, 2010) include informații referitoare la: data și locul colectării, numărul exemplarelor analizate, biologia speciilor (plantele gazdă) și răspândirea generală.

Se remarcă o serie de specii rare în crisomelidofauna României: *Chrysomela lapponica* Linnaeus, 1758, *Chrysomela cuprea* Fabricius, 1775, *Prasocuris junci* (Brahm, 1790), *Prasocuris glabra* (Herbst, 1783).

## BIBLIOGRAFIE

- ▶ BOUCHARD P., Y. BOUSQUET, A. E. DAVIES, M. A. ALONSO-ZARAZAGA, J. F. LAWRENCE, C. H. C. LYAL, A. F. NEWTON, C. A. M. REID, M. SCHMITT, S. A. ŚLIPIŃSKI, A. B. T. SMITH, 2011 - Family-group names in Coleoptera (Insecta). *Zookeys*, 88: 1–972.
- ▶ KIPPENBERG H., 2010 - Subfamily Chrysomelinae Latreille, 1802. Pp. 390–442. *în*: I. Löbl, A. Smetana (eds.), *Catalogue of Palaearctic Coleoptera, Chrysomeloidea*, 6, Apollo Books, Stenstrup, 924 pp.
- ▶ MAICAN S., 2005 - Checklist of Chrysomelidae (Coleoptera) of Romania. *Travaux du Muséum National d’Histoire Naturelle “Grigore Antipa”*, 48: 119–136.
- ▶ MAICAN S., R. SERAFIM, 2017 - The New Leaf Beetle Collection (Coleoptera: Chrysomelidae) of “Grigore Antipa” National Museum of Natural History (Bucharest). Pp. 97. *în*: L. O. Popa, C. Adam, G. Chișamera, E. Iorgu, D. Murariu, O. P. Popa (eds.), *Book of Abstracts, International Zoological Congress of “Grigore Antipa” Museum*, 22–25 November 2017, Bucharest, Romania.



- ▶ REID C. A. M, 2014 - Chrysomelinae Latreille, 1802. Pp. 243–251. *in*: Leschen R.A.B., R.G. Beutel (eds.), Coleoptera Beetles, Vol. 3, Morphology and Systematics (Phytophaga). Walter de Gruyter GmbH & Co KG, Göttingen, 675 pp.

# CRIOCONSERVAREA UNOR APEXURI NODALE DE LA SPECIA *MARSILEA QUADRIFOLIA* L. CULTIVATE *IN VITRO*

*Cristian Banciu, Gabriel Maria, Mihnea Vladimirescu, Ioana Paica, Anca Manole*

Institutul de Biologie București al Academiei Române, Splaiul Independenței nr. 296, sector 6, București,  
România

*Marsilea quadrifolia* este o specie heterofilă aparținând pteridofitelor ce populează zonele umede din Europa, Asia și America de Nord. Este protejată la nivel internațional prin Directiva Habitate și Convenția de la Berna. La nivel național specia are statut periclitat în Listele Roșii, necesitând măsuri speciale de conservare și protecție. În cadrul Parcului Natural Comana a fost identificată o populație relativ limitată ca areal în lunca Neajlovului și care, conform evaluărilor realizate de Administrația Parcului, este în regres vizibil.

Tehnicile *in vitro* constituie o modalitate eficientă de conservare a speciilor periclitat atât prin micromultiplicare cât și prin criostocare. Crioconservarea explantelor vegetale pe termen lung, în azot lichid constituie metoda ideală de menținere a variabilității și stabilității genetice și fenotipice a indivizilor supuși conservării. Prin acest procedeu sunt încetinite procesele metabolice și cele genetice, colecția putând fi menținută în condiții sterile și controlate pe termen practic nelimitat.

Experimentele realizate de colectivul Departamentului de Citobiologie Vegetală și Animală au vizat optimizarea unui protocol de conservare pe termen lung în azot lichid la temperatura de -196°C a unor explante cultivate *in vitro* prin proceduri publicate anterior. Fragmentele nodale ale rizomului de *Marsilea quadrifolia* sunt singurele reactive la factorii hormonal din componența mediului de cultură. Acestea au fost supuse unui proces initial de pre-răcire la 5°C timp de 2 zile, urmat de criotratare proprie-zis cu soluția PVS2 (Plant Vitrification Solution 2 care conține glicerol, etilenglicol și DMSO). Experimentele s-au realizat în 6 repetiții, în 3 variante ale timpilor de expunere la soluția crioprotectoare de 20, 30 și respectiv 45 minute, urmată de imersarea a jumătate dintre probe în azot lichid, cealaltă jumătate constituind lotul martor.

Rezultatele obținute după 40 de zile de la recultivarea explantelor au evidențiat varianta cea mai bună de criostocare prin prerăcire de 48 ore, urmată de 30 minute de tratament cu soluția PVS2 și imersia directă în azot lichid, în urma căreia au supraviețuit și s-au dezvoltat 25% dintre explantele testate. Pe varianta cu tratamentul de 45 minute au supraviețuit doar 10% din explante.

Experimentele realizate ne permit realizarea unei colecții de germoplasmă vegetală, ce poate fi menținută pe termen lung, utilă în procese ulterioare de multiplicare și repopulare a habitatelor favorabile, precum și în studii de biochimie și farmacologie.

# DINAMICA RĂSPÂNDIRII AMBROZIEI (*AMBROSIA ARTEMISIIFOLIA* L.), SPECIE INVAZIVĂ, ÎN VEGETAȚIA COCOREI (JUDEȚUL IALOMIȚA), ÎNTRE ANII 2010–2018

Marian Constantin<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Institutul de Biologie – București, Splaiul Independenței nr. 296, București, email: cvgmarian@gmail.com, marian.constantin@ibiol.ro

<sup>2</sup>Institutul de Cercetări al Universității din București, Bd. M. Kogălniceanu, nr. 36-46, 050107, București

Speciile invazive tind să ocupe arealele populate, în mod obișnuit, de speciile autohtone, conviețuind, pentru o perioadă, cu acestea, după care le înlocuiesc cu totul.

La nivel național, este foarte îngrijorătoare extinderea continuă a zonei ocupate de *Ambrosia artemisiifolia* L. (*ambrozie*), al cărei polen conține câteva toxine care produc alergii la om. În Cocora, prima semnalare a acestei specii a fost în anul 2010, când a fost întocmită o listă a speciilor de plante din localitate. Atunci, *Ambrosia artemisiifolia* L. a fost găsită doar în sud-est, pe marginea drumului dintre Cocora și Căzănești (44°43'34.7"N 27°02'49.1"E), în anul 2017, planta ajungând și pe marginea șoselei dintre Cocora și Colilia (44°44'42.6"N 27°02'00.7"E) și pe unul dintre drumurile din nordul localității (44°44'40.8"N 27°02'29.7"E), iar în anul 2018, fiind foarte răspândită pe marginile șoselelor dintre Colilia și Cocora și dintre Cocora și Căzănești, unde formează câmpuri dense și înlocuiește, pe unele segmente, vegetația spontană, în totalitate.

Tendința de extindere a arealului ambroziei, sesizată în Cocora, este încadrată în tendința generală a acesteia, în România, unde a devenit o prezență comună pe marginea drumurilor, a șoselelor și a căilor ferate.

**Cuvinte cheie:** Cocora, *Ambrosia artemisiifolia* L., ambrozie, ambroziști.

REZUMATE  
—*ENGLISH*—

# A MOLECULAR INVESTIGATION OF POLYMORPHISM IN TOMATO PROGENIES OF VIRUS INFECTED PLANTS

*Andronic Larisa, Smerea Svetlana, Grajdieru Cristina*

Institute of Genetics, Physiology and Plant Protection, 20 Str. Padurii, Chisinau, MD 2002, Republic of Moldova, e-mail: andronic.larisa@yahoo.com

The viral infection dramatically affects plant physiology, including photosynthesis, respiration, carbohydrate levels and can contribute to genome instability, disturbances of the meiotic and mitotic processes, modification in gene expression. At the basis of genetic changes can be postulated that the infection may trigger various variations, which can later be inherited.

The impact of viral infection in progeny was assessed on the basis of four genotypes of tomato (local cultivar Elvira, spontaneous form *S.pimpinellifolium*, the varieties Craigella (Tm-2<sup>2</sup>/Tm-2<sup>2</sup>) and Craigella (Tm-1/Tm-1). For inducing pathogenesis the plants were infected mechanically at the stage of 3-4 leaves with tomato aspermy virus (TAV, isometric virions, RNA genomic nucleic acid component) or tobacco mosaic virus (TMV, rod-shaped particle, RNA genomic nucleic acid component). For the following investigation were used the generation obtained from seeds formed under viral pathogenesis. The tomato progenies were healthy and present absence of viral particles.

For evaluation the intrapopulational polymorphism was used PCR technique, based on the virtually universal presence of a tRNA complement as a reverse transcriptase primer binding site (PBS) in LTR retrotransposons. Total DNA was extracted from leaves by a modified CTAB method. PCR was performed according to the length of amplicons and specificity of primers. The products of amplification were divided into 1.5 % agarose gel by electrophoresis (5-8 V/cm) in a migration buffer of Tris/borate EDTA with ethidium bromide. In order to identify the efficient protocol, were screening as molecular markers 20 iPBS primers, been selected 2 that gave intragenomic polymorphism.

The product of amplification based on primers iPBS presented qualitative differences in molecular profile. The frequency of unique fragments with intragenomic specificity was dependent on viral infection, and also by morphological aspect described in frame of same experimental variant.

The evaluation of electrophoregrams of the amplification products with primers iPBS established monomorphic and polymorphic fragments with variable ratio in dependence of viral infection and induced modification. The higher number of fragments was identified using 17 iPBS primer in Craigella (Tm-1/Tm-1) presented in control 10 amplicons. In TAV variant has been show also 10 polymorphic fragments. The differences in profiles were find in TMV variants in dependence of morphological aspects of plants. The progenies derived from infected plants exhibited at different ontogenetic stages of some genotypes (*S.pimpinellifolium* infected with TAV, c.Elvira infected with TMV and TAV) modifications of stem, leaf distribution, shoot branching, conversion of components of flowers and the fruit shape or size. Such modification as *regeneration (Rg1)*, *fab2* (fascinated inflorescence), described in generation of the infected plants of the Craigella (Tm-2<sup>2</sup>/Tm-2<sup>2</sup>), were accompanied by unique polymorphic

fragments. Similar results were described also between the plants with modification of *locule number (lc)* and *fascinated (f)* identified in progenies of *S.pimpinellifolium* descendants from TAV infected plants. Similar results had been described and for other evaluated tomato varieties. The molecular analysis with 20 iPBS primer exhibited less fragments (2-3 polymorphic and 1-7 monomorphic).

Must be notified, that in the progenies of TMV and TAV plants, complementary molecular differences were quantified values modifications of biometric traits, confirmed statistically for the most host-pathogen combinations.

# EFFECTS OF VINEYARD MANAGEMENT ON SURFACE COMMUNITIES OF COLLEMBOLA

*Cristina Fiera<sup>1</sup>, Werner Ulrich<sup>2</sup>, Daniela Popescu<sup>3</sup>, Claudiu-Ioan Bunea<sup>4</sup>, Johann Zaller<sup>5</sup>*

<sup>1</sup>Institute of Biology Bucharest, Romanian Academy, 296 Splaiul Independenței, P.O. Box 56-53, RO-060031 Bucharest, Romania, cristina.ivanescu@ibiol.ro

<sup>2</sup>Department of Ecology and Biogeography, Nicolaus Copernicus University Toruń, Lwowska 1, PL-87-100 Toruń, Poland

<sup>3</sup>Jidvei Winery, 45 Garii Street, 517385 Jidvei Alba County, Romania

<sup>4</sup>Faculty of Horticulture, University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca, Cluj-Napoca, Romania

<sup>5</sup>Institute of Zoology, University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna (BOKU), Gregor Mendel Straße 33, 1180 Vienna, Austria

Agricultural soil management is a major driver of biodiversity in vineyards. Tilling, mulching, nutrient application and other interventions damage and disrupt soil functioning to varying extents. The additional use of pesticides and herbicides can seriously harm the biodiversity of vineyard agroecosystems, undermining their capacities to uphold long-term self-sustainability.

The negative effects of agrochemicals on biodiversity may be direct, i.e. killing of target and non-target species, and indirect due to the reduction of resources and/or alteration of competition and predator – prey relationships. In the BiodivERSaA project “VineDivers”, we study how different management intensities and landscape complexity affects communities of surface Collembola in 16 vineyards located near Blaj (46.15971°N/23.92991°E) in Transylvania, Romania.

High management intensity (HI) was characterized by frequent tilling inter- and in-rows, low management intensity (LO) by alternate tilling of in- and inter-rows, permanent vegetation cover in the inter-rows and herbicide application in in-rows. Inter-rows were mulched. Interviews with wine growers provided information about management practices, such as duration of current management type, type of cover crops (natural versus seed mixture), and frequency and date of tillage or mowing.

We will discuss the first results of the springtail survey in relation to vineyard management.

In total, were collected 4692 surface active springtails belonging to 10 families and 24 species. 2742 individuals from 21 species were collected in the LO vineyards and 1950 individuals from 19 species in the HI vineyards. Low tillage intensity and lack of mineral fertilization decreased average springtail richness. Further, herbicide, but not fungicide application, influenced species densities. The type of weed control and management intensity did not significantly influence species richness, densities, and community composition. Species richness, densities, and community composition were only marginally and statistically insignificantly related to soil conditions.

# DETERMINATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY OF *CNICUS BENEDICTUS* IN VIVO AND IN VITRO

Catană Rodica, Helepciuc Florenta, Zamfir Medana, Mitoi Monica

*Cnicus benedictus* L. (Asteraceae family) is an annual, spontaneous medicinal plant species, growing in a well drained, dry, rocky or poor soils. Native to the Mediterranean region, was naturalized throughout the United States and Europe (Al-Snafi, 2016).

The species is used as antidepressant, anti-inflammatory, antiseptic, cardiotonic, antimicrobial and anti-proliferative. Also, the importance of this species is underling by the possibility to be used as an alternative oil crop (due to high fruit yields ~ 2.5 t/ha), good source of linoleic acid and of  $\alpha$ -tocopherol (Horn et al., 2015). *C. benedictus* is not susceptible to illnesses and pests.

In the European Red List of Medicinal Plants, was mentioned like deficient data (Allan et al., 2014). All over the world, the interest in the collection of wild medicinal plants, is continuously increasing due to their economic importance. The market potential for herbal drugs in the world reached more than \$ 107 billion (Global Industry Analysts, 2017).

*In vitro* plant materials represent one of the good sources for the production of secondary metabolite. In the last years, many studies concerning the biological roles of secondary metabolites produced by callus culture were noticed (Çetin et al., 2015).

The capacity of tissue cultures to produce and accumulate valuable chemical compounds comparing with parent plant in nature is well recognized (Karuppusamy, 2009).

The basic aim of our research was to make a comparative study on the antioxidant activity and secondary metabolites concentration (flavonoids and total phenolics) of *in vivo* (different parts of mother plant) and *in vitro* (callus) explants. The callus cultures was initiated from the leaf of potted plant cultured on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with plant growth factors. In our conditions, the level of flavonoids were higher in callus, than in mother plant. Presence of rutin in callus induced *in vitro* and stem from the *in vivo* plant was validated through high performance chromatography.

From our knowldge, no reports are available on the induction of callus and determination of their antioxidant activity in *C. benedictus*.

## SELECTIVE REFERENCES

- ▶ Allan D., Bilz M., Leaman DJ., Miller RM., Timoshyna A., Window J., European Red List of Medicinal Plants. Luxembourg: Publications Office of the European Union. 2014.
- ▶ Al-Snafi A.E., 2016, The constituents and pharmacology of *Cnicus benedictus* - A review. The Pharmaceutical and Chemical Journal, 3(2): 129-135.
- ▶ Çetin B., Kurtuluş B., Akanil B. N., 2015, Effects of pPlant growth regulators on callus formation in different explant of *Calendula officinalis* L. Journal of Applied Biological Sciences 9 (3): 34-39.
- ▶ Chandur U., Shashidhar S., Chandrasekar S.B., Bhanumathy M., Midhun T., 2011, Phytochemical evaluation and anti-arthritis activity of root of *Saussure alappa*. Pharmacologia, 2: 265-267.
- ▶ Horn G., Kupfer A., Rademacher A., Kluge H., Kalbitz J., Eißner H., Dräger B., 2015, *Cnicus benedictus* as a potential low input oil crop. Eur. J. Lipid Sci. Technol.117: 561–566.
- ▶ Karuppusamy S., 2009, A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *in vitro* tissue, organ and cell cultures. Journal of Medicinal Plants Research, 3(13): 1222-1239.



# EFFECT OF GAMMA IRRADIATION ON INTRACELLULAR ROS CONCENTRATION IN *CHLORELLA SOROKINIANA*

C. Moisescu<sup>1</sup>, D.Neguș<sup>2</sup>, I.I. Ardelean<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biology Bucharest , Romanian Academy, Splaiul Independenței 296, Bucharest 060031

<sup>2</sup>Horia Hulubei National Institute of Physics and Nuclear Engineering, IRASM Radiation Processing Department, Strada Reactorului 30, Magurele -Ilfov, Romania 077125

Microalgae are microorganisms very important for fluxes of matter, energy and information on our planet Earth as well as for a plethora of biotechnological applications. In order to obtain strains with improved qualities, the scientists use several strategies such as: i) the selection of appropriate strain from naturally occurring populations; ii) the control of growth conditions for maximizing a given property; iii) the induction of genetic diversity by different methods and iv) the challenging of microbial culture by different methods. In this paper, we present our original results concerning the use of acute gamma irradiation (0.9 Gy/s) to challenge the cells of *Chlorella sorokiniana* which show increased intracellular reactive oxygen species upon irradiation (other changes NOT presented in this paper). As compared with the control, the cells irradiated with 10 Gy, 50 Gy, 100 Gy exhibit a 50 % increase in intracellular ROS. These results are discussed in the context of deeper understanding of the interaction between microalgal cells and gamma radiation.

**Aknowledgements:** This work is supported by the Project “Utilizarea iradierii Gamma in procese biotehnologice cu aplicatii in bioeconomie” (Acronim: BIO-GAMMA). PN-III-P1-1.2-PCCDI2017-0323

# THE ROLE OF MICROORGANISMS AND INVERTEBRATES IN THE TROPHIC NETWORK OF INDUSTRIAL POLLUTANTS ECOSYSTEMS FROM OLTENIA

*Carmen Mădălina Cismașiu<sup>1</sup>, Olivia Cioboiu<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Institute of Biology Bucharest, Romanian Academy, Department of Microbiology,  
e-mail: carmen.cismașiu@ibiol.ro,

<sup>2</sup>The Department of Natural Sciences, the Museum of Oltenia, Craiova, e-mail: oliviacioboiu@gmail.com

The natural aquatic environments are the premises of various physico-chemical processes that influence the synthesis and degradation metabolism of microorganisms. In turn, they have a considerable influence on invertebrate populations, plants, and on the abiotic environment in question. The role of microorganisms is particularly complex.

Microorganisms perform a series of metabolic reactions that alter the pH values and other essential conditions for life in different ecological areas of the aquatic environments. They decompose the hardly degradable substances and reintroduce substances inaccessible to other categories of organisms into the trophic network. The recycling of organic nutrients in the ecosystem is due to the ability of bacteria to efficiently incorporate nutrients (in the form of biomass) in very low concentrations in the oligotrophic environments. By using a wide range of organic and inorganic matters from the soil, vegetal or animal debris, the microorganisms introduce allochthonous substances into the native trophic network, enriching with nutrients the oligotrophic system.

The amount of cellular material produced by microorganisms through the use of organic substances from dead organisms is particularly important for the flow of energy through the detritic trophic network. It can satisfy all or part of the nutritional needs of many invertebrates.

The role of microorganisms in general and bacteria in particular is very important in the ecosystem through the flow of matter and energy. Depending on their type of nutrition, the microorganisms can act as producers, primary or secondary consumers, the latter using organic matter released by the decomposition of producers.

The aquatic microbiota study investigates the presence and the quantitative distribution of microorganisms present in water and its sediments. Also, there is a particular interest in the interactions between the constituent microorganisms and their relationships with other organisms, such as invertebrates and plants. Knowing these interactions leads to the determination of the role which microorganisms play in the flow of matter and energy within the aquatic ecosystem.

Also, the invertebrates play an important role in the trophic network of industrially polluted ecosystems in the Oltenia Plain, dominated by protozoa, rotifers, copepods, cladocerans, oligochaetes, gastropods, bivalves, amphipods, odonates, chironomides. The gastropod populations are an important component of the biological production of eutrophic lake ecosystems and 37 species have been identified, including *Viviparus acerosus*, *Radix balthica*, *Physella (Costatella) acuta*, *Lym-*

*naea stagnalis*, *Planorbarius coneus*, which are characteristic of the flood plains in the Oltenia sector.

The ichthyofauna characterizes and specifies the functionality of such ecosystems which existed before the river dyke. The analyzes performed in the lake ecosystems in this sector illustrate the ability of *Radix balthica* and *Lymnaea stagnalis* species to accumulate metal ions  $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  and  $Zn^{2+}$  in direct correlation with the concentration of the respective ions in the soil. Also, studies have shown the increased tolerance of these snail species to the presence of bivalent metallic ions from the industrial solid waste processing activities in the environment. These species are ecological indicators of contaminated sites in Oltenia because they signal early the occurrence of negative changes in lacustrine ecosystems.

# IN VITRO PLANT TISSUE CULTURES FOR EX SITU CONSERVATION AND BIOTECHNOLOGICAL EXPLOITATION OF THE SECONDARY METABOLITES

*Holobiuc I., Mitoi M., Maximilian C., Catană R., Helepciuc F., Cogălniceanu G.*

Institutul de Biologie București al Academiei Române, Splaiul Independenței nr. 296, sector 6, București,  
România

Our current research topics are focused on the elaboration of reliable and optimized preservation methods in Romanian threatened plant taxa and the use of *in vitro* techniques to establish callus and/or suspension cultures for the biosynthesis of useful secondary metabolites.

The use of plant biotechnologies for *ex situ* plant conservation is recommended by the European Plant Conservation Strategy (GSPC target 8), which suggest that “60% of threatened plant species should be introduced in *ex situ* collections, preferably in the country of origin” and complement the classical *ex situ* strategies (seeds collection, Botanical gardens). This approach offers cheaper and efficiently alternatives to traditional one, meantime can supply a large amount of plants whenever is needed.

*In vitro* conservation strategy involves the collecting, disease eradication and contaminants elimination, culture initiation, efficient multiplication, preservation based on different methods, plant genetic evaluation, distribution and use for different purposes.

Based on the first description of plant cell totipotency by Haberland (1902), further *in vitro* culture domain has gained more importance and utilities. In 1975 Henshaw pointed out the huge potential of tissue cultures for preservation of threatened plant species and for the industrial use of aromatic and medicinal plant species. Plant biotechnologies have to ensure the exchange of germplasm and the maintenance of genetic stability of material from collections.

Our objectives are to develop reproducible and efficient protocols for collecting, micropropagation and storage of endangered plant species for short, medium and long term. Micro-multiplication protocols through different *in vitro* developmental pathways such as somatic embryogenesis, axillary shoot proliferation, adventitious shoot regeneration have been established in several Vascular species listed in the Romanian Plant Red Book.

The most suitable explants used for *in vitro* cultures besides seeds and aseptic germinated seedlings are structures with developmental integrity (apical and axillar meristems, immature zygotic embryos). The appropriate developmental ways are direct morphogenesis and somatic embryogenesis.

In the collection of our laboratory are maintained cultures of different threatened taxa as: *Dianthus nardiformis*, *D. callizonus*, *Moehringia jankae*, *Silene dinarica*, *Lychnis nivalis*, for which short, medium and even long- term preservation methods were established; also *Arnica montana*, *Leontopodium alpinum*, *Convolvulus persicus* and *Crambe maritima* were studied concerning the optimization of micropropagation and

short-term preservation, special attention being paid to somatic embryogenesis for supplying plant material for conservation procedures.

Besides slow growth methods as a mean to maintain plant material into active collection, synthetic seeds and cryostorage procedures were also tested.

Plants preserved through different procedures were analysed concerning their variability using ISSR markers to prove that the *in vitro* procedures used did not affect the genetic stability.

The analysis of individuals variability from the natural populations of the species subjected to *ex situ* preservation is another topic of our activity. In some species as *Centaurea pontica*, *Convolvulus persicus* and *Crambe maritima* studies concerning intra-population variability using different methods were done or are in progress.

The second main topic of our team deals with the establishment of stable callus cultures for different taxa to provide significant secondary metabolites production for medicinal or cosmetically use. A new trend in medicine and in cosmetics is the use of the so-called "plant stem cells" as source of compounds which protect or rejuvenate the skin or induce benefits for human health.

Due to the fact that plants used in cosmetics have a slow growth in the traditional culture, provide seasonal harvest and show individual variation in active compounds, *in vitro* cell (callus) cultures solve these problems and can supply high production of requested compound(s) using stimulators as UV and Gamma irradiations, jasmonic acid or other stresses.

These technologies ensure the production of substances which are not available in high amount in nature or difficult to be chemical synthesized.

A large spectrum of biochemical compounds with beneficial effects for human health were already synthesized using plant stem cells, showing antioxidant properties, anti-tumoral effects, UV-protecting, counteracting skin ageing or stimulating beneficial gene overexpression involved in cell multiplication and reparatory processes. In this framework, callus cultures and their evaluation were made or are in the progress for: *Rosa. hybrida*, *Cottynus coggyria*, *Melissa officinalis*, *Fragaria x ananassa*, *Gentiana lutea*, *Gentiana punctata*, *Arnica montana*, *Leontopodium alpinum*, *Crambe maritima*.

# COLD-ACTIVE PROTEINS FROM PSYCHROPHILIC MICROORGANISMS

*Antonio Mondini, Cristina Purcarea*

Institutul de Biologie București al Academiei Române, Splaiul Independenței nr. 296, sector 6, București, România

Cold environments have an extreme climate with annual temperatures mostly below freezing. They are characterized by scarce precipitations, low water availability and high UV light exposition, all factors concurring to make these places harsh to be inhabited. Although these environments were considered for long time as not suitable for hosting any living forms (Butinar et.,al 2007), several microorganisms were found to be active in the ice and able to duplicate (Christner and others, 2003). Ice could be considered as a “frozen bank” able to store viable bacterial species. This is possible due to the ice capability of being a natural matrix for longstanding microorganisms’ preservation (Ma and others, 2000), as demonstrated by Christner and colleagues (Christner et al. 2003) who were able to cultivate bacteria isolated from a 750,000-year-old ice core found in glaciers of Western China. These extremophilic microorganisms, fully adapted to survive in cold environments, are classified in two groups considering their growth temperature tolerance, as psychrophiles, that can grow at temperatures not exceeding 20 °C, and psychrotrophs (or psychrotolerants), that are able to tolerate a wider range of temperatures between 0 °C and 30 °C (Morita, 1975). In order to survive in cold environments and keep the cellular processes active, these microorganisms had to develop adaptive strategies reorganising their molecular and physiological characteristics such as higher fluidity of cellular membranes, capacity to accumulate solutes (e.g., glycine, betaine and trehalose), expression of cold shock/antifreeze proteins, and the capability to express cold-active enzymes (Casanueva et al., 2010) adapted to catalyse enzymatic reactions with a lower free energy activation ( $\Delta G$ ). Psychrophilic bacteria contain peculiar enzymes with high stability and high catalytic activity at low temperatures (Gurung et., al 2013). Almost all chemical reactions in a living cell need enzymes and in order to live permanently in cold environments, the psychrophilic bacteria developed new adaptation features in their enzymatic pool that led to an increased structural flexibility, a reduced activation energy, and high catalytic efficiency (Siddiqui and Cavicchioli, 2006). Furthermore, these bacteria developed particular adaptive mechanisms through the expression of specific proteins known as cold-shock proteins (Csps), a molecular chaperone (GroEL, DnaK and GroES) that contributes to the correct folding of the proteins synthesized in the cell (Singh et., al 2015), and avoid the miss-folding of proteins during cold shocks (Phadtare and Inouye, 2004). Analysis of the primary structure of psychrophilic enzymes revealed conserved specific aminoacid residues for the active site and side chains, as compared to that of mesophilic bacteria counterparts (Feller and Gerday, 1997). A correct enzymatic function relies on a balance between structural stability and flexibility given by specific adjustment in amino acid residues composition (e.g. lower presence of arginine and cysteine residues) and how they interact, changing the secondary and tertiary structure. Furthermore, in comparison to mesophilic enzymes, several structural factors contribute to the enzymatic stability at low temperature such as less or reduced ion pairs, the lack of a H-bonding pattern and aromatic rings interactions, the hydrophobicity index decrease, a different

folding of the N- and C- terminal extremities that are not buried in the protein (Feller and Gerday, 1997). Moreover, a different trend in amino acid composition was found in cold-active enzymes, with lower presence of proline and arginine residues, and an increased asparagine, methionine and glycine presence as compared to mesophilic counterparts (De Maayer et., al 2014). Consequently, enzymes produced by psychrophilic microorganisms have a higher activity at low temperatures, and are characterized by a higher structural flexibility than the mesophilic homologs.

But why these bacteria can be useful for us? Cold-adapted microorganisms have been recently recognised for their huge potential for biotechnological applications (Margesin et al., 2010). During the last decades, the adaptation mechanisms of psychrophiles and psychrotolerant microbial strains gained attention especially for the new biotechnological applications. Indeed, the psychrophilic enzymes could give several economic benefits since they could catalyze reactions at low temperatures, with a final goal of energy savings during the catalytic processes. For this reason, cold-active enzymes became of interest for chemical, food, detergent, textile, paper and molecular biology industries. Unraveling the adaptive mechanisms developed by psychrophilic organisms to support their vitality in non-hospitable cold environments is one of the scientific challenges allowing to understand life under extreme conditions, and providing highly performing novel catalysts for a large variety of biotechnologies. New strategies evolved by these microorganisms to sustain life under extreme low temperatures are still to be unraveled, while the saga of psychrophilic adaptation mechanisms is continuing with new enzymes discovered day by day.

## REFERENCES

- ▶ Butinar L, Spencer-Martins I and Gunde-Cimerman N (2007) Yeasts in high Arctic glaciers: the discovery of a new habitat for eukaryotic microorganisms. *Antonie van Leeuwenhoek* 91:277–289 (doi 10.1007/s10482-006-9117-3)
- ▶ Casanueva A, Tuffin M, Cary C and Cowan DA (2010) Molecular adaptations to psychrophily: the impact of 'omic' technologies. *Trends Microbiol.* 18, 374–381
- ▶ Cavicchioli R, Charlton T, Ertan H, Mohd Omar S, Siddiqui KS and Williams TJ (2011) *Microbial Biotechnology* 4 (4), 449–460 (doi:10.1111/j.1751-7915.2011.00258.x)
- ▶ Christner BC, Mosley-Thompson E, Thompson LG and Reeve JN (2003) Bacterial recovery from ancient glacial ice. *Environ. Microbiol.* 5(5): 433-6
- ▶ De Maayer P, Anderson D, Cary G and Don A Cowan (2014) Some like it cold: understanding the survival strategies of psychrophiles EMBO reports Vol 15 No 5
- ▶ Gurung N, Ray S, Bose S and Rai V (2013) A broader view: microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. *Biomed. Res. Int.* 329-121
- ▶ Ma LJ, Rogers SO, Catranis CM (2000) Detection and characterization of ancient fungi entrapped in glacial ice. *Mycologia*, 92(2), pp. 286-295 (doi: 10.2307/3761562)
- ▶ Margesin R and Feller G (2010) Biotechnological applications of psychrophiles. *Environ Technol* 31(8-9):835-44 (doi: 10.1080/09593331003663328)
- ▶ Morita RY (1975). Psychrophilic bacteria. *Bacteriol. Rev.* 39, 144–167
- ▶ Phadtare S and Inouye M (2004) Genome wide transcriptional analysis of the cold shock response in wild-type and cold sensitive, quadruple-csp-deletion strains of *Escherichia coli*. *J. Bact.* 186: 7007-7014
- ▶ Siddiqui KS and Cavicchioli R (2006) Cold-adapted enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 75: 403-433
- ▶ Singh AK, Singh MP and Shivaji (2015) Molecular mechanisms of cold adaptation in bacteria. *Aperito J. Cell. Mol. Biol.* 1:104
- ▶ Feller G and Gerday C (1997) Psychrophilic enzymes: molecular basis of cold adaptation CMLS, *Cell. mol. life sci.* 53 830–841

# LACTOBACILLUS HELVETICUS RFF 34.9 ISOLATED FROM HOME-MADE FERMENTED MILK—CHARACTERIZATION AND EVALUATION OF THE BIO- AND NANO-TECHNOLOGICAL POTENTIAL

Iulia-Roxana Stefan, Silvia-Simona Grosu-Tudor, Roxana Cojoc, Medana Zamfir

Institutul de Biologie București al Academiei Române, Splaiul Independenței nr. 296, sector 6, București, România, e-mail: medana.zamfir@ibiol.ro

*Lactobacillus helveticus* RFF 34.9 was isolated from a Romanian home-made fermented milk. This strain has been shown to inhibit the growth of other bacteria, including other lactic acid bacteria (*Lactobacillus helveticus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. sakei*, *Enterococcus faecium*), (potential) pathogenic bacteria (*Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Staphylococcus aureus*), and a strain of *Halobacillus humanensis* isolated from the wall of Humor monastery.

The antibacterial activity has been proved to be due to the production of a bacteriocin. This compound was isolated and characterized in details. It is a high molecular mass (about 30 KDa) protein, as shown by Tricine-SDS-PAGE. Its activity is maintained in a wide pH range (between 2 and 10), but the highest activity is reached at a pH between 4 and 6. The bacteriocin is heat sensitive, its activity decreasing with over 90% after 15 min of heating to 60°C. Proteinase K completely suppressed the inhibitory activity, while pepsin and tripsin had no effect. Bacteriocin production was increased when the producing strain was cultivated under stress conditions. The highest production and inhibitory activity was detected in the presence of 2% NaCl, and in the presence of both 2% NaCl and 0.1% bile salts. The PCR amplification with specific primers gave an amplification product close to that for helveticin J.

*Lb. helveticus* RFF 34.9 has also been shown to produce S-layer proteins. The biosynthesis was followed up during 24h of incubation and it was shown that it reaches a maximum after 6-8 h from the start of incubation. The molecular mass of these proteins, determined by SDS-PAGE, is about 47 KDa. S-layer production was enhanced under some stress conditions, such as low initial pH of the medium, or the presence of 2% NaCl or 0.1% bile salts. PCR amplification with specific primers, resulted in an amplification product specific for *slpA* gene.

As a conclusion, *Lb. helveticus* RFF 34.9 has a great potential for use in bio- and nano-technologies, due to its special capacity of producing both bacteriocins and S-layer proteins.



# DEPARTAMENTUL DE MICROBIOLOGIE



## PREZENTARE GENERALĂ

Actualul Departament de Microbiologie din cadrul Institutului de Biologie București al Academiei Române își are originea în Secția de Microbiologie și Micologie înființată și condusă de către acad. Traian Săvulescu în anul 1929 în cadrul Institutului de Cercetări Agricole al României. Secția menționată, a fost transferată în anul 1960 la Centrul de Cercetări Biologice și a fost integrată în cadrul Secției de Fitopatologie și Microbiologie generală aflată sub conducerea acad. Alice Săvulescu și care cuprindea trei laboratoare: virusologie și bacteriologie conduse de către acad. Alice Săvulescu și micologie, condus de dr. Vera Bontea, în sediul din Strada Docenților, care găzduiește, în prezent, Ambasada Pakistanului.

În această formă, secția și-a urmat activitatea și în cadrul reorganizării Centrului de Cercetări Biologice sub forma Institutul de Biologie "Traian Săvulescu" al Academiei Române. Din anul 1964, secția își continuă activitatea în spațiile alocate din noua clădire inaugurată în strada Splaiul Independenței nr. 296 din București, respectiv zonele de autoclavare, camere reci, preparare materiale și depozitare de reactivi aflate la subsolul clădirii, zona cu aparatura de cercetare de tipul gaz-cromatografie și altele aflate la parterul clădirii și zona de laboratoare și birouri care ocupă peste două treimi din etajul întâi al clădirii.

După anul 1972 tematica de cercetare a fost orientată spre probleme de microbiologie aplicată, respectiv microbiologie industrială, geomicrobiologie, biodeteriorarea materialelor și inginerie genetică microbiană (fixarea azotului). În acest sens, în perioada respectivă a existat o colaborare foarte strânsă cu personalul didactic al Facultății de Biologie de la Universitatea din București, disciplina de microbiologie. În perioada 1973 – 1985 în cadrul laboratorului de microbiologie s-au dezvoltat foarte puternic domeniile microbiologiei petrolului și minereurilor, precum și cercetări de pionierat privind sursele neconvenționale de energie, bazate pe obținerea microbiană a hidrogenului molecular și pe procesele de metanogeneză bacteriană.

În strânsă legătură cu cercetarea fundamentală finanțată prin intermediul Academiei Române, în cadrul laboratorului se dezvoltă cercetări orientate tematic, bazate pe experiența specialiștilor, cercetări solicitate de institutele de cercetare aplicativă și de către ministerele de resort. Astfel de studii includ: bioremedierea mediului poluat cu hidrocarburi, compuși fenolici, metale grele și azotați; recuperarea țiteiului remanent din medii poroase; solubilizarea metalelor din minereuri sărace și concentrate; biosorbția ionilor metalici din efluenți industriali; participarea microorganismelor la unele procese ce au loc în condiții extreme și/sau ostile de mediu.

În perioada 1978 – 1990, laboratorul a dezvoltat colaborări cu echipe de cercetare din Germania, Marea Britanie, Franța, S.U.A., R.D.G. și Rusia, pe bază de Protocol interguvernamental iar după anul 1991, în baza acordurilor de schimb interacademic, aria de colaborare este lărgită cu echipe din Austria, Suedia, Israel etc. În prezent, astfel de acorduri de colaborare și proiecte internaționale se derulează în parteneriat cu echipe de cercetători din Belgia, Bulgaria, Cehia, Republica Moldova, Marea Britanie, Italia, Norvegia, Chile și Argentina.

Activitatea Departamentului de Microbiologie s-a impus în perioada de după 1990 prin proiectele de cercetare în care acesta a fost implicat (de tipul Inco-COPERNICUS; suport financiar

acordat de guvernul Italiei pentru procesele de reformă din România, burse NATO, burse post-doctorat etc.), dar și prin lucrările științifice publicate în reviste din fluxul principal de informație științifică. O lucrare de referință la nivel național realizată în cadrul departamentului în perioada 1981 – 1994 este “*Tratatul de microbiologie generală*”, în cinci volume, peste trei mii de pagini, autor fiind acad. G. Zarnea. În același context, în anul 2011, cu important suport logistic și financiar din partea departamentului a fost publicată o altă lucrare de referință, respectiv *Dicționar de microbiologie generală și biologie moleculară*, peste o mie trei sute de pagini, autori fiind acad. G. Zarnea și acad. O. Popescu. Pe de altă parte, au fost publicate lucrări științifice de referință în diferite domenii: microbiologia petrolului, cu referire la creșterea recuperării microbiene a țițeiului remanent din zăcăminte; microbiologia minereurilor, cu referire la biosolubilizarea metalelor din minereuri sărace și concentrate refractare; obținerea hidrogenului pe cale microbiană; producerea de metaboliți de tipul biopolimerilor și biosurfactanților; biodeteriorarea materialelor, a monumentelor istorice cu importanță cultural-artistică; comunități microbiene din situsuri cu condiții extreme (termofile, halofile, acidofile) sau medii poluate cu hidrocarburi, compuși fenolici, metale grele.

Rezultatele obținute în cadrul Departamentului au fost apreciate de către Academia Română prin acordarea a peste 10 premii ale Secției de științe biologice, dintre care două pentru lucrările de referință menționate anterior.

Pregătirea și perfecționarea profesională a cercetătorilor din cadrul departamentului se realizează prin participarea la conferințe și manifestări științifice internaționale de specialitate sau diferite seminarii și sesiuni științifice naționale, stagiile de schimb inter-academic, colaborările cu echipe de cercetare din alte instituții (naționale și internaționale), studiile doctorale, burse post-doctorale.

Structura de personal din cadrul departamentului a fost determinată de contextul socio-economic traversat de Institutul de Biologie în cei aproape 60 ani de activitate, în prezent echipa de cercetători fiind formată din 18 specialiști între care un membru al Academiei Române, cinci cercetători științifici gradul I, patru cercetători științifici gradul II, doi cercetători științifici gradul III, trei cercetători științifici și trei asistenți cercetare științifică. Dintre aceștia, 14 dețin titlul științific de doctor iar patru se află în diferite etape ale pregătirii doctorale. În prezent, în cadrul Departamentului își desfășoară activitatea patru coordonatori de studii doctorale: acad. Octavian Popescu, dr. Cristina Purcărea, prof. dr. Doina Codreanu-Bălcescu și prof. dr. Ioan Ardelean.

Conducerea laboratorului a fost asigurată în perioada 1929 – 1970 de către acad. Traian Săvulescu și acad. Alice Săvulescu. Din anul 1970 și până în anul 2000 aceasta a fost preluată de către dr. Ioan Lazăr, iar din 2000 până în decembrie 2009 de către dr. Lucia Dumitru. În perioada ianuarie 2010 – mai 2016, Departamentul de Microbiologie a fost condus de către acad. Octavian Popescu, iar din mai 2016 până în prezent conducerea este asigurată de dr. Mădălin Enache.



## REFERINȚE BIBLIOGRAFICE:

- ▶ Institute of Biology Bucharest, 1997. M. Falcă (Ed.), p. 33 – 36.
- ▶ M. Enache, 2011. Institutul de Biologie București, la 50 ani de activitate, *in*: Revista Academica, Ed. Academiei Române, Nr. 3; martie, Anul XXI (245), p. 58-65.
- ▶ I. Lazăr, S. Dobrotă, M. Ștefănescu, L. Săndulescu, P. Constantinescu, C. Moroșanu, N. Botea, O. Iliescu, 1991. Preliminary results of some recent MEOR field trials in Romania, *in*: Microbial enhancement of oil recovery – recent advances, E.C. Donaldson (Ed.), Elsevier Developments in Petroleum Science, 31, p. 365-386.
- ▶ [https://ro.wikipedia.org/wiki/Traian\\_S%C4%83vulescu](https://ro.wikipedia.org/wiki/Traian_S%C4%83vulescu)
- ▶ [http://enciclopediaromaniei.ro/wiki/Alice\\_S%C4%83vulescu](http://enciclopediaromaniei.ro/wiki/Alice_S%C4%83vulescu)
- ▶ <http://www.ibiol.ro/istoric.htm>



## MĂDĂLIN IANCU ENACHE

Șef Departament Microbiologie - Cercetător științific gr. I, Institutul de Biologie București al Academiei Române

Absolvent al Facultății de Chimie, Universitatea București, specializarea Biochimie tehnologică (1997); Master în Enzimologie Aplicată (1998); doctor în Biologie (2002); bursă postdoctorat la RIKEN, Japan Collection of Microorganisms (2004 – 2006); Expert achiziții și investiții publice (2012; 2014); Facultatea de Drept, Univ. Creștină “Dimitrie Cantemir” – dreptul mediului înconjurător (2014). Director adjunct la Institutul de Biologie București în perioada 2006 – 2008, Director general al IBB în perioada 2008 – 2012, membru al Consiliilor de Administrație (2006 – 2012; 2016 - prezent) și Științific (2006 – prezent) ale IBB.

**Experiență profesională:** coordonator a 13 și participant în 8 proiecte de cercetare naționale, autor principal și coautor la 59 articole publicate în reviste din străinătate și din țară, editor la 10 cărți publicate în Editura Academiei Române și la alte edituri din țară, autor/coautor la 13 capitole în cărți publicate în străinătate și în țară, peste 80 de postere prezentate la conferințe științifice internaționale și naționale, organizator/coordonator a peste 20 conferințe/acțiuni/manifestări științifice cu caracter internațional și național, membru în 6 comisii de susținere a tezelor de doctorat (5 în România și 1 în Spania).

**Competențe în:** tehnici de microbiologie generală, ecologia microorganismelor, microscopie, biochimie, biologie moleculară, legislație de mediu

**Direcții de cercetare:** microbiologie generală, diversitate și filogenie microorganisme halofile, ecologia arheelor halofile extreme, enzimologia microorganismelor, nanobiotehnologii



## CRISTINA PURCĂREA

Cercetător științific gradul I, Institutul de Biologie București al Academiei Române,  
Departamentul de Microbiologie

Absolventă a Facultății de Chimie, Institutul Politehnic București, specializarea Biochimie (1988); *Diplôme d'Etude Approfondie* în Enzimologie, Universitatea Paris XI, Franța (1991); Doctorat în Enzimologie, Universitatea Paris XI (1995); Cercetător Științific, Institutul de Biologie București (1990-1993); Postdoctorand, Universitatea Vije, Bruxelles, Belgia (1995 – 1996); Cercetător asociat, Wayne State University School of Medicine, Detroit, USA (1997-2001 & 2003-2005); Manager de Proiect, Avidis SA, Clermont-Ferrand, Franța (2001-2002); Cercetător științific gradul III, Institutul de Biologie și patologie celulară “Nicolae Simionescu”, București (2005-2007); Cercetător științific gradul I, Institutul de Biologie București (2007-prezent)

**Experiență profesională:** Autor principal a 37 publicații în jurnale ISI și 5 capitole de carte, factor de impact cumulat IF 65.86. 414 citări, Indice Hirsch 13, Participări la conferințe cu prezentări orale (34) și postere (43); Coordonator, partener și membru în 21 de proiecte naționale și internaționale de cercetare; 28 de ani de experiență de cercetare dintre care 7 ani în Franța, 7 ani în USA și 1 an în Belgia. Premiu de Excelență al Guvernului României pentru Expediția Științifică Antarctica ROICE 2015 (2015); Premiul Academiei Române “Emil Racovita” (2014); Secretar Științific al Comisiei Naționale de Cercetări Antarctice (2015-2016); Membru CNATDCU Biologie și Biochimie (2011-2012); Membru în comisii ale tezelor de doctorat și abilitare; Membru în Comitetul de conducere al grupului “*Linking Antarctic Peninsula Science (LAPES)*” – Scientific Committee on Antarctic Research (SCAR); Lider științific în Expedițiile Antarctice ROICE 2015 și ROICE 2016.

**Competențe în:** tehnici de biochimie, microbiologie, biologie moleculară, cristalografie de raze X

**Dirjecții de cercetare:** microorganisme extremofile, diversitatea și filogenia bacteriilor și archaeelor hipertermofile și criofile din medii glaciare Antarctice, Arctice și alpine, caracterizarea structurală și funcțională a extremozimelor din metabolismul pirimidinic, mecanisme de adaptare moleculară la temperaturi extreme, microbiota archaeana umană, utilizarea extremozimelor în nanotehnologii și biosensing, microbiologie criminalistică



## MEDANA ZAMFIR

Cercetător științific gr. I, Departamentul de Microbiologie, Institutul de Biologie București al Academiei Române

Absolvent al Facultății de Chimie, Univ. București, specializarea Biochimie tehnologică (1994); Master în Enzimologie Aplicată (1995); doctor în Biologie, distincția *Magna cum laude* (2003); Premiul Academiei Române „Emil Racoviță” pentru un set de lucrări publicate în anul 2004. Secretar științific al Institutului de Biologie București în perioada 2006 – 2016, membru al Consiliilor de Administrație (2006 – 2016) și Științific (2006 – prezent) ale IBB.

**Experiență profesională:** coordonator a 12 și participant în echipa a 5 proiecte de cercetare, naționale și internaționale; autor principal și coautor la 58 articole publicate în reviste din străinătate și din țară; prezentări orale și postere la conferințe științifice internaționale și naționale; co-organizator al unor manifestări științifice cu caracter internațional și național; membru în 9 comisii de susținere a tezelor de doctorat; evaluator articole în reviste cotate ISI și al unor propuneri de proiecte în diferite programe ale Planului Național de Cercetare; membru al CNATDCU, Comisia de Biologie și Biochimie.

**Competențe în:** tehnici de microbiologie generală, microscopie, biochimie, biologie moleculară.

**Direcții de cercetare:** studiul bacteriilor lactice izolate din alimente fermentate; izolarea, purificarea și caracterizarea unor metaboliți cu aplicații bio- și nanotehnologice sintetizați de aceste bacterii (bacteriocine, exopolizaharide, strat S); studiul potențialului pro- și prebiotic al bacteriilor lactice; studiul modificărilor celulare și moleculare induse la bacteriile lactice în condiții de stres.



## MUGUR CRISTIAN ȘTEFĂNESCU

Cercetător științific gradul II în cadrul Departamentului de Microbiologie al Institutului de Biologie București.

Absolvent al Liceului “Gheorghe Lazăr” din București, promoția 1974.

Licențiat al Facultății de Biologie, Universitatea București, promoția 1980.

În anul 2000 mi s-a conferit titlului de Doctor în Biologie prin susținerea Tezei de doctorat intitulată: „*Mecanismele eliberării țigieiului remanent din medii poroase sub acțiunea bacteriilor*“, conducător științific Prof. asoc., CS I, Dr. Ioan Lazăr.

Cu începere din anul 1985 și până în prezent am desfășurat activitate de cercetare științifică în cadrul Centrului de Microbiologie al Institutului de Biologie al Academiei Române, ocupând pe rând funcțiile de biolog (1985-1991), biolog principal (1991-1992), cercetător științific (1992-1999), cercetător principal gradul III (1999-2007), iar din anul 2007 până în prezent, cercetător științific gradul II.

**Competențe în:** microbiologie și ecologie microbiană, metode taxonomice de identificare bacteriană, tehnologii microbiene de remediere a mediilor contaminate, studiul biologiei microorganismelor producătoare de substanțe biologic active (antibiotice, enzime, substanțe tensioactive).

### **Valorificarea rezultatelor cercetării**

Am participat, în calitate de coordonator sau colaborator, la elaborarea a peste 40 de granturi/contracte/proiecte de excelență, naționale și internaționale.

Sunt autor și coautor a cca. 150 de lucrări științifice, capitole de carte și volume de specialitate, publicate în țară și în străinătate, pentru care am totalizat 200 de citări.

Am participat la peste 100 de manifestări științifice naționale și internaționale.

Dețin calitatea de coautor a două brevete de invenție și 3 certificate de inovație, cât și 2 medalii de bronz și una de aur la Saloane internaționale de Inventică.





## MIHAELA MARILENA STANCU

Cercetător științific gr. II, Institutul de Biologie București al Academiei Române

Absolventă a Facultății de Biologie, Universitatea București, specializarea Biologie medicală (1996); doctor în Biologie (2005); bursă FEBS, CSIC-Estacion Experimental del Zaidin, Granada, Spania (aprilie-iunie 2005); bursă EMBO University of Napoles Federico II, Italia (septembrie-decembrie 2006); stagiul de cercetare științifică în cadrul Acordului de colaborare dintre Academia Română și Real Acadèmia de Doctors, University of Barcelona, Spania (iulie 2007, septembrie 2009); bursă CAREX summer school, European Commission FP7 Coordination Action, Pieve Tesino, Italia (iunie-iulie 2010).

**Experiență profesională:** coordonator a 8 și participant la 21 proiecte de cercetare naționale, autor principal și coautor la 96 articole publicate în reviste din străinătate și din țară, coautor la 1 capitol publicat în străinătate, 58 postere prezentate la conferințe științifice internaționale și naționale.

**Competențe în:** tehnici de microbiologie generală, microscopie, biologie moleculară, biochimie.

**Direcții de cercetare:** caracterizarea microbiologică a unor probe prelevate din situsuri poluate cu petrol și produse petroliere; izolarea și caracterizarea unor tulpini bacteriene hidrocarbon-oxidante; modificări induse la nivel celular și molecular de hidrocarburi la bacterii hidrocarbon-oxidante.



## GABRIELA TEODOSIU

Cercetător științific gr. II – Departamentul de Microbiologie, Institutul de Biologie București al Academiei Române.

Absolventă a Facultății de Biologie, Universitatea București, specializarea Biologie Medicală (1995); doctor în Biologie (2005); Premiul Academiei Române „Grigore Antipa” pentru un set de lucrări publicate în anul 2012. Secretar al Consiliului Științific al Institutului de Biologie București (2007 – 2017). Membru al Consiliului de Administrație al IBB (2013 – 2016). Șef adjunct al Departamentului de Microbiologie (2012 – 2016).

**Experiență profesională:** Coordonator și participant în 34 proiecte de cercetare naționale și internaționale, autor principal și coautor la 54 de articole publicate în reviste din străinătate și din țară, autor / coautor la 11 capitole în cărți publicate în țară și în străinătate; autor principal și coautor la 137 lucrări prezentate în cadrul unor conferințe și simpozioane naționale și internaționale sub formă de comunicări orale sau poster. Coautor al unui brevet de invenție privind „Procedeu microbiologic de degradare a deșeurilor de piele” (2009).

Coordonator al activității practice a unor studenți și masteranzi ai Facultăților de Biologie și Chimie, Universitatea din București, în vederea realizării lucrărilor de licență și dizertație.

**Competențe în:** tehnici de microbiologie generală, microscopie optică și electronică, biologie moleculară, spectrofotometrie de absorbție atomică, biochimie; aplicații bionanotehnologice ale microorganismelor (producere de metaboliți, bioremediere).

**Directii de cercetare:** biologia microorganismelor archeeane extrem halofile (haloarcheaa) prezente în habitate hipersaline: izolare, cultivare, caracterizare prin abordări de taxonomie polifazică, diversitate, studiul modificărilor morfologice și fiziologice induse la haloarcheaa în condiții de stres salin, aplicații în bionanotehnologii (producere de exopolizaharide, pigmenți carotenoizi, izolarea și caracterizarea stratului S, enzime; rezistență la metale grele și reducerea concentrației acestora); cercetări privind bacteriile prezente în ape uzate și diferite medii poluate cu metale grele și compuși organici, precum și rolul acestora în epurarea mediilor contaminate.



## SILVIA SIMONA GROSU-TUDOR

Cercetator științific gr. II – Departamentul de Microbiologie, Institutul de Biologie  
București al Academiei Române

Absolvent al Facultății de Chimie, Univ. București, specializarea Biochimie tehnologică (2003); Master în Enzimologie Aplicată (2005); doctor în Biologie (2009); cercetări postdoctorale în cadrul unui proiect de cercetare postdoctorală finanțat de către Unitatea Executivă pentru Finanțarea Învățământului Superior a Cercetării, Dezvoltării și Inovării - UEFISCDI (2010-2012); acordarea premiului Academiei Române “Emanoil Teodorescu” pentru un grup de 7 lucrări publicate în perioada 2011-2013 cu tema “Proprietăți funcționale ale unor bacterii lactice din alimente fermentate” (2015).

**Experiență profesională:** coordonator a 3 proiecte de cercetare naționale (proiect de cercetare pentru tineri doctoranzi – tip TD, proiect de cercetare postdoctorală – tip PD și Proiect de cercetare pentru stimularea constituirii de tinere echipe de cercetare independente – tip TE) și participant la 10 proiecte de cercetare (8 naționale și 2 internaționale), autor principal și coautor la 24 articole publicate în reviste din străinătate și din țară (14 articole au fost publicate în reviste cu factor de impact de până la 3,337), 33 de postere și 6 prezentări orale la conferințe științifice internaționale și naționale.

**Competențe în:** tehnici de microbiologie generală, microscopie, biochimie

**Direcții de cercetare:** studiul diversității bacteriilor lactice din alimente fermentate tradițional (iaurt, smântână, murături, etc.); izolarea, purificarea și caracterizarea metaboliților acestora (bacteriocine și exopolizaharide); studiul potențialului pro- și prebiotic al bacteriilor lactice; studiul modificărilor celulare și moleculare induse la bacteriile lactice în condiții de stres.



## LAVINIA IANCU

Cercetător științific gr.III, Institutul de Biologie al Academiei Române, Departamentul de Microbiologie

**Studii:** Licențiată în biologie - Facultatea de Biologie din cadrul Universității București, specializarea Biologie Generală (2008). Doctor în Biologie (2015) Academia Română și studii postdoctorale (Programul Postdoctoral Fulbright Senior, proiect finanțat de Guvernul României și al Statelor Unite ale Americii) în cadrul Universității Sam Houston State University, Huntsville, TX, U.S.A.

**Cursuri de specializare:** Curs “An Introduction to Metagenomics and Metabarcoding” - Transmitting Science, Heraklion, Grecia (2018); Curs „Inferring population history from genetic data (Bayesian clustering and Approximate Bayesian Computation)” - Muzeul Național de Istorie Naturală „Grigore Antipa” (2015); Program de mobilitate internațională “American Academy of Forensic Sciences International Educational Outreach Program” - Coreea de Sud, (2014); Workshop “Forensically important Diptera identification workshop” - Nicolaus Copernicus University, Torun, Polonia (2013); Cursuri postuniversitare aprobate de OBBCSSR - “a. Markeri tumorali; b. Biochimie clinică; c. Patologie biochimică” - Departamentul de Biochimie Institutul Clinic Fundeni, București (2009).

**Experiență profesională:** membră în echipa a 5 proiecte (3 naționale și 2 internaționale), autor principal și coautor a 20 articole publicate în reviste din țară și străinătate, 7 dintre ele cu factor de impact (2 – 4.3), autoare a unei cărți publicate în țară; 25 prezentări orale și 5 postere la manifestări științifice internaționale (U.S.A., Coreea de Sud, Polonia, Ungaria, Italia, România).

**Membru în cadrul:** The Entomological Society of America (ESA) (2018 - prezent); American Academy of Forensic Sciences (2013 - prezent); European Association for Forensic Entomology (2013 - prezent); North American Forensic Entomology Association (2009 - prezent); Romanian Forensic Association (2008 - prezent).

**Premii:** 3 premii internaționale (Fulbright Senior Award, 2018; AAFS Outstanding Early Career Achievement in Forensic Science Award, 2017; Henry C Lee scholarship Award, 2014) și 2 naționale (Diplomă de excelență, Asociația Criminaliștilor din România, 2012 și 2018).

**Competențe în:** biologie moleculară; DGGE; qPCR; taxonomie; microbiologie și entomologie criminologică.

**Directii de cercetare:** identificarea de potențiali markeri bacterieni pentru estimarea intervalului postmortem; identificarea și caracterizarea cantitativă și calitativă a speciilor de insecte necrofage și bacteriene colectate din diferite carcasse animale aflate în descompunere; analiza procesului de colonizare al cadavrelor umane dintr-un spațiu interior de către principalii colonizatori (insecte și bacterii); identificarea speciilor bacteriene din medii extreme prin tehnici de biologie moleculară.



## GEORGIANA NECULA-PETRĂREANU

Cercetător științific gr.III, Institutul de Biologie al Academiei Române, Departamentul de Microbiologie

**Studii:** Licențiată în chimie - Facultatea de Chimie din cadrul Universității București, specializarea Biochimie tehnologică (2003). Doctor în Biologie (2010) și studii postdoctorale (Programul Postdoctoral interdisciplinar "Biotehnologii celulare și moleculare cu aplicații în medicină" POSDRU/89/1.5/S/60746, proiect cofinanțat din Fondul Social European prin POSDRU 2007 – 2013) în cadrul Institutului de Biochimie al Academiei Române.

**Cursuri de specializare:** "De la Biologia Celulară și Moleculară la Medicina secolului XXI" - Institutul de Biologie și Patologie celulară Nicolae Simionescu (2005); Curs FEBS „Microarray and genosensor techniques in biomedical applications” - Institutul Purkinje, Praga, Republica Cehă (2006); E-MeP-Lab & MPSi Membrane Crystallography Course – Universitatea din Glasgow, Glasgow, Marea Britanie (2007); „Managementul Cercetării” – București – diploma de manager de proiect (2012).

**Experiența profesională:** membru în echipa a 12 proiecte (8 naționale și 4 internaționale), autor principal și coautor a 9 articole publicate în reviste din țară și străinătate, 5 dintre ele cu factor de impact (în intervalul 0.4 – 4.3), coautor a două capitole în cărți publicate în străinătate; 12 prezentări orale și 10 postere la manifestări științifice cu caracter internațional. Cadru didactic asociat la Universitatea Politehnica București, Facultatea de Inginerie Medicală (2013-2015) – curs/laborator "Testarea *in vitro* a implanturilor".

**Stagii de cercetare în străinătate:** 6 săptămâni la Institutul Marie Curie, Paris, Franța - Grant Eco-net „Biochemical and biophysical study of *Arabidopsis thaliana* centrin 2” finanțat de Ministerul afacerilor externe din Franța (iunie 2007, noiembrie 2008); 2 săptămâni (octombrie 2009) la Universitatea Christian Albrechts, Kiel, Germania în cadrul proiectului finanțat de Fundația Alexander von Humboldt nr. 3-Fokoop-DEU-1119514; o săptămână la Universitatea Oxford, Wellcome Trust Centre for Human Genetics, Oxford, Marea Britanie „P-CUBE TNA Project”, (mai 2011).

**Membru în cadrul:** Societății Române de Biochimie și Biologie Moleculară; European Federation of Biotechnology; World Directory of Crystallographers.

**Competențe în:** enzimologie; biologie moleculară; biochimie; microbiologie, FPLC, cristalografie de proteine, culturi celulare, microscopie de imunofluorescență, qPCR, testarea biomaterialelor.

**Directii de cercetare:** caracterizarea structurală și funcțională a enzimelor din microorganisme extremofile (din medii glaciare Antarctice), utilizarea extremozimelor în biotehnologie, cuantificarea microorganismelor în criminalistică.



## DOINA MARIA CÎRSTEA

Cercetător științific gr. III, Institutul de Biologie București al Academiei Române

Absolventă a Facultății de Biologie, Universitatea București, specializarea Biologie experimentală (2006); Master în Neurobiologie și Taxonomie (2008); doctor în Biologie (2013);

**Experiență profesională:** Începând cu anul 2007 și până în prezent am desfășurat activitate de cercetare științifică în cadrul Departamentului de Microbiologie al Institutului de Biologie al Academiei, acest fapt a condus la acumularea de experiență în cercetarea fundamentală și aplicativă în domeniul Microbiologiei. Experiență reflectată în peste 20 *articole* publicate în reviste de *specialitate* din străinătate și din țară, autor /coautor la 3 capitole în cărți publicate în țară și/sau străinătate

**Competențe în:** tehnici de microbiologie generală, microscopie, biologie moleculară, biochimie.

**Direcții de cercetare:** studiul diversității microorganismelor în medii poluate cu petrol și produse petroliere; izolarea și caracterizarea unor tulpini bacteriene hidrocarbon-oxidante; izolarea caracterizarea unor bioproduși bacteriene de interes biotehnologic; studiul fenomenului de biorezistență și a biofilmului bacterian.



## CRISTINA MOISESCU

Cercetător științific, Departamentul de Microbiologie, Institutul de Biologie București al Academiei Române

Absolventă a Facultății de Biologie, Universitatea București, specializarea Biologie (2003); doctor în Biologie (2011); bursă Marie Curie cu titlul: „Single-Cell Microbiology on *Magnetospirillum gryphiswaldense*”, University of Leeds, School of Earth and Environment, Leeds, UK. (februarie-mai 2007); schimb interacademic cu titlul “Prepararea și caracterizarea microorganismelor modificate magnetic și studiul bacteriilor magnetotactice”, Institute of Systems Biology and Ecology AS CR, Department of Biomagnetic Techniques, České Budějovice, Cehia (octombrie 2007); bursă Marie Curie Early-Stage Training (EST), *MIR-EST* (Mineral-fluid Interface Reactivity Early Stage Training Network (MIR-EST)); University of Leeds, School of Earth and Environment, Leeds, UK (octombrie 2008 – noiembrie 2009); bursă CAREX summer school, European Commission FP7 Coordination Action, Pieve Tesino, Italia (iunie-iulie 2010).

**Experiență profesională:** participant la 12 proiecte de cercetare naționale și internaționale, autor principal și coautor la 34 articole publicate în reviste din străinătate și din țară, coautor la 1 capitol publicat în străinătate, 27 postere și 6 comunicări orale prezentate la conferințe științifice internaționale și naționale.

**Competențe în:** tehnici de microbiologie generală, microscopie, biologie moleculară, biochimie.

**Direcții de cercetare:** studierea și caracterizarea microbiologică a bacteriilor magnetotactice; izolarea și caracterizarea unor tulpini bacteriene capabile să sintetizeze diferite tipuri de nanoparticule metalice; izolarea și caracterizarea unor tulpini bacteriene cu potențial aplicativ în epurarea apelor uzate.



## LUCIA ROXANA COJOC

Cercetător științific, Departamentul de Microbiologie, Institutul de Biologie București al Academiei Române

Cercetător științific în cadrul Departamentului de Microbiologie al Institutului de Biologie București al Academiei Române, absolventă a Facultății de Biologie din cadrul Universității “Alexandru Ioan Cuza” Iași (anul 2005), a cursurilor de Master în ”Microbiologie și Biotehnologie” din cadrul Facultății de Biologie a Universității București (2007) și a studiilor doctorale în domeniul Biologie (2017).

Participant la 18 proiecte de cercetare (granturi ale Academiei Române, proiecte PNII, CEEEX-RELANSIN, CEEEX-MATNANTECH, CEEEX-MENER), autor și coautor la 23 articole publicate în reviste naționale și internaționale, 8 capitole de carte, 27 comunicări orale și 44 postere prezentate în cadrul unor conferințe și simpozioane.

**Competențe:** microbiologie generală, biologie moleculară, tehnici de microscopie, biotehnologii microbiene

**Direcții de cercetare:** biologia bacteriilor moderat halofile din habitate hipersaline din România, bionanotehnologii

Tel.: +4021.221.92.02, Fax: +4021.221.90.71.

**e-mail:** roxana.cojoc@ibiol.ro





## ELENA-SIMONA NEAGU

**Cercetător științific** – Departamentul de Microbiologie, Institutul de Biologie  
București al Academiei Române

Absolventă a Facultății de Biologie, Universitatea din București, specializarea Biologie Generală (2006); Master în Chimie Terapeutică, Facultatea de Chimie, Universitatea din București (2009); doctorand în cadrul Școlii de Studii Avansate a Academiei Române (SCOSA-AR), domeniul Biologie.

**Experiență profesională:** participarea, ca membru în echipa de cercetare, în 12 proiecte de cercetare naționale, autor și coautor la 21 de lucrări științifice, din care 11 publicate în reviste cotate ISI Thomson Reuters, participant la diferite manifestări științifice naționale și internaționale cu 23 comunicări orale și 60 prezentări sub formă de postere, coautor la 3 capitole de carte (2 în edituri naționale, 1 în editură internațională).

**Competențe:** tehnici de microbiologie generală, biochimie, microscopie

**Direcții de cercetare:** studiul interacțiunii diferitelor tipuri de nanomateriale oxidice cu celulele bacteriene, în scopul identificării de noi materiale cu proprietăți antibacteriene; investigarea mecanismelor de acțiune a materialelor nanostructurate, cu proprietăți antibacteriene, asupra unor bacterii Gram pozitive și Gram negative; funcționalizarea nanostructurilor oxidice cu diferite enzime extracelulare sintetizate de bacterii halofile, în scopul obținerii unui sistem hibrid cu potențial aplicativ; studiul biologiei bacteriilor halofile.



## MARIAN CONSTANTIN

Cercetător științific, Institutul de Biologie București al Academiei Române

Absolvent al Facultății de Geologie și Geofizică, Universitatea din București, specializarea Geologie Universitară (2001); Master în Genetică (2007); absolvent al Facultății de Biologie, Universitatea din București, specializarea Biologie (2010); doctor în Biologie (2016); bursă postdoctorat la ICUB (2016 – 2017).

**Experiență profesională:** participant într-un proiect de monitorizare națională, într-un proiect de cercetare, autor principal la cinci articole publicate în reviste din țară și la unul publicat în reviste din străinătate, autor și editor la patru cărți publicate în țară.

**Competențe în:** biologie moleculară, cercetări în teren, utilizarea programelor de grafică, de paginare și a unor programe de bioinformatică, preluarea și procesarea computerizată a imaginilor.

**Direcții de cercetare:** angiogeneză tumorală, ecologie, botanică



## IULIA ROXANA ȘTEFAN

**Cercetător științific** – Departamentul de Microbiologie, Institutul de Biologie București al Academiei Române (2015 – prezent).

Absolventă a Facultății de Biotehnologii din cadrul Universității de Științe Agronomice și Medicină Veterinară București, profil Biotehnologii Medical – Veterinare (2013), Master în Biotehnologii Agricole (2015), doctorand în domeniul Biotehnologiei (2015 – prezent).

**Experiență profesională:** autor principal sau coautor la 8 articole publicate în reviste de specialitate internaționale, participări la 6 conferințe internaționale cu 8 postere și o prezentare orală ca autor principal sau coautor, două vizite la Universitatea Liberă din Bruxelles, Belgia în cadrul schimburilor interacademice.

**Competențe în:** biotehnologii, microbiologie, biochimie, biologie moleculară.

**Direcție de cercetare:** identificarea și studiul la nivel celular și molecular a unor structuri și metaboliți cu potențial bio(nano)tehnologic - studiul bacteriilor lactice



## ANCA IOANA LUCACI

Asistent de cercetare științifică, Institutul de Biologie București  
al Academiei Române

Absolventă al Facultății de Biologie, Univ. “ Al. I. Cuza”, Iasi, specializarea Biochimie (2005);  
Master în Genetică Moleculară (2007); doctorand în cadrul ” Școlii de Studii Avansate a Aca-  
demei Române” (2016- prezent);

**Competențe în:** tehnici de microbiologie generală, microscopie, biochimie

**Direcții de cercetare:** microbiologie generală, studiul microorganismelor halofile



## VICTORIA IOANA PĂUN

Student doctorand – Asistent de cercetare științifică, Institutul de Biologie București al Academiei Române

**Studii:** Octombrie 2015 – Iunie 2017- Master în Microbiologie aplicată și Imunologie, Universitatea din București, România.

2012 – 2015 – Diplomă de Licență – Biolog – specializarea Biochimie, Facultatea de Biologie, Universitatea din București, România.

**Experiență profesională:** Octombrie 2015 – prezent - Asistent de cercetare științifică – Laboratorul de Microbiologie Moleculară și Biochimia Extremofilelor, Departamentul de Microbiologie, Institutul de Biologie București, România.

Membru în 2 proiecte de cercetare (naționale și internaționale), 2 postere prezentate la conferințe științifice internaționale, 3 prezentări orale la conferințe și workshopuri naționale, 2 prezentări orale la conferințe internaționale.

**Competențe:** Microorganisme extremofile – enzime și tulpini bacteriene extremofile din Antarctica și din Peștera ”Ghețarul Scărișoara”. Microbiologie clasică, microbiologie moleculară, biologie moleculară, tehnici de biochimie. Cultivare pe medii specifice solide și lichide, extracții ADN, ARN, amplificări PCR, clonare de gene și expresie în *E.coli*. Pirimidin enzime biosintetice, gena 16S rRNA. Prelevare probe din țesut animal, vegetal, probe microbiologice de sol, gheață. Analiza și interpretarea rezultatelor în comparație cu literatura de specialitate. Manipularea unor aparate specifice de analiză: spectrofotometru UV-VIS, cuptor pentru mineralizarea probelor, aparat PCR, aparat de determinare electroforetică, electroforeză SDS-PAGE.

**Direcții de cercetare:** microbiologie generală, microbiologie moleculară, diversitatea și filogenia microorganismelor psihrofile, ecologia psihrofilelor, enzimologia microorganismelor, nanobiotehnologii.



## ROBERT MARIAN RUGINESCU

Asistent de cercetare științifică – Departamentul de Microbiologie, Institutul de Biologie București al Academiei Române.

Absolvent al Facultății de Biologie, Universitatea din București, specializarea Biologie (2013-2016); Master în Microbiologie aplicată și Imunologie (2016-2018); doctorand în domeniul biologie, în cadrul “Școlii de Studii Avansate a Academiei Române” (SCOSAAR) de la data de 1 Noiembrie 2018.

**Experiență profesională:** proaspăt angajat în cadrul Departamentului de Microbiologie al Institutului de Biologie București - Academia Română, mă aflu la început de drum în cariera de cercetător științific. Autor principal la 1 articol publicat într-o revistă de specialitate internațională și participant la 2 conferințe internaționale cu 3 postere.

**Competențe în:** tehnici de microbiologie, biologie moleculară, microscopie.

**Dirjecții de cercetare:** studiul diversității microorganismelor din habitate caracterizate prin condiții fizico-chimice extreme/ostile, al enzimelor sintetizate de către acestea și al eventualelor aplicații biotehnologice în care pot fi întrebuințate.



## IOAN I. ARDELEAN

**Scientific researcher degree I**, Institute of Biology Bucharest, Romanian Academy,  
Department of Microbiology

Ioan I. Ardelean has completed his PhD in 1997 at Institute of Biology Bucharest, Romanian Academy where since 2002 he is Senior Scientist 1. In 2008 he became full professor. He has published more than 22 papers in ISI quoted journal, 13 chapters in international books, 38 full papers in the proceedings of international meeting etc. His research interested focused on molecular hydrogen production by anoxygenic photosynthetic microorganisms, interrelationships between respiration and photosynthesis in cyanobacteria grown in normal conditions and at high salinities, bio-electrochemical fuel cells, magnetotactic bacteria, gold nanoparticles biosynthesis and the use of phototrophic microorganisms to clean waste waters, either domestic or resulting from recirculating aquaculture systems.



## CARMEN MĂDĂLINA CISMAȘIU

Scientific researcher degree III, Institute of Biology Bucharest, Romanian Academy,  
Department of Microbiology, E-mail: carmen.cismasiu@ibiol.ro

I attended Biological Sciences at Faculty of Biology, University from Bucharest in 1994 and I graduated the Master Studies of Science in Taxonomy since 1995. I am PhD in the field: General Microbiology and Immunology since 2004. The subject of my Ph.D. thesis is “The acidophilic microbiota in the mining effluents having acidic pH and high concentrations of metallic ions”. The main research of my field is Bioremediation of the environments contaminated with metallic ions. I worked in 1996 as a junior researcher on microbiology of acidophilic bacteria and since 2006 I have been working as scientific researcher at the Department of Microbiology of the Institute of Biology at Romanian Academy. As a researcher in my organisation, I have realized a collection of acidophilic microorganisms (sulfur and iron-oxidizing chemolithotrophic and heterotrophic). I have isolated them from acidic samples contaminated with metallic ions in order to obtain different strains that I have investigated their tolerance to different concentrations of metallic ions, actively involved in bioprocesses. The main research of my field is Bioremediation of the environments contaminated with metallic ions. Within the Department of Microbiology I have been involved in a project concerning acidophilic microbiota and their potential use in the bioremediation of environments contaminated with metallic ions. I am author and co-author of 2 books and 35 papers.



# DEPARTAMENTUL DE ECOLOGIE, TAXONOMIE ȘI CONSERVAREA NATURII



# PREZENTARE GENERALĂ

Structura actuală a Departamentului de Ecologie, Taxonomie și Conservarea Naturii din cadrul Institutului de Biologie București al Academiei Române s-a format prin unirea Laboratoarelor de Taxonomie Animală, Taxonomie Vegetală, Ecologie Terestră, Ecologie Acvatică și Conservarea Naturii (2001–2002).

La originea acestui departament au stat Colectivele de Faună și Floră ale României înființate în anul 1949, din inițiativa Academiei Republicii Populare Române. Colectivul de Faună a funcționat sub denumirea de Laboratorul de Taxonomie Animală, condus până în anul 1950 de Profesorul Constantin Motaș. Academicianul Nicolae Botnariuc (n. 1915–d. 2011) a coordonat activitatea din cadrul laboratorului până în 1970, iar în perioada 1970–1993, laboratorul a fost condus de către Dr. Petru Bănărescu (n. 1921–d. 2009), membru al Academiei Române.

Scopul principal al Colectivului de Taxonomie Animală a fost elaborarea fasciculelor din Seria *Fauna României*, preconizată a include 16 volume cu 307 fascicule, incluzând o sinteză a cercetărilor zoologice din România. De-a lungul timpului, rezultatele studiilor realizate în cadrul acestui colectiv au fost concretizate, între altele, în semnalarea a peste 500 de specii noi pentru țară și peste 450 de specii noi pentru știință.

Realizarea de referință a Colectivului de Floră a reprezentat-o editarea Seriei *Flora României* (13 volume) apărută sub coordonarea Academicianului Traian Săvulescu (n. 1889–d. 1963), considerată și în prezent una dintre cele mai mari creații științifice din biologia românească.

Departamentul de Ecologie, Taxonomie și Conservarea Naturii dispune de două herbare de valoare națională și internațională: Herbarul general BUCA (cu peste 400.000 de coli) și Herbarul C. Zahariadi, unicat la nivel mondial (cu peste 20.000 de coli). De asemenea, în micoteca (BUCM) din cadrul departamentului sunt conservate peste 135.000 de specimene. În aceste herbare sunt păstrate colecțiile I. Prodan, T. Săvulescu, I. Șerbănescu, T. Bunea, Gh. Dihoru, colecții cu valoare științifică, dar și istorică.

Echipa de personal a departamentului include în prezent 24 de cercetători cu diverse specializări, respectiv, un cercetător științific gradul I, trei cercetători științifici gradul II, opt cercetători științifici gradul III, cinci cercetători științifici și șapte asistenți de cercetare științifică. Dintre aceștia, 17 au obținut titlul științific de doctor, iar șase se află în diferite etape ale activității de pregătire a tezelor de doctorat.

Conducerea departamentului a fost asigurată pe parcursul timpului de către Dr. Marin Falcă (în perioada 2002–2005) și de Dr. Mihaela Paucă (în perioada 2005–2010). Din anul 2010 conducerea este asigurată de Dr. Sorin Ștefănuț.

Tematica de cercetare a departamentului este axată în prezent pe câteva direcții principale, și anume: evaluarea biodiversității specifice în ecosisteme naturale acvatice și terestre; evoluția ecosistemelor naturale sub influența factorilor antropici și de mediu; taxonomia și corologia speciilor de macrofungi, licheni, briofite și plante superioare din Flora României; taxonomia și corologia speciilor de animale nevertebrate și vertebrate din Fauna României; identificarea și cunoașterea habitatelor naturale și a speciilor endemice, rare și/sau periclitare de interes național și comunitar din România.

De-a lungul anilor, specialiștii din cadrul Departamentului de Ecologie, Taxonomie și Conservarea Naturii au inițiat și dezvoltat o serie de colaborări cu specialiști de la alte institute de profil din țară și străinătate (universități și institute de cercetare din Germania, Cehia, Austria, Ungaria, Bulgaria, Franța, Polonia, Italia, Marea Britanie, Slovacia, Spania, Ucraina, Republica Moldova etc.). O parte dintre aceste colaborări se derulează în baza parteneriatelor și acordurilor de schimb interacademic.

Rezultatele științifice valoroase obținute de către cercetătorii departamentului au dus la acordarea a peste 15 Premii ale Secției de Științe Biologice a Academiei Române și mai multe premii internaționale.

Pe lângă activitatea desfășurată în cadrul proiectelor de cercetare din cadrul programului *Studiul biodiversității în contextul schimbărilor climatice globale și a dezvoltării durabile*, finanțat de Academia Română, specialiștii din cadrul departamentului au fost implicați în realizarea altor programe/proiecte de cercetare cu finanțare națională (proiecte de tip prioritar AGRAL, Granturi CNCISIS, PN II, PN III etc.) și internațională (FAUNA EUROPAEA, FLORA EUROPAEA, ATLAS FLORAE EUROPAEA, LIFE NATURE, PEATRO, BIOMONRO, POS-MEDIU etc.).

Rezultatele obținute în cadrul acestor proiecte au permis publicarea unui număr semnificativ de lucrări incluse în fluxul internațional de informație științifică: articole, capitole în volume publicate în edituri internaționale (Springer-Verlag, Routledge, Schweizerbart Science Publishers) și naționale (Editura Academiei Române, Casa Cărții de Știință Cluj, Editura Universitară București, Ars Docendi).



## SORIN ȘTEFĂNUȚ

Șef Departament Ecologie, Taxonomie și Conservarea Naturii – Cercetător științific gradul I, Institutul de Biologie București al Academiei Române

Absolvent al Facultății de Biologie, Universitatea din București, secția Biologie, specializarea Biologie Vegetală (1996); Studii Aprofundate, Universitatea din București, Facultatea de Biologie, specializarea Taxonomie (1997); Doctor în Ecologie, Academia Română, Institutul de Biologie București (2006); membru al Consiliului Științific al IBB; membru al Consiliului de Administrație; șeful Departamentului de Ecologie, Taxonomie și Conservarea Naturii din anul 2010; custodele herbarului de plante superioare al Institutului de Biologie București (BUCA); webmaster al domeniului ibiol.ro.

**Experiență profesională:** autor a peste 100 de lucrări științifice, din care 29 de articole publicate în reviste cu factor de impact Web of Science, 20 de cărți publicate, 2 capitole de carte publicate în străinătate, 13 capitole de carte publicate în țară, h-Index 15 conform Web of Science; coordonator și participant la 53 de proiecte de cercetare; manager al grantului EEA “Sistem național de monitorizare pe termen lung a bioacumulării metalelor grele aeropurtate (BIOMONRO)”, susținut de Programul RO04 – ”Reducerea Substanțelor Periculoase”; manager al grantului EEA “Strategii de restaurare a ecosistemelor de turbărie degradate din România (PeatRO)”, susținut de Programul RO02 – ”Biodiversitate și servicii ale ecosistemelor”.

**Competență:** tehnici de anatomie vegetală, de conservarea a plantelor, de microscopie, de taxonomie; custode herbar; administrator rețea de calculatoare; creare aplicații software; creare pagini web; manager de proiect

**Directii de cercetare:** taxonomie vegetală, ecologie, sozologie, bioinformatică



## CRISTINA FIERA

Cercetător științific gradul II, Departamentul de Ecologie, Taxonomie și Conservarea Naturii Institutul de Biologie București al Academiei Române

Absolventă a Facultății de Biologie, Universitatea din București, specializarea Ecologie și protecția mediului (2003); Master în Ecologie sistemică și ecotehnie (2005); doctor în Biologie (2012); Premiul Academiei Române „GRIGORE ANTIPA” (2016) pentru un set de lucrări publicate în perioada 2006-2014; membră a Consiliului Științific a IBB (2013-prezent).

**Experiență profesională:** Coordonator și participant în 13 proiecte naționale și 8 internaționale; autor principal și coautor la 41 articole publicate în reviste din străinătate și din țară; prezentări orale și postere la conferințe științifice internaționale și naționale; evaluator articole în reviste cotate ISI și BDI.

**Competențe în:** taxonomie animală, ecologie, microscopie, biochimie și biologie moleculară, biogeografie

**Direcții de cercetare:** studiul nevertebratelor din sol (în special grupul Collembola) din diferite tipuri de habitate în strânsă conexiune cu factorii abiotici; taxonomia clasică a colembolilor; studiul relațiilor trofice ale comunităților de nevertebrate din sol; studiul distribuției speciilor de colembole din România și Europa; studii de monitorizare a stării funcționale a unor tipuri de ecosisteme terestre.



## SANDA MAICAN

Cercetător științific gr. II, Institutul de Biologie București al Academiei Române, Departamentul de Ecologie, Taxonomie și Conservarea Naturii

Absolventă a Facultății de Biologie, Universitatea București, profilul Biologie, specializarea Biologie medicală (1993); Doctor in Biologie (2003).

**Experiența profesională:** autor principal și coautor la 67 de lucrări științifice: articole publicate în reviste din țară și din străinătate, capitole în cărți publicate în edituri internaționale (3) și naționale (9); participarea la o serie de conferințe și simpozioane științifice naționale și internaționale; participant în peste 20 de proiecte de cercetare; membru în comisii de susținere a referatelor și a tezelor de doctorat; evaluator și membru în colectivele editoriale ale unor reviste științifice din țară (Editura Academiei Române) și din străinătate.

**Competențe în:** entomologie generală, coleopterologie.

**Direcții de cercetare:** studiul taxonomic, ecologic și zoogeografic al coleopternelor (Familii Chrysomelidae, Cerambycidae) din România; evaluarea speciilor de coleoptere de interes științific și protectiv; evaluarea statutului de conservare al speciilor de nevertebrate de interes comunitar și strategii de conservare; probleme generale de biodiversitate și protecția mediului; studii de impact asupra mediului.



## KINGA ÖLLERER

Cercetător științific gr. III, Institutul de Biologie București al Academiei Române, Departamentul de Ecologie, Taxonomie și Conservarea Naturii

Absolventă a Facultății de Biologie, Universitatea din București, specializarea Ecologie și protecția mediului (2004); Masterat în Managementul Diversității Biologice, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Suedia (2007); Masterat în Amenajarea Teritoriului și Dezvoltare Regională, Universitatea de Arhitectură și Urbanism “Ion Mincu”, București (2007); doctor în Biologie (2015). Premiul “Grigore Antipa” al Academiei Române (2012). Membră a Consiliului Științific IBB (2017–).

**Experiență profesională:** coordonator și participant în peste 20 de proiecte și programe de cercetare naționale și internaționale; autor și coautor a peste 70 de publicații și comunicări naționale și internaționale, cu peste 300 de citări independente în Web of Science; evaluator articole pentru numeroase reviste; membru al comitetului științific al mai multor conferințe internaționale.

**Competențe în:** cercetare, documentare în domeniul ecologiei și conservării naturii, activități educaționale.

**Direcții de cercetare:** ecologia vegetației, istoria peisajului, pășuni cu arbori, cartare de habitate, rolul practicilor tradiționale în creșterea și menținerea diversității biologice, gestionarea ariilor protejate.



## MINODORA MANU

Cercetător Științific gr. III, Institutul de Biologie București al Academiei Române

Absolventă a Facultății de Biologie, Universitatea București, specializarea Ecologie și Protecția Mediului (1998); Master în Ecologie Sistemică (2000); doctor în Biologie, distincția Magda cum laude (2007); Premiul Academiei Române “Emil Racoviță” în anul 2010; membru în Consiliul Științific al MAES România (Mapping and Assessment of Ecosystems and their Services) 2016-2017; membru în Consiliul Științific al Institutului de Biologie București al Academiei Române din 2017-în prezent.

**Experiența profesională:** coordonator a 4 și participant în echipa a 34 de proiecte naționale și internaționale; autor principal și coautor la 5 cărți naționale; 7 capitole de carte naționale și internaționale; 77 articole publicate în țară și străinătate, 45 prezentări orale și postere internaționale și 62 naționale; membru în 4 organizații internaționale de ecologie/acarologie; membru în 2 consilii științifice de specialitate naționale; referent științific la 7 publicații internaționale cotate ISI și 10 indexate BDI; 7 stagii de specializare în Europa.

**Competențe în:** ecologia și taxonomia acarienilor edafici (Acarî-Mesostigmata); studii de evaluare/impact asupra biodiversității; inventarierea, cartarea, monitoringul și managementul speciilor de nevertebrate Natura 2000.

**Directii de cercetare:** studiul ecologic al acarienilor edafici din ecosisteme naturale și/sau cele aflate sub impact antropic; analiza factorilor de mediu din diferite ecosisteme investigate; corelarea factorilor abiotici cu parametrii populaționali ai faunei de acarieni; studii de biodiversitate (grupe de nevertebrate de interes conservativ comunitar și național) din diferite arii protejate.





## MIHAELA CONSTANȚA ION

Cercetător științific, Departamentul de Ecologie, Taxonomie și Conservarea Naturii

Absolventă a Facultății de Biologie, Universitatea din București, specializarea Ecologie și protecția mediului (2003); Master în Inginerie medicală și clinică - Universitatea Politehnica din București; Doctorand la Facultatea de Biologie, Universitatea din București.

**Experiența profesională:** coordonator și participant în 17 proiecte de cercetare (naționale și internaționale) și studii de evaluare a impactului; Membru în echipa de management la trei proiecte finanțate internațional; Autor/coautor în 10 articole științifice apărute în reviste românești și internaționale, cotate ISI sau indexate în diferite baze de date. Coordonator la o carte publicată în țară și autor/coautor la trei capitole în cărți publicate în edituri internaționale (1) și naționale (2).

**Competențe în:** taxonomie animală, ecologie și conservarea naturii, tehnici de microscopie clasică, tehnici de analize spațiale și GIS, grafică publicitară și promovare în social media.

**Dirjecții de cercetare:** taxonomia, ecologia și biogeografia nevertebratelor (Clasa Chilopoda); studii de evaluare a stării de conservare și monitorizare a speciilor de nevertebrate protejate la nivel național și european; metodologii de restaurare a habitatelor (în special turbării) și de monitorizare a poluării cu metale grele; probleme legate de specii de nevertebrate invazive, agenți patogeni și fragmentarea antropică a habitatului.



## GABRIELA TAMÁS

**Asistent de Cercetare științifică** – Departamentul de Ecologie, Taxonomie și Conservarea Naturii, Institutul de Biologie București al Academiei Române (2017 – prezent)

Absolventă a Facultății de Biologie și Geologie, specializarea Ecologie și protecția mediului, Universitatea Babeș-Bolyai, Cluj-Napoca (anul 2013); Master în Taxonomie și biodiversitate, Facultatea de Biologie a Universității București (anul 2015).

**Competențe:** botanică, taxonomie vegetală, cercetări de teren, colectarea de material floristic și includerea acestuia în colecția Herbarului Institutului de Biologie București

**Direcții de cercetare:** cercetare în domeniul taxonomiei, corologiei speciilor de plante vasculare din România



## MIRELA MĂDĂLINA MOLDOVEANU

Cercetător științific III, Departamentul de Ecologie, Taxonomie și Conservarea Naturii

Este licențiată în Biologie a Facultății de Biologie, Universitatea din București, din anul 2005. Este Master în Științe în Microbiologie și Biotehnologie, din anul 2007 și Doctor în Ecologie/Știința Mediului al Universității din București, din anul 2012. Membru în Consiliul Științific al MAES România (Mapping and Assessment of Ecosystems and their Services) 2016-2017. Membru al Consiliului științific al IBB în perioada 2012-2017. Din iulie 2018 este membru al Comisiei de etică a IBB.

**Experiența profesională:** a coordonat de 3 proiecte de cercetare finanțate de Academia Română și a participat la peste 10 proiecte naționale și internaționale. A coordonat implementarea științifică a proiectului internațional RO-CH Joint Research Project *The impact of cyanobacterial blooms triggered by nutrient pollution on aquatic environments, in the context of climate change* (CyanoArchive) 2013-2015.

Este autor și coautor a peste 21 articole cotate ISI sau indexate în baze internaționale de date, publicate în reviste românești și străine. De asemenea este autor de capitole de carte în edituri naționale, inclusiv în Editura Academiei Române (6). A participat la numeroase evenimente științifice naționale și internaționale, cu prezentări orale sau poster, precum și la cursuri, ateliere și schimburi științifice de experiență, în țară și străinătate.

**Direcții de cercetare:** experiență în domeniul ecologiei acvatice și ecologiei urbane (cu specializare în fitoplancton și macrofite acvatice). Sistemele studiate includ zone umede, sisteme acvatice lentice și lotice, naturale, seminaturale și antropizate, ecosisteme de apă dulce și saline).

**Competențe în:** activitatea de cercetare în biologie și ecologie a sistemelor; elaborarea de rapoarte științifice, coordonarea echipei în proiecte; evaluarea și monitorizarea biodiversității; rolul biodiversității în evaluarea serviciilor ecosistemice; evaluarea stării de sănătate a ecosistemelor Deltei Dunării; studii asupra lacurilor urbane și periurbane; evaluarea gradului de poluare a apei și aerului.



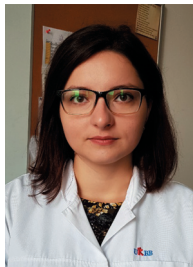
## LARISA ISABELA FLORESCU

Cercetător științific, Departamentul de Ecologie, Taxonomie și Conservarea Naturii

**Domenii de cercetare:** Zooplancton, ecosisteme acvatice, biodiversitate, dinamica comunităților planctonice, răspunsurile la nivel populațional, trăsăturile funcționale, funcționarea ecosistemelor, factori de control ai ecosistemului; Ecologia zooplanctonului, cu referire specială la comunitățile de Rotifera; Evaluarea și monitorizarea biodiversității comunităților zooplanctonice; Evaluarea stării de sănătate a ecosistemelor acvatice; Evaluarea populațiilor/speciilor zooplanctonice ca unități furnizoare de bunuri și servicii pentru sistemele socio-economice; Identificarea și conservarea habitatelor acvatice și ecotonale; calitatea aerului, poluarea cu metale grele.

**Educație:** Absolvent al Facultății de Biologie, Universitatea București (2001); Master în Biologie comparată a celulei normale și tumorale, Facultatea de Biologie, București (2002); Doctor în Biologie, Academia Română (2015).

**Experiență profesională:** Participant în 7 proiecte de cercetare naționale și 6 proiecte de cercetare internaționale; Autor/coautor în peste 29 articole științifice în reviste românești și internaționale, cotate ISI și indexate în diferite baze internaționale de date.



## IOANA CĂTĂLIA PAICA

Asistent de Cercetare Științifică – Departamentul de Ecologie, Taxonomie și Conservarea Naturii

Absolventă a Facultății de Biologie și Geologie, Universitatea Babeș-Bolyai Cluj Napoca, specializarea Biochimie (2012), Master în Biotehnologie Moleculară (2014). Doctorand al Școlii de Studii Avansate a Academiei Române (SCOSAAR).

**Experiență profesională:** participant la un proiect de cercetare națională (PNII) și 2 granturi pentru vizite de studiu la NINA - The Norwegian Institute for Nature Research și Universitatea Reykjavik. Autor și coautor a 5 lucrări științifice și 11 lucrări prezentate sub formă de postere sau comunicări orale la manifestații științifice cu caracter național sau internațional.

**Competențe în:** biologie moleculară, biochimie, tehnici de microscopie optică.

**Direcții de cercetare:** genetica populațiilor, analiza diversității genetice, paleopatologie.

# DEPARTAMENTUL DE CITOBIOLOGIE VEGETALĂ ȘI ANIMALĂ



# PREZENTARE GENERALĂ

A fost creat prin fuziunea a trei laboratoare Morfogeneză și Inginerie Genetică Vegetală, Endocrinologie Comparată și Morfologie Animală sub conducerea CS I Dr. Aurelia Brezeanu.

## DINAMICA DIRECȚIILOR DE CERCETARE

Anul 1975 a marcat începutul cercetărilor de biotehnologie vegetală prin studii privind:

- morfogeneza și citodiferențierea în cadrul sistemelor *in vitro*;
- apoptoza și senescența utilizând țesuturi de tip *crown gall* infectate cu *Agrobacterium tumefaciens*;
- rolul factorilor endo- și exogeni în exprimarea potențialului androgenetic și ginogenetic în plantele haploide, cu aplicații în programele de ameliorare;
- tehnologia protoplaștilor, o activitate de pionierat în România (protoplaști microbieni și vegetali inclusiv, fuziune chimică sau electrică, regenerare, hibridizare parasexuală interspecifică);
- transgeneza.

În a doua etapă (1983-1989) a fost stabilită o rețea complexă de cooperare științifică cu alte unități de cercetare și universități, obținându-se rezultate privind multiplicarea clonală și producerea de plante libere de virusuri sau de haplozi, precum și privind variabilitatea somaclonală și selecția *in vitro* în condiții de stres.

A treia etapă (1990-1998) a fost marcată de cercetări fundamentale pe teme ca: (i) transferul de gene mediate de vectori plasmidici utilizând metode directe (electroporare sau electrotransformare) și metode indirecte (cocultivare), (ii) studiul efectului electrostimularii în sisteme *in vitro* asupra morfogenezei și citodiferențierii, (iii) studiul efectului soluțiilor hipersaline și al concentrațiilor mari de aluminiu asupra genomului vegetal, (iv) studiul proceselor celulare pe parcursul morfogenezei în sisteme *in vitro*, (v) studiul exprimării unor gene himere implicate în embriogeneza somatică sau polinică la plante cultivate *in vitro*.

A patra etapă (1998-2005) a continuat temele fundamentale de cercetare, axate pe: (i) controlul fitohormonal al dezvoltării plantelor, (ii) studii privind factorii cu potențial rol de molecule semnal (poliamine alifactice, iasmonați, curenți electrici externi) și de markeri biochimici, implicați în procesele morfogenetice în sistemele experimentale *in vitro*, și (iii) utilizarea culturilor *in vitro* pentru proliferarea și biosinteza metaboliților secundari de interes biotehnologic. În acest sens, dintr-un calus de *Vitis vinifera* a fost izolată o linie celulară stabilă, înalt proliferativă, și care manifestă o producție ridicată de compuși valoroși pentru industria farmaceutică (antociani, picnogenol și resveratrol).

Etapa actuală include mai multe direcții de cercetare, precum:

- conservarea *ex situ* a fitodiversității, în special a speciilor de plante protejate din flora României; colecțiile departamentului cuprind o varietate de taxoni, inclusiv specii de briofite, licheni, ferigi și plante superioare;
- interacțiuni plante-sisteme microbiene;
- sisteme *in vitro* pentru biosinteza de metaboliți secundari;
- sisteme *in vitro* pentru dezvoltarea de în bio-nano-produse;
- studii de genetică populațională la plante.

Echipele de cercetare din domeniul citobiologiei animale au desfășurat cercetări de endocrinologie comparată, de taxonomie a vertebratelor și nevertebratelor, precum și privind efectul unor insecticide și medicamente asupra țesuturilor animale.

Cercetătorii din cadrul departamentului au publicat 15 cărți de specialitate, numeroase capitole de carte, și aproximativ 1000 de lucrări științifice, în reviste de specialitate din țară sau din străinătate.

În cadrul departamentului au fost stabilite numeroase colaborări științifice cu parteneri din universități și centre de cercetare din țară dar și din străinătate, din Republica Moldova, Ungaria, Polonia, Bulgaria, Slovacia, China, Germania, Belgia, India, Italia, Cehia, Grecia, SUA etc.

Sub conducerea științifică a dr. Aurelia Brezeanu au fost susținute peste 40 de teze de doctorat în domeniul biologiei celulare și al biotehnologiilor vegetale. Recunoașterea rezultatelor științifice se reflectă și în medaliile și premiile primite printre care Medalii de aur la Salonul Internațional al Inventicii Geneva și Premiile Academiei Române.

Departamentul a avut până în prezent trei conducători: în perioada 1975-2009 Dr. Aurelia Brezeanu, între 2009-2016 Dr. Nicolae Mirancea și din 2016 până în prezent de Dr. Anca Manole.

## REFERINȚE BIBLIOGRAFICE:



- ▶ Institute of Biology Bucharest, 1997, M. Falcă (Ed.), p.38-49.
- ▶ Aurelia Brezeanu, Gina Cogălniceanu, Theoretical and Biotechnological Approaches in the Institute of Biology Bucharest between 1975 - 2015 Based on Plant Cell and Tissue Culture Technology, *STUDIA UNIVERSITATIS BABEȘ-BOLYAI BIOLOGIA*, LXI, 1, 2016 (p. 15-17).
- ▶ <http://www.ibiol.ro/istoric.htm>





## ANCA MANOLE

Șef Departament Citobiologie Vegetală și Animală - Cercetător științific gr.II, Institutul de Biologie București al Academiei Române

Absolventă a Facultății de Biologie, Universitatea "Al I.Cuza" din Iași, promoția 1993; doctor în Biologie (2001); stagiul post-doctoral, Universitatea de Științe Agricole din Atena, Departamentul de Biotehnologie, laboratorul de Biologie moleculară (2003-2004); stagiul post-doctoral, Universitatea Kentucky, Lexington, SUA, Departamentul de Științele Plantelor și Solului, Laboratorul de Genomica Plantelor (2006); membru în Consiliul Științific al IBB din anul 2013 și în Consiliul de administrație din anul 2016.; secretar științific al IBB din anul 2016.

**Experiență profesională:** autor a 70 de lucrări științifice publicate în reviste din țară și din străinătate, autor/coautor la 4 cărți, autor/coautor a 12 capitole de carte publicate la edituri din țară și din străinătate, peste 80 de participări la manifestări științifice naționale și internaționale, coordonator/participant la 34 de proiecte de cercetare.

**Competențe:** tehnici de anatomie și embriologie vegetală, de conservare a plantelor, de microscopie, de biologie moleculară

**Direcții de cercetare:** biotehnologii și strategii de conservare a plantelor, genetica populațiilor de plante, endemismul vegetal, originea și evoluția fitotaxonilor



## RODICA DANIELA CATANĂ

Cercetător științific III, Departamentul de Citobiologie Vegetală și Animală, Institutul de Biologie București al Academiei Române

Absolvent al Facultății de Biologie, Universitatea București (2001); Master în Biologia comparată a celulei normale și tumorale, Facultatea de Biologie, București (2002); studii postuniversitare "Horticulture Genetics and Biotechnology", CIHAM Mediteranean Agronomic Institute, Crete (2004-2005), Master în Managementul proiectelor tehnice și tehnologice, Universitatea Hyperion, București (2010); Doctor în Biologie, Institutul de Biologie (2010).

**Experiența profesională:** participant la peste 15 proiecte de cercetare naționale; autor/ coautor la 24 articole științifice în reviste românești și internaționale, cotate ISI sau indexate în diferite baze de date, numeroase prezentări (poster sau comunicări orale) la diferite conferințe naționale și internaționale, coautor la 2 capitole de carte editate în Editura Academiei Române.

**Competențe în:** tehnici de culturi *in vitro* - micropropagare, conservare *ex situ*, tehnici moleculare

**Direcții de cercetare:** biotehnologii vegetale



## CARMEN MAXIMILIAN

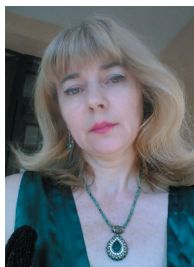
Cercetător științific III, Departamentul de Citobiologie vegetală și animală, Institutul de Biologie București, Academia Română

Absolventă a Facultății de Biologie, Universitatea București, specializarea Biochimie (1994), doctor în Biologie (2003), Universitatea București.

**Experiență profesională:** coordonator și participant la 24 de contracte de cercetare naționale, autor principal și coautor la peste 45 articole științifice publicate în reviste de specialitate, peste 60 prezentări orale și sub formă de poster la manifestări naționale și internaționale, referent științific al revistei "Journal of the Science Food and Agriculture (2008) .

**Competență:** tehnici de biochimie și biotehnologii vegetale, interacții celule vegetale-celule microbiene, analize privind determinarea biodiversității speciilor rare și periclitare

**Direcții de cercetare:** studiul interacției fungilor de micorize cu celula vegetală, determinarea unor metaboliți secundari prezenți în plante, evaluarea biodiversității, prin analize genetice și electroforetice, efectele conservării pe termen mediu și lung asupra activității unor enzime, caracterizarea la nivel celular și biochimic a proceselor de dezvoltare *in vitro*. la plante.



## IRINA HOLOBIUC

Cercetător științific III, Departamentul de Citobiologie vegetală și animală, Institutul de Biologie București, Academia Română

Absolventă a Facultății de Biologie, Universitatea din București, specializarea Genetică – Biologie Celulară (1990), Doctor în Biologie, 1999, coordonator prof.dr. Petre Raicu și dr. Aurelia Brezeanu; Titlul tezei: Cercetări privind efectul stresului salin în cultura in vitro de celule și țesuturi vegetale la două specii de plante cultivate – *Triticum aestivum* L. și *Medicago sativa* L.

**Cursuri postuniversitare:** 1996, International Symposium and Training Course in Plant Biotechnology, Gödöllo, Ungaria; Biotehnologii vegetale, tehnici de transformare genetică, exprimarea și detecția trasgenelor, manipulare ADN, Microscopie electronică de transmisie. 2001, Handling request for releases of Gmos into environment, Bucharest; Curs postuniversitar-Handling request for releases of Gmos into environment, Bucharest 2002, "Realizări și Perspective in Biologie" – "Organisme Modificate genetic", Timișoara 2–6 septembrie 2002.

**Experiența profesională IBB:** asistent de cercetare 1990–1997, cercetător științific 1997–1999, cercetător științific III 1999– prezent. Autor a 72 lucrări in extenso BDI sau ISI (din care 37 ca prim autor), 40 de participări cu postere sau prezentări orale la simpozioane naționale și internaționale (17). Implicare în 21 de proiecte (în calitate de colaborator sau coordonator din partea IBB).

**Competențe:** Genetica Plantelor, Morfogeneza Vegetală, Citologie, Citogenetică, Biotehnologii vegetale, Botanică;

Folosirea sistemului de selecție in vitro pentru inducerea toleranței la factori de stres abiotic;

Studiul efectului diferitelor forme de stres abiotic induse în cultura in vitro la plante. Conservarea ex situ pe baza utilizării biotehnologiilor vegetale a unor specii de plante superioare cu statut periclitat din Flora României, conservare pe termen scurt, mediu, tehnologia semințelor artificiale, criostocare;

Participarea ca specialist în plante vasculare în echipa proiectului POS-Mediu;

Lector la Școala de vară organizată de Institutul de Biologie Academia Română, 2002, 2004, 2005.

**Direcții de cercetare:** morfogeneza in vitro, secție in vitro la stres biotic și abiotic la speciile vegetale cultivate, transformare genetică în scop fundamental sau practic, embriogeneza somatică, elaborarea de metodologii de conservare ex situ pe baza biotehnologiilor vegetale pe termen scurt, mediu și lung.



## ELENA MONICA MITOI

Cercetător științific III, Departamentul de Citobiologie Vegetală și Animală, Institutul de Biologie București al Academiei Române.

Licențiat în biologie, specializarea Biochimie în cadrul Universității din București, Facultatea de Biologie (1997); Doctor în biologie al Universității din București, Facultatea de Biologie din 2005.

**Experiența profesională:** conducător pentru 2 granturi cercetare și coordonator partener într-un proiect de parteneriat național, responsabil la 3 contracte de cercetare cu terți și participant în echipa a peste 20 proiecte de cercetare naționale. Autor a 10 articole și coautor a 60 articole publicate în reviste naționale marea majoritate prezentate în cadrul unor conferințe sau simpozioane naționale, dar și internaționale sub formă de comunicări orale sau postere. Autor/coautor la 4 capitole de carte publicate la edituri din țară. Coautor a unui brevet de invenție.

**Competențe în:** biochimie vegetală- analize calitative și cantitative ale proteinelor, enzimelor, diverși metaboliți secundari (spectrofotometrie, electroforeză, cromatografie); biologie moleculară (tehnici PCR); biotehnologie-tehnici de cultură *in vitro* la plante; dar și de microbiologie- izolare caracterizare tulpini fungice, bacteriene; bionanotehnologii; biologie celulară-tehnici de citologie (microscopie optică și electronică TEM, SEM).

**Directii de cercetare:** inițierea, menținerea și conservarea pe termen mediu și lung prin culturi *in vitro* a unor specii rare, periclitare sau endemice din flora României; evaluarea la nivel biochimic a materialului biologic conservat pe diferite durate de timp; estimarea variabilității genetice intra și interpopulaționale a plantelor în habitatele naturale; analiza variabilității materialului conservat și regenerat prin utilizarea markerilor moleculari; selectarea și caracterizarea unor tulpini bacteriene și fungice de interes biotehnologic în protecția plantelor; bionanotehnologii de obținere a unor nanoparticule de metale nobile; producerea de metaboliți de interes economic folosind biotehnologii vegetale.



## CRISTIAN BANCIU

Cercetător științific gr. III, Departamentul de Citobiologie Vegetală și Animală, Institutul de Biologie București al Academiei Române.

Absolvent al Facultății de Biotehnologii a Universității de Științe Agronomice și Medicină Veterinară București, cu specializarea Biotehnologii Vegetale (2003); doctor în Biologie (2010); bursă postdoctorală oferită de Academia Română, Centru de Studii și Cercetări de Biodiversitate Agrosilvică "Acad. David Davidescu" al INCE (2012-2013), membru al Consiliului Științific al IBB (2017-prezent).

**Experiență profesională:** Autor principal și coautor a peste 33 lucrări științifice publicate în reviste de specialitate, coautor a 3 capitole de carte, participări la peste 30 conferințe științifice naționale și internaționale cu prezentări orale și postere. Secretar de redacție al revistei Romanian Journal of Biology - Plant Biology, editată de Editura Academiei Române (din 2016-prezent)

PREMIUL "Ioan Todor" pentru lucrarea: "Conservarea biodiversității pteridofitelor din Valea Vâlsanului", acordat de Consiliul Județean Argeș și Muzeul Județean Argeș în 2012.

Coordonator sau membru în echipa de cercetare a peste 12 proiecte și granturi de cercetare cu finanțare națională și internațională.

**Competențe:** Tehnici de culturi celulare vegetale, tehnici de microscopie optică, crioconservare, spectrometrie cu raze X, biologie moleculară, analiza biochimică a spectrelor proteinelor și izoenzimelor, microbiologie.

**Directii de cercetare:** Analiza variabilității genetice a populațiilor de plante prin metode moleculare și biochimice; conservarea in vitro și crioconservarea unor taxoni vegetali de interes biotehnologic și taxonomic; ameliorarea prin metode biotehnologice a plantelor; dozarea unor metaboliți secundari de interes farmacologic din specii de plante medicinale și cultivate; caracterizarea taxonomică a unor populații cu statut neclar cu ajutorul markerilor moleculari și barcoding; biomonitorizarea poluanților atmosferei, apelor și solului dar și a speciilor invazive și alergene; monitorizarea și reconstrucția unor habitate afectate de schimbările climatice și influențele antropice.



## ANA-MARIA MOROȘANU

**Cercetător științific**, Departamentul de Citobiologie Vegetală și Animală, Institutul de Biologie București al Academiei Române.

Absolventă a Facultății de Științe ale Naturii, Specializarea Biologie, Universitatea “Ovidius” Constanța (2007); Master “*Genetică, Microbiologie și Biotehnologie*”, Facultatea de Biologie, București (2009).

**Experiența profesională:** participant la 4 proiecte de cercetare naționale; autor/ coautor pentru 10 articole științifice (5 cotate ISI), numeroase prezentări (postere sau comunicări orale) la diferite conferințe naționale și internaționale.

### **Competențe:**

Am participat la elaborarea unor cercetări științifice fundamentale în cadrul diferitelor proiecte, privind interacțiunile celulare și moleculare de la interfața tumoră-stromă peritumorală *in situ* (epiteliomul bazocelular, carcinomul scuamocelular, carcinom mamar și adenocarcinom în timpul progresiei celulelor epiteliale transformate malign) și în modele experimentale.

**Responsabilități:** participarea la proiectele științifice prin elaborarea protocoalelor de lucru, analiza și interpretarea rezultatelor obținute, valorificarea rezultatelor prin realizarea rapoartelor și a lucrărilor științifice.

**Direcții de cercetare:** cercetarea la nivel ultrastructural a diferitelor patologii umane.



## FLORENȚA ELENA HELEPCIUC

Cercetător științific, Departamentul de Citobiologie Vegetală și Animală, Institutul de Biologie București al Academiei Române.

Absolventă a Facultății de Biotehnologii din cadrul Universității de Studii Agronomice și Medicină Veterinară București, specializarea Biotehnologii vegetale (2005); Master în Biotehnologii Agricole (2007); Doctor în biologie (2014).

**Experiența profesională:** participant în cadrul a 9 proiecte de cercetare, autor/coautor a 19 lucrări științifice publicate în reviste naționale și internaționale, coautor la un capitol de carte.

**Competențe în:** biochimie vegetală și microbiană, biologie moleculară, biotehnologii vegetale și microbiene, biologie celulară.

**Directii de cercetare:** studiul interacțiunii dintre plante, fungi și bacterii; evaluarea la nivel biochimic a materialului biologic vegetal conservat pe diferite perioade de timp; estimarea variabilității genetice intra- și interpopulaționale a plantelor din habitatele naturale; analiza variabilității materialului vegetal conservat și regenerat prin utilizarea markerilor moleculari; evidențierea prin metode biochimice a unor metaboliți de interes biotehnologic și economic.





## GABRIEL-MIHAI MARIA

Asistent de cercetare științifică - Departamentul de Citobiologie Vegetală și Animală, Institutul de Biologie București al Academiei Române

Absolvent al facultății de Biotehnologii din cadrul Universității de Științe Agronomice și Medicină Veterinară București, specializarea Biotehnologii Medical Veterinare; master în Biotehnologii în Protecția Mediului în cadrul Universității de Științe Agronomice și Medicină Veterinară București

**Experiența profesională:** participant în cadrul unui proiect de monitorizare a bioacumulării metalelor grele aeropurtate, coautor la 4 articole publicate în reviste de specialitate cotate ISI, participare la o conferință internațională cu 3 postere ca autor principal sau coautor și o prezentare orală.

**Competențe:** Tehnici de microscopie optică și electronică (SEM, TEM), tehnici de culturi celulare vegetale, spectrometrie de fluorescență cu raze X.

**Direcții de cercetare:** monitorizarea și reconstrucția unor habitate afectate de schimbările climatice și influențele antropice, biomonitorizarea poluanților atmosferici.



## MIHNEA VLADIMIRESCU

**Asistent de cercetare științifică**, Departamentul de Citobiologie Vegetală și Animală, Institutul de Biologie București al Academiei Române

Absolvent al Facultății de Biologie din cadrul Universității București, specializarea Biologie (2016); Master în Genetică Aplicată și Biotehnologie, absolvit în cadrul Facultății de Biologie a Universității București (2018).

**Experiență profesională:** Autor principal sau coautor a 3 articole prezentate la sesiuni internaționale, prezentări la conferințe naționale și participări la vizite de studiu în Islanda și Norvegia prin intermediul unor proiecte finanțate de EEA Grants.

**Competențe în:** Biologie moleculară, tehnici de genetică moleculară.

**Direcții de cercetare:** Analiza variabilității genetice intra și interpopulaționale la specii de plante de interes comunitar prin metode moleculare și biochimice, caracterizarea taxonomică a unor populații de plante cu statut neclar cu ajutorul markerilor moleculari și barcoding.





