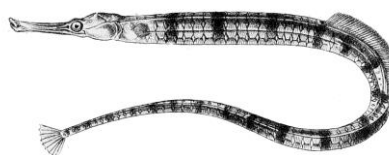




UNIVERSITATEA „OVIDIUS“ CONSTANȚA
ȘCOALA DOCTORALĂ DE ȘTIINȚE APLICATE
DOMENIU FUNDAMENTAL: BIOLOGIE

REZUMAT AL
TEZEI DE DOCTORAT
*STUDII REFERITOARE LA INFLUENȚA POLUANȚILOR
ASUPRA UNOR SPECII DE PEȘTI DIN FAMILIA
SYNGNATHIDAE*



Conducător științific:
Prof. Univ. Dr. CS I NATALIA ROȘOIU
Membru Titular al Academiei Oamenilor de Știință din România

Doctorand:
ZAHARIA (NENCIU) MAGDA-IOANA

CONSTANȚA
2016



CUPRINS

STUDII REFERITOARE LA INFLUENȚA POLUANȚILOR ASUPRA UNOR SPECII DE PEȘTI DIN FAMILIA SYNGNATHIDAE

OBIECTIVELE ȘI SCOPUL LUCRĂRII	1
PARTEA I. STADIUL CUNOAȘTERII	3
1. MAREA NEAGRĂ ȘI POLUAREA DE ORIGINE ANTROPICĂ	3
1.1. Scurt istoric al cercetărilor dedicate Mării Negre	3
1.2. Particularități ale ecosistemului Mării Negre	5
1.3. Biodiversitatea Mării Negre	7
1.4. Identificarea principalelor surse de poluare de la litoralul românesc al Mării Negre	22
1.4.1. Contaminarea cu metale grele	26
1.4.2. Contaminarea cu hidrocarburi petroliere	33
1.4.3. Contaminarea cu pesticide	40
1.5. Organismele marine - bioindicatori ai poluării	45
1.5.1. Efectele poluanților asupra speciilor marine	45
1.5.2. Bioacumularea de xenobiotice în biotă	50
PARTEA a II-a. CONTRIBUȚII PERSONALE	57
INTRODUCERE	57
2. MATERIAL ȘI METODE	58
2.1. Colectarea probelor	58
2.2. Identificarea speciilor	60
2.3. Determinarea relației lungime - greutate	61
2.4. Analize genetice pentru determinarea speciilor	63
2.5. Realizare experiment hrană	68
2.6. Determinarea concentrației de metale grele	73
2.7. Determinarea concentrației de hidrocarburi aromatice polinucleare (HAP)	75
2.8. Determinarea concentrației de pesticide organoclorurate	76
2.9. Determinarea compoziției biochimice globale	77
2.10. Prelucrare statistică	80
3. REZULTATE ȘI DISCUȚII	81
3.1. Caracterizarea speciilor din familia Syngnathidae	81
3.1.1. Descriere generală	81
3.1.2. Aspecte evolutive ale Syngnathidaelor	82
3.1.3. Acele și ațele de mare din Marea Neagră	86
3.1.4. Căluții de mare din Marea Neagră	98
3.2. Stabilirea corelației lungime - greutate la specia <i>Hippocampus guttulatus</i> de la litoralul românesc al Mării Negre	105
3.2.1. Parametrii corelației lungime - greutate la specia <i>Hippocampus guttulatus</i>	106
3.2.2. Interpretarea valorilor obținute pentru parametrii de creștere	108
3.3. Analize genetice la specia <i>Hippocampus guttulatus</i> de la litoralul românesc al Mării Negre	111
3.3.1. Cariotiparea <i>Hippocampus guttulatus</i> de la litoralul românesc al Mării Negre	111
3.3.2. Amplificarea ADNmt și construirea arborelui filogenetic	113
3.4. Determinarea efectelor diferitelor regimuri de hrană vie asupra căluțului de mare <i>Hippocampus guttulatus</i>	116
3.5. Investigarea acumulării de poluanți în țesutul global al căluțului de mare <i>Hippocampus guttulatus</i>	125
3.6. Studii privind bioacumularea de metale grele în țesutul global al căluțului de mare <i>Hippocampus guttulatus</i> și al acului de mare <i>Syngnathus acus</i> de la litoralul românesc exprimată prin Factorul de Bioconcentrare (BCF) și Factorul de Bioacumulare Biota-Sediment (BSAF)	132
3.7. Cercetări privind contaminarea cu hidrocarburi aromatice polinucleare (HAP) a Syngnathidaelor din apele litorale românești	154
CONCLUZII GENERALE	161
BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ	170
Lucrări științifice publicate în cursul stagiului de doctorat	188
A. Lucrări științifice publicate în reviste cotate ISI cu factor de impact	188
B. Lucrări științifice publicate în reviste cotate ISI fără factor de impact	189
C. Lucrări științifice publicate în reviste indexate BDI	190
D. Lucrări prezentate la manifestări științifice internaționale și publicate sub formă de rezumat	190
Participări la congrese științifice internaționale	193
Premii	194
Participări în calitate de membru în contracte de cercetare	195



OBIECTIVELE ȘI SCOPUL LUCRĂRII

Marea Neagră reprezintă un ecosistem cu particularități unice, care în ultimii șaizeci de ani a suferit transformări dramatice, atât în ceea ce privește parametrii abiotici, dar mai ales în ceea ce privește biodiversitatea. La nivel mondial și, implicit, în Marea Neagră, poluarea a devenit una dintre principalele amenințări cu care se confruntă speciile acvatice, din cauza deversărilor de origine antropică ce ajung în mediul marin. Se cunoaște deja că multe specii sunt amenințate de aceste influențe antropice, în vreme ce altele sunt insuficient studiate. De asemenea, numeroase specii sensibile la modificările de mediu sunt utilizate ca bioindicatori ai contaminării cu substanțe chimice. Având în vedere capacitatea organismelor marine de a acumula pe diverse căi substanțele chimice prezente în mediul lor de viață (apă, sedimente, hrană), utilizarea lor ca bioindicatori ai poluării este susținută de numeroase exemple. Speciile bioindicatoare sunt ideale pentru biomonitoring, iar cele mai pretabile pentru mediul marin sunt considerate a fi moluștele, în special midiile comune, care au reprezentat obiectul unor studii extinse la nivel mondial, cât și la litoralul românesc al Mării Negre (Butler, 1971; Haug, 1974; Phillips, 1980; Sericano et al., 1990; Oros et al., 2003; Oros, 2009; Oros & Gomoiu, 2012; Roșioru et al., 2012; Roșioru et al., 2014).

Însă, și alte specii care populează zonele costiere de mică adâncime, supuse influențelor antropice, ar putea fi utilizate ca bioindicatori, cu atât mai mult dacă este vorba fie de specii sensibile la parametrii de mediu (*Hippocampus guttulatus*, Cuvier 1829) (Woodall, 2012), fie de specii cu o largă distribuție (*Syngnathus* sp.). Syngnathidaele sunt pești marini, de talie mică, ce trăiesc în tufele de iarbă de mare și zonele acoperite de alge macrofite, unde forma și colorația lor îi camuflează. În Marea Neagră sunt citate în literatură mai multe specii de Syngnathidae (acele de mare, genul *Syngnathus*: *Syngnathus typhle*, *Syngnathus schmidtii*, *Syngnathus variegatus*, *Syngnathus tenuirostris* (*acus*), *Syngnathus abaster*, genus *Nerophis*: *Nerophis ophidion*; căluții de mare, genul *Hippocampus*: *Hippocampus guttulatus*, posibil *Hippocampus hippocampus* și *Hippocampus fuscus*). Tocmai această controversă privind existența sau nu a mai multor specii din genul *Hippocampus* la litoralul românesc al Mării Negre a constituit punctul de plecare al prezentei cercetări.

Scopul acestei teze este studierea amănunțită a speciilor din familia Syngnathidae prezente la litoralul românesc, lucrarea fiind structurată pe trei categorii majore de **obiective**, după cum urmează:

1) Obiective de îmbogățire a cunoștințelor privind biologia și ecologia speciilor vizate:

Caracterizarea speciilor de Syngnathidae identificate la litoralul românesc al Mării Negre; Stabilirea corelației lungime - greutate la specia *H. guttulatus*; Determinarea efectele diferitelor regimuri de hrană vie asupra căluțului de mare *H. guttulatus*, în vederea stabilirii unei diete optime pentru creșterea în captivitate.

2) Obiective de realizare de analize genetice pentru determinarea speciilor:

Cariotiparea *H. guttulatus* de la litoralul românesc al Mării Negre și amplificarea ADNmt și construirea arborelui filogenetic.

3) Obiective de cuantificare a contaminării cu substanțe de origine antropică:

Acumularea de poluanți în țesutul global al căluțului de mare *H. guttulatus*; Bioacumularea de metale grele în țesutul global al căluțului de mare *H. guttulatus* și al acului de mare *S. acus* de la litoralul românesc exprimată prin Factorul de Bioconcentrare (BCF) și Factorul de Bioacumulare Biota-Sediment (BSAF); Contaminarea cu hidrocarburi aromatice polinucleare (HAP) a Syngnathidaeelor din apele litorale românești.

Caracterul de noutate al prezentei teze rezidă tocmai în abordarea unor specii nestudiate până acum la litoralul românesc al Mării Negre, iar rezultatele obținute vor contribui cu siguranță la fundamentarea cunoștințelor privind familia Syngnathidae.

Tocmai această noutate de abordare a ridicat unele probleme în găsirea de informații pentru documentare, singurele date disponibile pentru comparare provenind din partea sud-estică a Mării Negre (Turcia: Bașusta et al., 2014; Kasapoglu & Duzgunes, 2014). Mai mult, pentru specia *H. guttulatus* nu s-au găsit date disponibile în FishBase (Froese & Pauly, 2004). Acest lucru, coroborat cu faptul că specia este clasificată de IUCN ca Data Deficient (DD/date insuficiente) (Woodall, 2012), confirmă necesitatea efectuării de cercetări viitoare, în vederea obținerii de date noi pentru Marea Neagră.

De asemenea, pe parcursul realizării cercetării s-a constatat că și pescuitul neselectiv reprezintă o amenințare pentru aceste specii la litoralul românesc, dat fiind că s-au identificat și utilizat pentru analiza contaminanților numeroase exemplare de Syngnathidae reprezentând capturi complementare de la punctele pescărești situate de-a lungul litoralului românesc. Aceste capturi complementare, care în caz contrar ar ajunge să fie uscate și comercializate ca suveniruri sau pur și simplu aruncate, pot fi utilizate pentru realizarea de cercetări ulterioare (spre exemplu, determinarea unor tendințe ale contaminării cu xenobiotice fără a colecta exemplare vii din mediul natural).

Cuvinte-cheie: contaminare, metale grele, hidrocarburi petroliere, pesticide, Syngnathidae, parametri de creștere, cariotip, ADNmt, hrană



PARTEA I. STADIUL CUNOAȘTERII

1. MAREA NEAGRĂ ȘI POLUAREA DE ORIGINE ANTROPICĂ

Ecosistemul Mării Negre, la fel ca și al altor mări europene (Marea Baltică, Marea Mediterană, Oceanul Atlantic de Nord-Est), a suferit modificări dramatice în toate subsistemele sale, imediat după 1970, ca urmare a industrializării și agriculturii intensive, marcat de fenomenul de eutrofizare (suprafertilizarea masivă a apelor marine cu compuși ai azotului și fosforului, proveniți în cea mai mare parte din agricultură, surse domestice și industriale) (Mamaev et al., 1995).

Desigur, au mai existat și alte forme de poluare, între care deversarea de ape uzate insuficient tratate (care au avut ca rezultat contaminarea microbiologică); poluarea cu petrol, provenit din deversările accidentale sau operaționale ale navelor; poluarea cu alte substanțe toxice, cum ar fi pesticidele (cele mai multe originare din agricultură și introduse în mare prin fluviile tributare); metalele grele (ex. cadmiu, cupru, crom, plumb) provenite din industrie; substanțele radioactive, produse din generatoarele nucleare sau ca urmare a accidentului de la Cernobîl din 1986 (INCDM, 2012a).

Aporturile din ce în ce mai crescute de contaminanți de origine antropică și degradarea și pierderea habitatelor au produs modificări drastice în ecosistemele acvatice, crescând, în același timp, interesul științific pentru două domenii de actualitate: pe de-o parte, acumularea și efectele toxice ale contaminanților asupra organismelor acvatice și, pe de altă parte, preluarea și acumularea acestor contaminanți de către resursele marine (în special cele destinate consumului uman, dar nu numai) (Oros, 2009).

În afara speciilor vizate de pescăriile comerciale, Marea Neagră este populată și de specii fără valoare economică pentru consumul uman, dar cu o deosebită importanță conservativă, contribuind la biodiversitatea Mării Negre, așa cum sunt peștii aparținând familiei Syngnathidae. Prezenta lucrare își propune să exploreze caracteristicile acestei familii de pești osoși de la litoralul românesc al Mării Negre (Partea a II-a, Subcapitolele 3.1-3.4, precum și influența pe care poluanții de origine antropică o au asupra lor (Partea a II-a, Subcapitolele 3.5-3.7).

Având în vedere că principala amenințare la nivel mondial pentru speciile aparținând familiei Syngnathidae este reprezentată de poluarea de origine antropică și distrugerea habitatelor specifice (Woodal, 2012) și că aceste specii populează zona costieră de mică adâncime, cea mai expusă influenței poluanților, investigarea valorilor înregistrate de metalele grele și contaminanții organici (hidrocarburi și pesticide) poate constitui o contribuție la acumularea de informații noi privind nivelurile înregistrate în speciile de organisme marine.

PARTEA II. CONTRIBUȚII PERSONALE

Speciile din familia Syngnathidae sunt expuse influenței acestor poluanți tocmai datorită faptului că populează habitate aflate în vecinătatea zonelor de mică adâncime din apropierea coastei, unde găsesc habitate propice în pajiștile de iarbă de mare și în zonele cu substrat pietros acoperite de tufe de alge macrofite, cu atât mai mult la litoralul românesc al Mării Negre, care este puternic antropizat. În aceste condiții, studiul a vizat analizarea contaminării cu trei dintre cei mai importanți contaminanți ai mediului marin - pesticide organoclorurate, hidrocarburi aromatice polinucleare și metale grele - în țesutul global al căluțului de mare/acelor de mare colectate de-a lungul litoralului românesc sudic. De asemenea, s-au evidențiat și caracteristicile speciilor studiate și s-au determinat și o serie de parametri biochimici (substanță uscată, umiditate, proteină brută, lipidă brută, substanță minerală).

În vreme ce este recunoscut și demonstrat prin analize științifice faptul că midiile sau gasteropodul *Rapana venosa* au capacitatea de a bioacumula xenobioticele, există foarte puține date referitoare la modul în care organismul acelor și căluților de mare absoarbe contaminanții, în special în zona Mării Negre.

Speciile vizate pentru analiză au fost reprezentate de acele și căluți de mare colectați din partea sudică a litoralului românesc. Toate exemplarele au fost măsurate și cântărite, determinându-se relația lungime-greutate. De asemenea, s-au utilizat numeroase exemplare de Syngnathidae din capturile complementare de la punctele pescărești, prezența acestora demonstrând faptul că și pescuitul neselectiv poate reprezenta o amenințare pentru aceste specii.

Pentru a elucida controversa referitoare la prezența unei singure specii de căluț de mare sau a mai multora, s-au efectuat și analize genetice, în vederea detectării de polimorfisme.

2. MATERIAL ȘI METODE

Colectarea probelor s-a realizat manual de către scafandri autonomi din trei stații de eșantionare în 2013 (de la sud la nord): Mangalia, Saturn-Venus și Cazino Constanța, și din două stații în 2014 (de la sud la nord): Costinești și Cazino Constanța. Pentru a reduce cât mai mult mortalitatea indusă, numărul de exemplare de ace și căluți de mare colectate din mediul natural a fost redus, însă probele au fost suficiente pentru a asigura câte trei replicale ale determinărilor realizate. S-au utilizat, de asemenea, numeroase exemplare rezultate din capturile complementare realizate la punctele pescărești situate de-a lungul litoralului românesc, precum și din traulările de sondaj efectuate în cadrul expedițiilor de pescuit științific realizate de INCDM „Grigore Antipa”, în special pentru realizarea de măsurători și stabilirea relației greutate-lungime. Această valorificare a exemplarelor din capturile complementare reprezintă o metodă non-invazivă, care nu afectează suplimentar stocurile speciilor vizate. Materialul biologic a fost congelat și, ulterior, a fost supus analizelor de laborator specifice (Nenciu-Zaharia et al., 2013; Nenciu et al., 2014a; Nenciu et al., 2014b) (Subcap. 2.1).

Pentru **identificarea speciilor** de Syngnathidae, s-au utilizat „Determinatorul principalelor specii de pești din Marea Neagră” (Radu & Radu, 2008) și „Ghidul de identificare a căluților de mare / A Guide to the Identification of Seahorses” (Lourie et al., 2004) (Subcap. 2.2). Pentru **determinarea raportului lungime-greutate**, s-a utilizat relația $W = a \cdot L^b$ (Carlander, 1977), unde: W = greutatea (masa) corpului peștelui; L = lungimea totală a peștelui; a și b = constantele de regresie (Subcap. 2.3).



În vederea realizării **analizelor genetice** (cariotip, amplificare ADN), exemplarele de *H. guttulatus* au fost colectate manual de către scafandri autonomi și transportate vii în laborator, pentru a fi supuse apoi protocolului specific de analiză. Pentru etalarea cariotipului și identificarea cromozomilor, s-a utilizat o versiune adaptată a metodei Hafez (Hafez et al., 1981) (Subcap. 2.4).

Pentru **determinarea variabilității genetice**, metoda de lucru a presupus următoarele etape:

- **recoltarea probelor de țesut** din înotătoarele *H. guttulatus* (conservate în etanol absolut până la analiză);
- **extracția ADN** din fragmente de înotătoare prin digestie cu proteinaza K și purificare cu fenol : cloroform (Taggart et al., 1992);
- **determinarea polimorfismului prin reacția PCR-RFLP** (Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism): regiunea citocromului b a fost amplificată prin reacția de polimerizare în lanț (PCR). S-au utilizat primeri conform lui Ludwig et al., 2002. Dimensiunea estimată a fragmentului amplificat care acoperă întreaga regiune a citocromului b a fost de 1,2 kb. Amplificarea ADN prin Reacția de Polimerizare în Lanț (PCR) s-a realizat cu un aparat termocicler GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems). Pentru analiza polimorfismului (RFLP), s-au folosit opt enzime de restricție, în vederea distingării polimorfismelor. Eșantioanele supuse digestiei au fost apoi separate prin electroforeză în gel de agaroză 2,5% 0,5% x soluție tampon/acid boric/acid etilendiaminotetraacetic (EDTA). ADN-ul a fost vizualizat apoi la lumină ultraviolet (lungime de undă 302 nm), după reacția cu bromură de etidiu (Onăra et al., 2012);
- **analiza secvențelor nucleotidice**: în prezentul studiu au fost incluse secvențele de nucleotide ale citocromului b ale *H. guttulatus* și ale altor specii din genul *Hippocampus* disponibile în GenBank. Pentru a verifica similitudinea cu alte secvențe ale speciilor de *Hippocampus* din baza de date GenBank, fragmentele de nucleotide ale citocromului b la *H. guttulatus* au fost analizate utilizând software-ul BioEdit. Secvențele nucleotidice au fost aliniate utilizând soft-ul Clustal W 1.4, iar arborele filogenetic a fost construit cu ajutorul soft-ului MEGA5, prin metoda UPGMA (Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic Averages) (Sneath & Sokal, 1973) și modelul lui Kimura cu 2 parametri, pe baza distanțelor genetice (Onăra et al., 2012).

Pentru realizarea experimentului privind **dieta optimă a călușilor de mare în captivitate**, exemplarele au fost colectate vii de scafandri autonomi din zona Olimp (zonă cu substrat pietros, situată în sudul litoralului românesc). Au fost transportați vii în laborator de acvacultură al Institutului Național de Cercetare-Dezvoltare Marină „Grigore Antipa” Constanța și acclimatizați timp de 24 ore într-un acvariu cu capacitate de 80 l, cu sistem de aerare. Nu s-a administrat hrană în timpul perioadei de acclimatizare (Nenciu et al., 2015). Lotul-martor a fost reprezentat de indivizi adulți de *H. guttulatus* colectați din aceeași zonă de prelevare. Indivizii au fost transportați vii la sediul INCDM și eutanasiați folosind MS 222 (tricaină metanosulfonată, concentrație 250 mg/l). Apoi, a fost determinat sexul, au fost măsurați și cântăriți, apoi congelați pentru a fi supuși ulterior analizelor pentru determinarea compoziției biochimice globale. Durata experimentului a fost de 10 zile (intervalul 15-24 iulie 2014). Regimul de iluminare a fost 16 h lumină : 8 h întuneric, similar cu regimul natural în condiții de vară la litoralul românesc. S-au montat în laborator trei acvarii cu o capacitate de 10 l fiecare (volum 1 l apă/exemplar căluș de mare), iar parametrii de temperatură și salinitate au fost identici cu cei din mediul natural (apa pompată din mare prin sistemul INCDM). Cele trei acvarii au fost aerate corespunzător și s-au instalat plante artificiale pentru a servi animalelor drept suport. Apa a fost înprospătată zilnic, pentru a realiza o densitate constantă a prăzii în acvariile experimentale. În Acvariul A au fost introduse 10 exemplare de *H. guttulatus* (6 masculi, 4 femele), hrănite exclusiv cu rotiferul *Brachionus plicatilis*. În Acvariul B au fost introduse 10 exemplare de *H. guttulatus* (3 masculi, 7 femele), hrănite exclusiv cu crustaceul *Artemia salina*, iar în Acvariul C au fost introduse tot 10 exemplare de *H. guttulatus* (5 masculi, 5 femele), care au fost hrănite cu un regim de 50% *B. plicatilis* și 50% *A. salina*. Pe toată perioada experimentală, s-a administrat hrană zilnic, la o densitate de 70 ind./ml pentru rotiferi și 20 ind./ml pentru *A. salina*. Rotiferul *B. plicatilis* a fost obținut dintr-o sușă pusă la dispoziție de Institutul Central de Cercetări Pescărești din Trabzon, Turcia (Central Fisheries Institute in Trabzon/CFRI). Ulterior, s-au realizat culturi de rotiferi în cadrul INCDM „Grigore Antipa”. Crustaceul *A. salina* a fost obținut din chisturi (ouă de iarnă) achiziționate de pe piață (JBL Artemio Pur) și apoi incubate în recipiente cilindrice cu apă marină, prevăzute cu sistem de aerare. După încheierea celor zece zile de experiment, s-a analizat compoziția biochimică globală a exemplarelor din cele trei loturi experimentale folosind metodologia descrisă în Subcapitolul 3.9 din prezenta teză (Roșioru, 2008). Rezultatele au fost interpretate din punct de vedere statistic cu ajutorul soft-ului IBM SPSS Statistics v. 20 (testul parametric One-Way Anova - Analysis of Variance) (Subcap. 2.5).

Pentru **determinarea concentrațiilor a cinci metale grele** (cupru - Cu; cadmiu - Cd; plumb - Pb; nichel - Ni; crom - Cr) atât în probele de biotă, cât și în apă și sedimente, eșantionarea, conservarea și prelucrarea preliminară a probelor, precum și metodologia de analiză au respectat metodele de referință recomandate în studiul poluării mediului marin (IAEA-MEL, 1999; Grashoff et al., 1999). Pentru a determina corelațiile ce se stabilesc între concentrațiile din biotă, apă și/sau sedimente, s-au calculat **Factorul de Bioconcentrare (BCF)** folosind următoarea formulă: $BCF = C_B/C_W$, unde C_B = substanță chimică per kg de substanță uscată din organismul analizat, iar C_W = cantitatea de substanță chimică dizolvată în apă/L, și **Factorul de Bioacumulare Biotă-Sediment**, cu următoarea formulă: $BSAF = C_B/C_S$, unde C_B = substanță chimică per kg de substanță uscată din organismul analizat, iar C_S = concentrația în sedimente (masă substanță chimică per kg de sediment uscat).

Pentru determinarea **hidrocarburilor aromatice polinucleare (HAP)** s-a utilizat o metodă dezvoltată de INCDM pe baza celor descrise în „Manualul de instruire pentru măsurarea pesticidelor organoclorurate și hidrocarburilor petroliere din probele de mediu” (IAEA-MEL, 1995).

Analiza conținutului de **poluanți organoclorurați** din apa marină, sedimente și țesut animal și mediu s-a făcut prin metoda gas-cromatografică, cu un gas-cromatograf Perkin Elmer CLARUS 500 prevăzut cu detector cu captură de electroni (Coatu et al., 2013).

În vederea stabilirii de corelații statistice între concentrațiile de contaminanți din țesutul animal și calculării unor indici (ex. BCF - Factorul de Bioconcentrare sau BSAF - Factorul de Bioacumulare Biotă-Sediment), au fost colectate probe de apă și sediment din aceleași locații de prelevare. Probele de apă au fost colectate cu batometre tip Nansen, iar sedimentele cu ajutorul bodengreiferului Van Veen (Nenciu et al., 2013; Nenciu et al., 2014a).

Pentru determinarea **compoziției biochimice globale** a organismelor marine, s-au utilizat metode standard de analiză, perfecționate în cadrul INCDM „Grigore Antipa” (Roșioru, 2008). Umiditatea și substanța uscată au fost determinate prin uscare în etuvă la 105°C timp de 24 h, iar substanța minerală s-a determinat prin ardere la 550°C timp de 6 h. Conținutul de proteine (% din



substanța uscată) al exemplarelor de *H. guttulatus* a fost analizat prin metoda Lowry (Lowry et al., 1951). Conținutul de **lipide** s-a determinat prin extracție cu eter cu aparatul Soxhlet.

Datele au fost prelucrate din punct de vedere statistic atât cu programul Microsoft Excel 2007, cât și cu IBM SPSS Statistics v. 20 (Testul T, One-Way Anova - Analysis of Variance) (Petcu, 2011) și Statistica v. 10.

3. REZULTATE ȘI DISCUȚII

3.1. Caracterizarea speciilor din familia Syngnathidae

Familia Syngnathidae face parte din Ordinul Syngnathiformes și cuprinde căluții de mare (*Hippocampus* sp.), peștii tubulari și conductă și dragonii de mare. Ca descriere generală, corpul Syngnathidaelor este alungit (fie rectiliniu - genul *Syngnathus*, fie cu capul în unghi de 90° față de trunchi - genul *Hippocampus*), acoperit cu plăci osoase regulate, metamerice, strâns îmbinate între ele, care formează un schelet extrem de rigid, plăcile de la același nivel formând câte un inel complet. Numărul inelelor corespunde în general celui al vertebrelor. Capul este alungit, botul este lung, în formă de tub, iar gura este mică, situată la capătul acestui tub. Maxilarele sunt lipsite de dinți și sudate între ele. Au o singură dorsală (a doua) bine dezvoltată, fără radii spinoase, înotătoarea anală este redusă, cea caudală este mică sau lipsește, cele pectorale sunt scurte sau lipsesc, iar înotătoarele ventrale cel mai adesea lipsesc. Deschiderea branhială este redusă la un mic orificiu situat la marginea superioară a operculului (Radu & Radu, 2008). În ceea ce privește reproducerea, ouăle sunt depuse de către femelă pe fața ventrală a masculului, fie în regiunea toracică, fie în cea caudală. La majoritatea genurilor, niște pliuri laterale ale corpului masculului învelesc regiunea incubatoare, formând o adevărată cameră/pungă incubatoare. În cursul dezvoltării, ouăle sunt hrănite de corpul tatălui, hrana și oxigenul difuzând din pereții pungii incubatoare (Radu & Radu, 2008).

Cele mai vechi fosile de Syngnathidae datează din Miocenul Mediu (Sarmațianul Inferior, Orizontul Coprolitic) și au fost descoperite în Slovenia (Zalohar et al., 2009). Procesele evolutive au condus la transformarea unui pește cu formă convențională într-unul care nu mai arată ca un pește (Zalohar et al., 2012). Una dintre caracteristicile morfologice utilizate pentru încadrarea taxonomică a Syngnathidaelor este fuziunea structurilor craniene și de hrănire.

Separația din punct de vedere al evoluției între căluții de mare și peștii tubulari, produsă la sfârșitul Oligocenului, a fost determinată utilizând un „ceas molecular” lax, stabilind datele mai vechi ca limite superioare (Teske & Beheregaray, 2009). În acea perioadă, căluții de mare au dobândit poziția verticală, o caracteristică distinctivă ce le-a oferit un potențial ridicat de camuflaj în pajiștile de iarbă de mare aflate în plină expansiune, iar apoi a intervenit specializarea sistemului lor de hrănire. Poziția verticală este singura diferență morfologică față de peștii tubulari (Zalohar & Hitij, 2012), fapt confirmat de descoperirea unei fosile de căluț de mare în dealurile de la Tunijce (Slovenia), în Orizontul Coprolitic, care a fost datată din Miocenul Mediu. Cercetătorii au sugerat că acesta este un grup intermediar între căluții de mare și peștii tubulari.

Familia Syngnathidae este una dintre cele mai mari familii ai cărei membri prezintă una dintre cele mai rare strategii reproductive din lumea animală: sarcina/gestația la masculi, definind gestația ca procesul de incubare a embrionilor ce are loc în interiorul organismului după contopirea dintre ovul și spermatozoid (Stolting & Wilson, 2007). Numeroase familii au încredințat masculilor atribuții parentale, însă Syngnathidaele au mers mai departe, masculii fiind cei care fecundază și apoi incubează ouăle pe care femela le-a depus anterior în zona/punga incubatoare.

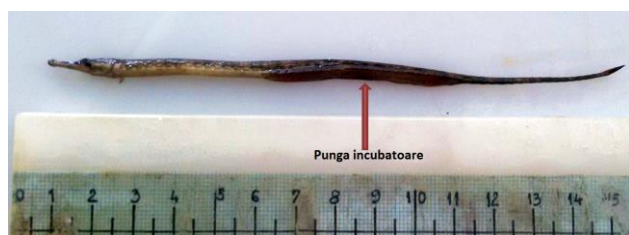


Fig. 3.1.1. *S. acus* mascul (foto original).

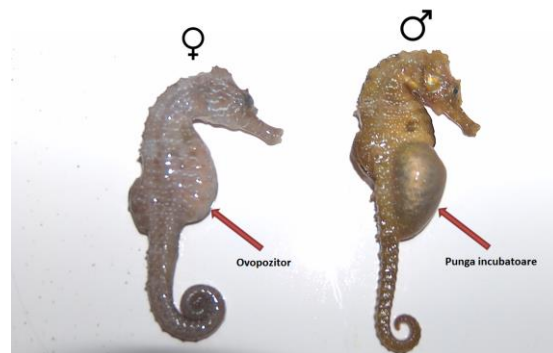


Fig. 3.1.2. *H. guttulatus* femelă (stg.) și mascul (dr.) (foto original).

Peștii tubulari ori conductă (subfamilia Syngnathinae) sunt o subfamilie de pești mici, care, alături de căluții de mare, formează familia Syngnathidae. Cei mai mulți pești tubulari sunt locuitori marini, doar câteva specii trăind în apă dulce. Ei sunt abundenți pe coastele din zonele tropicale și temperate. Cele mai multe specii de pești tubulari au, de obicei, 35-40 cm în lungime și în general trăiesc în zone adăpostite din recifele de corali sau pături de iarbă de mare. În lume sunt în jur de 200 de specii de ace de mare de forme similare, de dimensiuni și culori diferite; astfel, cea mai mare specie atinge o lungime de peste 65 centimetri, iar cea mai mică, în jur de 3 centimetri. Asemeni rudelor lor apropiate, căluții de mare, acele de mare se înmulțesc printr-un mod inedit, femelele depun ouăle într-o pungă de pe abdomenul masculului, aici ouăle incubează și masculul va elibera apoi puii, părând că naște (Kleiber et al., 2011).

În Marea Neagră sunt citate mai multe specii din subfamilia Syngnathinae (*Syngnathus typhle* Linnaeus, 1758, *Syngnathus schmidtii* Popov, 1927, *Syngnathus variegatus* Pallas, 1814, *Syngnathus tenuirostris* (acus) Rathke, 1837, *Syngnathus abaster* Risso, 1827, *Nerophis ophidion* Linnaeus, 1758) (Radu & Radu, 2008) (Fig. 3.1.1).

Căluțul de mare (Fig. 3.1.2) este una dintre cele mai carismatice specii din Marea Neagră și, cu toate că aparent nu prezintă importanță economică (nu este o specie ce poate fi utilizată ca sursă de hrană pentru populație), suscită interes pentru utilizare fie ca



bioresursă pentru medicina tradițională, fie în domeniul acvaristic, din ce în ce mai dezvoltat, fie pur și simplu este vândut ilegal ca suvenir și curiozitate. În apele românești ale Mării Negre, este semnalată de surse bibliografice (Lourie et al., 2004; Foster & Vincent, 2004) prezența a 3 specii, și anume *Hippocampus guttulatus* (Cuvier, 1829), *Hippocampus hippocampus* (Linnaeus, 1758) și *Hippocampus fuscus* (Rüppel 1838). La litoralul românesc, în lucrări mai recente, este semnalată o singură specie (Radu & Radu, 2008), deși în lucrări anterioare sunt descrise mai multe specii (Bănărescu, 1964). Cu toate acestea, numai un studiu genetic poate confirma prezența acestor trei specii diferite, demers care nu s-a realizat până în prezent la Marea Neagră. În consecință, unul dintre obiectivele acestei teze acoperă tocmai studierea din punct de vedere genetic a exemplarelor colectate din mediul natural, pentru a confirma sau infirma prezența celor trei specii sau a unor potențiale subspecii (*Subcapitolul 3.3. Analize genetice la specia Hippocampus guttulatus de la litoralul românesc al Mării Negre*). Căluții de mare populează suprafețe relativ reduse în ape costiere de mică adâncime, lagune și estuare (0,5-15 m), însă pot efectua migrații sezoniere în ape mai adânci (30 m+), aspect confirmat și de capturile accidentale înregistrate cu traulul de fund la adâncimi mari la litoralul românesc al Mării Negre (observații personale).

Pe durata celor trei ani de realizare a demersurilor de cercetare, am identificat toate speciile de ace/ațe de mare semnalate în literatura de specialitate, conform Determinatorului lui Radu & Radu, 2008. În ceea ce privește căluții de mare, toate exemplarele utilizate pentru analize, investigații, precum și pentru experimentul de stabilire a regimului optim de hrană au fost identificate vizual, potrivit Ghidului lui Lourie et al., 2004, ca aparținând speciei *H. guttulatus*.

3.2. Stabilirea corelației lungime - greutate la specia *Hippocampus guttulatus* de la litoralul românesc al Mării Negre

Pentru stabilirea acestei corelații, s-a colectat un număr total de 74 de indivizi de *H. guttulatus* (33 femele și 41 masculi). Lungimea medie pe întregul eșantion a fost de $8,03 \pm 0,91$ cm, iar greutatea medie de $2,07 \pm 0,79$ g. Referitor la diferențele dintre cele două sexe, lungimea medie a femelelor a fost de $7,79 \pm 0,90$ cm, iar a masculilor de $8,21 \pm 0,90$ cm; greutatea medie a femelelor a fost de $1,88 \pm 0,84$ g, în timp ce la masculi media greutății a fost de $2,22 \pm 0,73$ g. Din punct de vedere statistic, aceste diferențe sunt ne semnificative, având în vedere că valoarea lui $p > 0,05$ (greutate M vs. F $p = 0,0669$, lungime M vs. F $p = 0,0509$) (Fig. 3.2.1).

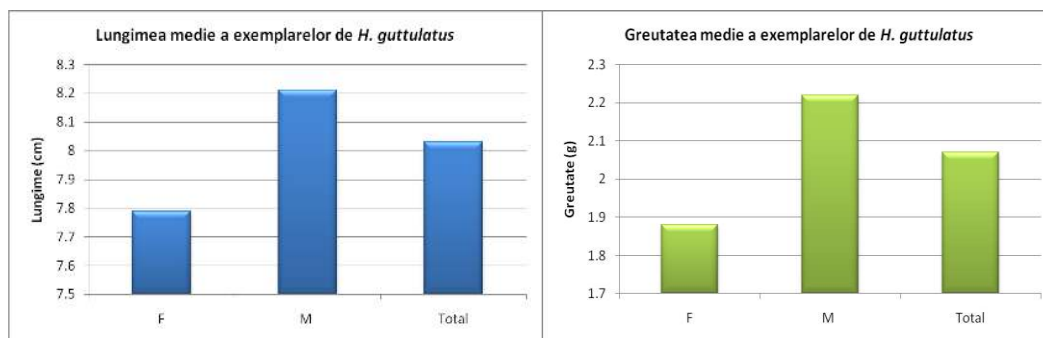


Fig. 3.2.1. Lungimea și greutatea medii ale exemplarelor de *H. guttulatus* măsurate și cântărite.

Parametrii calculați ai relației lungime - greutate și caracteristicile biometrice obținute în urma măsurătorilor pentru specia *H. guttulatus* (numărul eșantioanelor, intervalele de lungime și greutate, mediile lungimii și greutății, coeficienții a și b , coeficientul de determinare R^2) sunt detaliați în Tabelul 3.2.1. Valorile coeficientului R^2 au fost calculate după cum urmează: total $R^2 = 0,64$, masculi $R^2 = 0,55$, femele $R^2 = 0,71$, fiind comparabile cu valorile înregistrate la aceeași specie în sud-estul Mării Negre și Marea Mediterană ($p > 0,05$), dar sensibil mai mici față de valorile înregistrate la exemplarele de pe coastele Atlanticului ($p < 0,05$) (Tabel 3.2.1).

Tabel 3.2.1. Parametrii relației lungime - greutate la specia *H. guttulatus* (comparativ nord-vestul Mării Negre - România, sud-estul Mării Negre - Turcia, Marea Egee - Turcia și Oceanul Atlantic - sudul Portugaliei).

Locația	Sex	N	Interval lungime (cm)	Interval greutate (g)	a Intercepția	b Panta	R^2	Referințe
NV Mării Negre România	F	33	6,10-9,90 Medie 7,79	0,52-4,30 Medie 1,88	0,002	3,23	0,71	Rezultate proprii, 2015
	M	41	7,00-10,30 Medie 8,21	1,54-4,41 Medie 2,22	0,023	2,14	0,55	Rezultate proprii, 2015
	Total	74	6,10-10,30 Medie 8,03	0,52-4,41 Medie 2,07	0,006	2,72	0,64	Rezultate proprii, 2015
SE Mării Negre Turcia	F	59	5,70-8,60 Medie 7,15	0,85-2,60 Medie 1,72	0,008	2,64	0,89	Başusta et al., 2014
	M	79	6,30-9,00 Medie 7,65	1,06-2,90 Medie 1,98	0,004	2,97	0,92	Başusta et al., 2014
	Total	138	5,70-9,00 Medie 7,35	0,85-2,90 Medie 1,87	-	-	-	Başusta et al., 2014
SE Mării Negre Turcia	Total	272	Medie 8,31	Medie 2,14	0,007	2,64	0,69	Kasapoglu & Duzgunes, 2014
Marea Egee Turcia	Total	200	10,00-16,50 Medie 13,25	2,54-11,8 Medie 7,17	0,010	2,47	0,64	Gürkan & Taşkavak, 2007
Estuarul Arade/Atlantic S Portugaliei	Total	84	3,6-18,50 Medie 11,05	-	0,007	2,71	0,99	Veiga et al., 2009



Relațiile lungime - greutate pentru specia *H. guttulatus* sunt ilustrate atât per total, cât și diferențiat pe sexe (Fig. 3.2.2). Per total eșantion, ecuația lungime - greutate rezultată este $W = 0,00668 \cdot Lt^{2,727096}$. Pentru masculi, ecuația este $W = 0,02318 \cdot Lt^{2,14758}$, iar pentru femele $W = 0,00227 \cdot Lt^{3,23741}$.

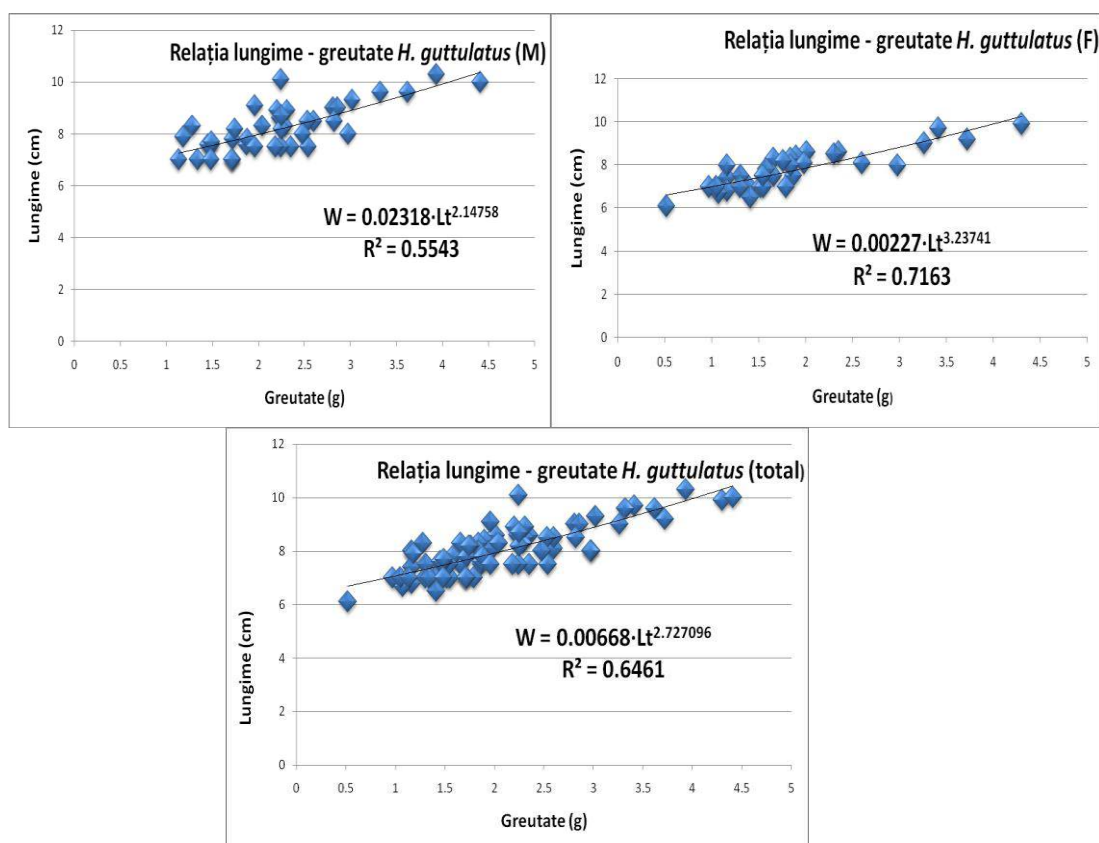


Fig. 3.2.2. Relația lungime - greutate la *H. guttulatus* (masculi, femele și total).

Realizând o comparație a valorilor lungimii medii la exemplare de *H. guttulatus* din diferite regiuni marine, se poate constata (Fig. 3.2.3) că lungimile călușilor de mare de la litoralul românesc sunt comparabile cu cele înregistrate în partea sud-estică a Mării Negre ($p > 0,05$), în vreme ce exemplarele din Marea Egee (Golful Izmir) sunt mult mai mari ($p < 0,05$), având dimensiuni comparabile cu cele de la coastele Atlanticului (Estuarul Arade, Portugalia).

În ceea ce privește greutatea exemplarelor de *H. guttulatus*, din Fig. 3.2.3 reiese foarte clar că indivizii din Marea Egee - Golful Izmir sunt mult mai grei, diferența dintre aceștia și cei din Marea Neagră (atât din nord-vest, cât și din sud-est) fiind semnificativă din punct de vedere statistic ($p < 0,05$). Se observă că exemplarele din Marea Neagră, indiferent de zona de colectare, înregistrează greutăți similare ($p > 0,05$).

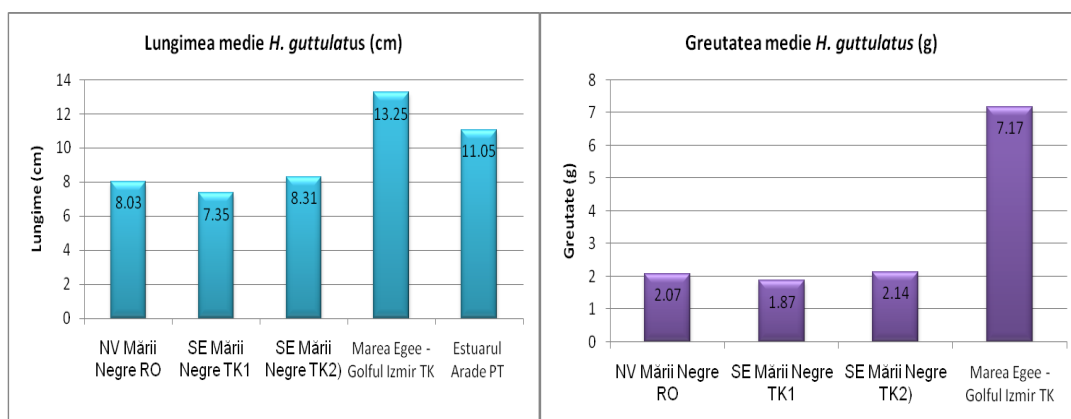


Fig. 3.2.3. Comparație a lungimilor și greutăților medii înregistrate de *H. guttulatus* în diferite regiuni marine.

Factorul pentru starea de întreținere - condition factor (K) s-a determinat folosind ecuația $K = (W/L^3) \times 100$, unde W = greutatea (masa) corpului peștelui, iar L = lungimea totală a peștelui (Bașusta et al., 2014). Comparativ cu exemplarele de căluș de mare din sud-estul Mării Negre (medie de 0,4183, Bașusta et al., 2014), valorile obținute pentru litoralul românesc (K total = 0,3997, K femele = 0,3976, K masculi = 0,4011) indică o stare de întreținere relativ mai bună pentru exemplarele de la litoralul turc al Mării Negre, însă nesemnificativă din punct de vedere statistic ($p > 0,05$).



Relația lungime - greutate este utilizată pentru a determina starea de întreținere a peștilor și tipul de creștere (izometrică sau alometrică). Un coeficient $b = 3$ semnifică o creștere izometrică liniară a peștelui (lungimea și greutatea cresc proporțional) (Ricker, 1975). O supra-creștere în lungime față de greutate se va reflecta într-un coeficient $b < 2,5$, iar o supra-creștere a greutății față de lungime este reflectată de a valoare a lui $b > 3,5$ (Froese, 2006).

Valorile coeficientului b obținute pentru exemplarele de *H. guttulatus* măsurate și cântărite în prezentul studiu au indicat, per total, o creștere alometrică negativă ($b = 2,72$), ceea ce înseamnă că lungimea exemplarelor crește mai repede comparativ cu greutatea acestora. Pe sexe, masculii au înregistrat tot o creștere alometrică negativă ($b = 2,14$), în schimb femelele au înregistrat o creștere alometrică pozitivă ($b = 3,23$), spre deosebire de alte studii, unde creșterea a fost alometrică negativă atât la femele, cât și la masculi (Bașusta et al., 2014).

Pentru specia *H. guttulatus* nu s-au găsit date disponibile în FishBase (Froese & Pauly, 2004). Acest lucru, coroborat cu faptul că specia este clasificată de IUCN ca Data Deficient (DD) (Woodall, 2012), confirmă necesitatea efectuării de cercetări viitoare, în vederea obținerii de date noi pentru Marea Neagră.

3.3. Analize genetice la specia *Hippocampus guttulatus* de la litoralul românesc al Mării Negre

Cercetări anterioare asupra cariotipului la specia *H. guttulatus* din Marea Mediterană au relevat valori diploide $2n = 44$ cromozomi (Vitturi, 1988; Vitturi et al., 1998).

Rezultatele prezentei cercetări au condus la concluzia că și exemplarele de *H. guttulatus* colectate de la litoralul românesc al Mării Negre au un cariotip cu valori diploide $2n = 44$ cromozomi, $2\text{ sm-m}+42\text{ a}$; $\text{FN} = 46$ (Fig. 3.3.1-3.3.2).

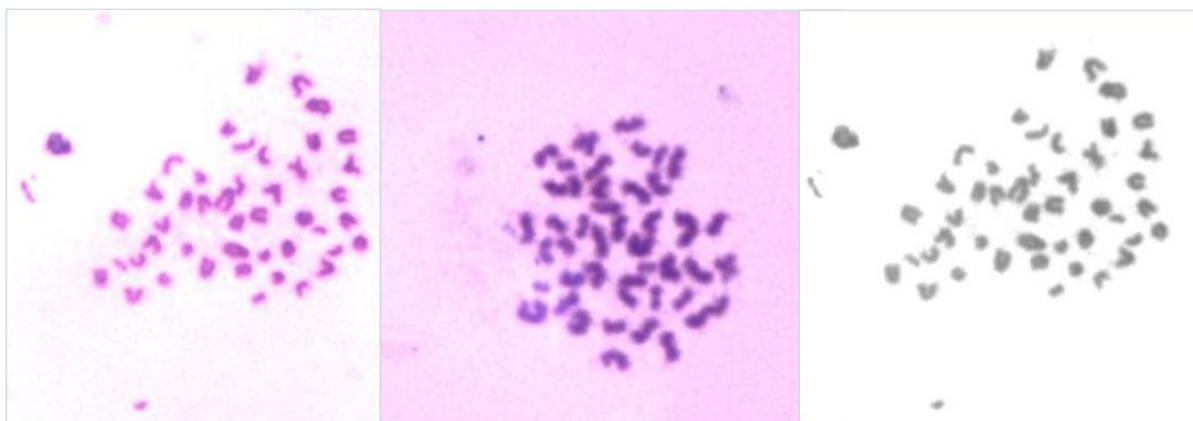


Fig. 3.3.1. Metafaze la *H. guttulatus* fotografiate la microscop cu obiectivul cu imersie (foto Elena Taflan, INCDD Tulcea).

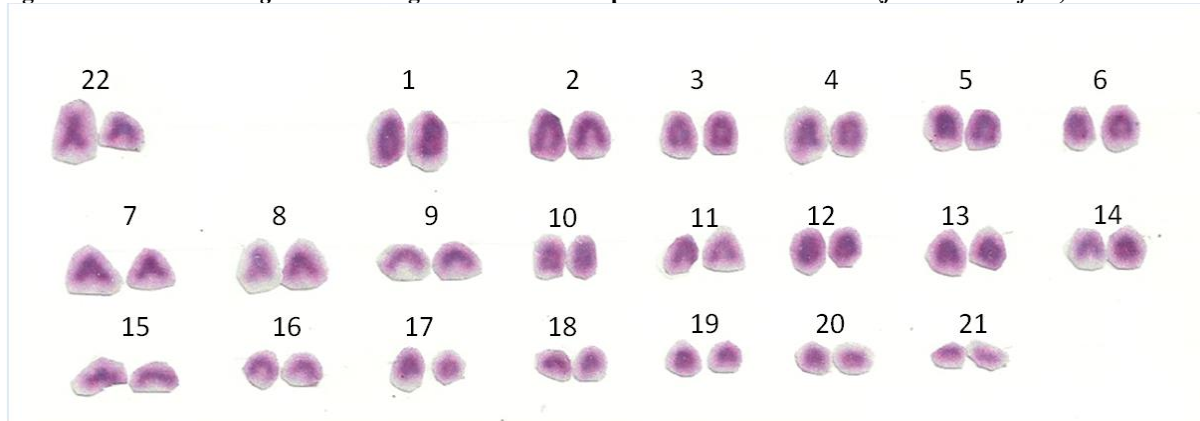


Fig. 3.3.2. Cariotipul *H. guttulatus* de la litoralul românesc al Mării Negre (foto Elena Taflan, INCDD Tulcea).



Fig. 3.3.3. Arborele filogenetic construit în baza parametrului Kimura-2 al regiunii citocromului b de la șapte exemplare de *Hippocampus* sp. colectate de la litoralul românesc al Mării Negre.

Astfel, avem un cariotip cu 22 de perechi de cromozomi, din care 21 perechi sunt constituite din cromozomi acrocentrici (perechile 1-21), cu dimensiuni descrescătoare, iar ultima pereche (22) este alcătuită din doi cromozomi de dimensiuni medii meta-submetacentrici, rezultând astfel un număr fundamental de 46 brațe cromozomiale, $2\text{ sm-m}+42\text{ a}$; $\text{FN} = 46$ (Fig. 3.3.2). Având în vedere că nu s-au detectat elemente heterotipice la cariotipurile pentru masculi și femele, s-a concluzionat că specia *H. guttulatus* nu prezintă cromozomi diferențiați din punct de vedere sexual.

Pentru realizarea arborelui filogenetic al *H. guttulatus*, s-a utilizat filogenia moleculară, care presupune utilizarea macromoleculelor biologice pentru a obține informații asupra istoriei evolutive a ființelor și asupra legăturilor lor de înrudire, adică filogenia lor. În prezentul studiu au fost incluse secvențele de nucleotide ale citocromului b ale *H. guttulatus* și ale altor specii din



genul *Hippocampus* disponibile în GenBank (Subcapitolul 2.4. Analize genetice pentru determinarea speciilor).

Arborele filogenetic al regiunii citocromului b rezultat utilizând metoda UPGMA și modelul lui Kimura cu 2 parametri, pe baza distanțelor genetice, prezintă două clusterse majore (Fig. 3.3.3). Specia *H. guttulatus* a fost grupată ca ramură distinctă, însă mai apropiată din punct de vedere filogenetic de speciile *H. hippocampus*, *H. erectus*, *H. ingens* și *H. kuda* (cu care prezintă și asemănări la nivel fenotipic).

S-a realizat cu succes amplificarea ADN-ului la cele șapte exemplare capturate din Marea Neagră (Fig. 3.3.4). Nu au fost identificate polimorfisme la cele șapte specimene utilizând opt enzime restrictive [*Tru9I* (Promega R7011), *HphI* (NEB R0158), *RsaI* (Promega R6371), *DdeI* (Promega R6291), *HaeIII* (Promega R6171), *BsII* (NEB R0555), *BamHI* (Promega R6021) și *BsaJI* (NEB R0536)], ceea ce confirmă ipoteza că toate exemplarele analizate aparțin aceleiași specii, și anume *H. guttulatus*, și infirmând teoria că și alte două specii de căluți de mare (*H. hippocampus* și *H. fuscus*) ar popula zonele de mică adâncime de la litoralul românesc al Mării Negre.

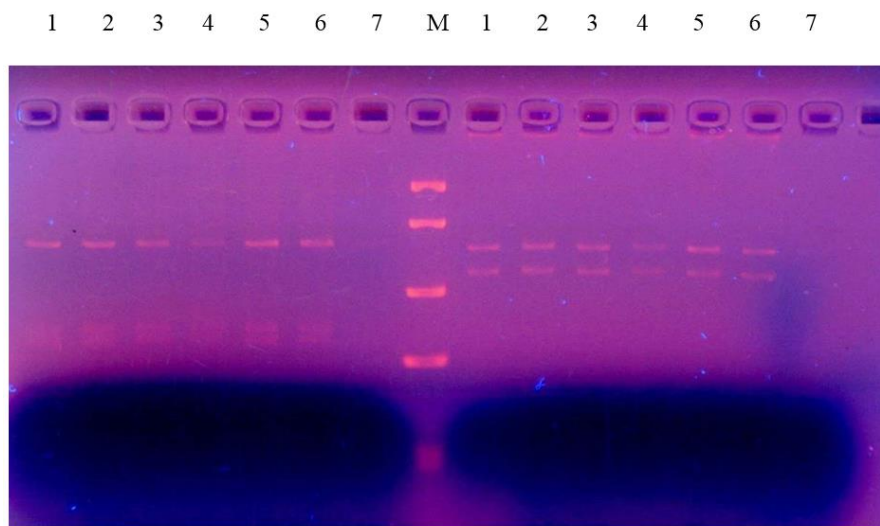


Fig. 3.3.4. Imaginea gelului de agaroză în care au fost separați produșii de digestie enzimatică cu enzimele *HphI* și *Bsrl*. Cifrele de la 1 la 7 indică exemplarele de *H. guttulatus* (foto Dalia Onăru, INCDD Tulcea).

3.4. Determinarea efectelor diferitelor regimuri de hrană vie asupra căluțului de mare *Hippocampus guttulatus*

În România, primele experimente în care s-a încercat înmulțirea și creșterea în captivitate a căluților de mare au fost realizate de INCDM „Grigore Antipa” Constanța în anul 2008, în cadrul unui proiect de cercetare. Rezultatele concrete ale experimentelor, exprimate în procente de supraviețuire și animale eliberate în mare, au demonstrat că reproducerea și creșterea ulterioară în captivitate a acestor pești sunt fezabile. Cu toate acestea, principalul factor limitativ în creșterea *H. guttulatus* a fost asigurarea unui regim de hrană propice puietului, dat fiind că multe exemplare au murit de inaniție înainte de a atinge maturitatea din cauza lipsei unei alternative de hrană de dimensiuni potrivite. În aceste condiții, cercetarea de față s-a dorit a fi o încercare de determinare a regimului de hrană mai bine acceptat de căluții de mare în mediu controlat, în vederea creșterii ulterioare în condiții de captivitate. Metodologia de realizare a experimentului este detaliată în Subcapitolul 2.5 Realizare experiment hrană din prezenta teză.

În urma experimentului realizat în decursul stagiului de doctorat, în ceea ce privește măsurătorile lungimii, s-a observat că exemplarele de *H. guttulatus* au crescut în mod linear în cazul tuturor celor trei regimuri de hrană. Lungimea finală (+10 zile) fiind mai mare decât cea înregistrată după +5 zile și, evident, cea inițială (Fig. 3.4.1). Creșterea maximă în lungime s-a înregistrat la exemplarele din Acvariul C (unde s-a administrat regimul de hrană combinat *Brachionus plicatilis* + *Artemia salina*), urmată îndeaproape de regimul cu *A. salina* (Acvariul B). Cea mai redusă creștere în lungime s-a înregistrat la căluții de mare hrăniți exclusiv cu rotiferul *B. plicatilis* (Acvariul A). Referitor la variațiile de greutate, creșterea maximă s-a înregistrat tot la exemplarele din Acvariul C (unde s-a administrat regimul de hrană combinat *B. plicatilis* + *A. salina*), urmate de cele din Acvariul B (regimul cu *A. salina*) și Acvariul A (regimul cu rotiferul *B. plicatilis*) (Fig. 3.4.1). Aceste rezultate pot fi explicate prin conținutul mai mare de lipide al crustaceului *A. salina* (18,9% s.u.) (Léger et al., 1987) comparativ cu *B. plicatilis* (12% s.u.) (Onciu, 1998).

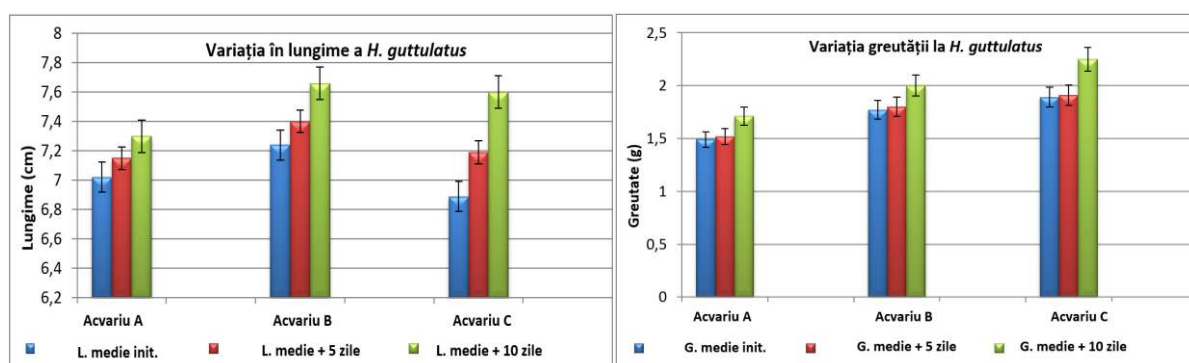


Fig. 3.4.1. Creșterea în lungime și greutate a *H. guttulatus* în raport cu regimul de hrană administrat (Nenciu et al., 2015).



Cu toate acestea, diferențele de lungime și greutate înregistrate după 5, respectiv 10 zile între cele trei acvarii nu au fost semnificative din punct de vedere statistic. După aplicarea testului parametric One-Way Anova (Analiza Varianței), a rezultat că pentru variabila „lungimea medie” după 5 zile mediile celor trei grupuri (*H. guttulatus*, Acvariu A = 7,15 cm, *H. guttulatus*, Acvariu B = 7,40 cm, *H. guttulatus*, Acvariu C = 7,19 cm) nu au diferit în mod semnificativ între ele ($F = 0,545$; $p = 0,586 > \alpha = 0,05$) (Fig. 3.4.2.a). În mod similar, după 10 zile, mediile celor trei grupuri (*H. guttulatus*, Acvariu A = 7,30 cm, *H. guttulatus*, Acvariu B = 7,66 cm, *H. guttulatus*, Acvariu C = 7,60 cm) nu au diferit în mod semnificativ din punct de vedere statistic ($F = 0,823$; $p = 0,462 > \alpha = 0,05$) (Fig. 3.4.2.b). Nici pentru variabila „greutate medie” valorile înregistrate după 5 zile de experiment nu au diferit în mod semnificativ între cele trei grupuri: *H. guttulatus*, Acvariu A = 1,52 g, *H. guttulatus*, Acvariu B = 1,80 g, *H. guttulatus*, Acvariu C = 1,91 g ($F = 1,149$; $p = 0,332 > \alpha = 0,05$) (Fig. 3.4.2.c). Nici mediile greutăților măsurate după 10 zile de aplicare a hrănirii controlate nu au înregistrat diferențe semnificative statistic între cele trei regimuri de hrană: *H. guttulatus*, Acvariu A = 1,71 g, *H. guttulatus*, Acvariu B = 2,07 g, *H. guttulatus*, Acvariu C = 2,25 g ($F = 0,927$; $p = 0,442 > \alpha = 0,05$) (Fig. 3.4.2.d).

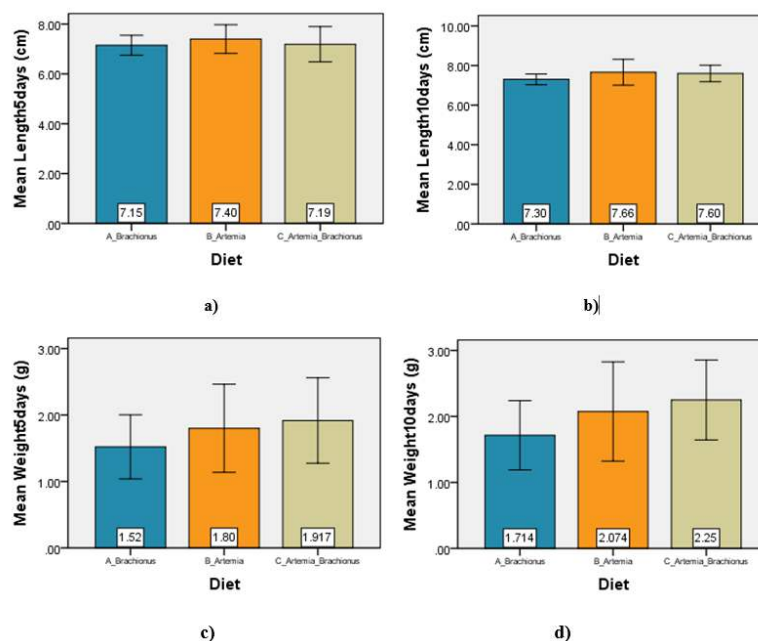


Fig. 3.4.2. Diferențe între cele trei acvarii experimentale: a) lungime medie +5 zile; b) lungime medie +10 zile; c) greutate medie +5 zile; d) greutate medie +10 zile (Nenciu et al., 2015).

În ceea ce privește compoziția biochimică globală, s-au raportat valorile medii înregistrate după 5, respectiv 10 zile de hrănire diferențiată la mediile înregistrate de lotul-martor. Exemplele din lotul martor au fost similare ca lungime și greutate cu cele din acvariile experimentale (confirmare statistică, $F = 0,896$; $p = 0,420 > \alpha = 0,05$ pentru lungimea inițială, și $F = 1,118$; $p = 0,342 > \alpha = 0,05$, pentru greutatea inițială). Substanța uscată (s.u.) și umiditatea (% material proaspăt) au înregistrat anumite diferențe între acvariile experimentale și momentele experimentului. Cea mai ridicată valoare a substanței uscate a fost înregistrată de exemplele de *H. guttulatus* din Acvariu A (hrănire cu *B. plicatilis*) după 5 zile de experiment (24,85%), iar cea mai scăzută s-a înregistrat în Acvariu B (hrănire cu *A. salina*) după 5 zile (22,34%) (Fig. 3.4.3).

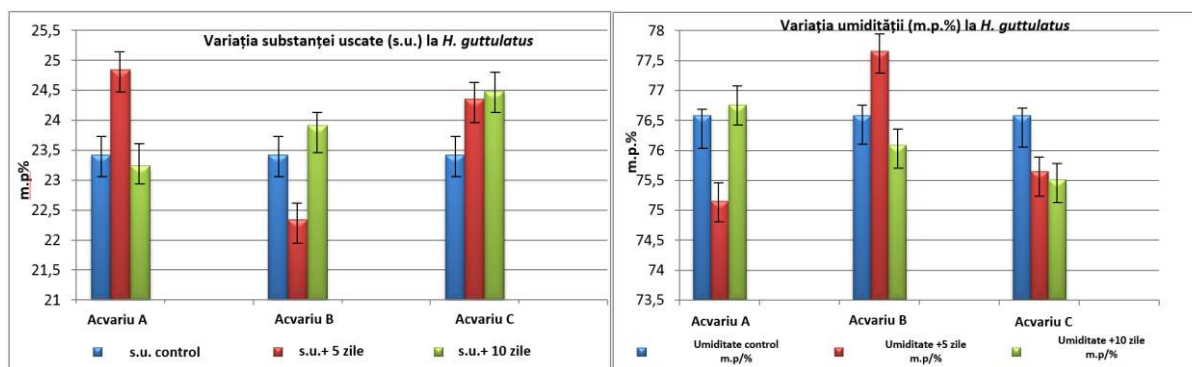


Fig. 3.4.3. Substanța uscată (s.u.%) și umiditatea (m.p.%) înregistrată la exemplele de *H. guttulatus* din cele trei acvarii experimentale (Nenciu et al., 2015).

În manieră complementară, cel mai mic procent de umiditate s-a înregistrat la indivizii din Acvariu A (hrănire cu *B. plicatilis*) după 5 zile de experiment (75,15%), iar cel mai ridicat conținut de apă a fost măsurat la exemplele din Acvariu B (hrănire cu *A. salina*) după 5 zile (77,66%) (Fig. 3.4.3).

Valorile substanței minerale (s.u.%) au fost cele mai ridicate în cazul regimului cu *B. plicatilis* (Acvariu A), în vreme ce regimurile de hrană cu *A. salina* (Acvariu B) și combinat (Acvariu C) au înregistrat valori similare.

Conținutul de proteine a variat în mod diferit după 5, respectiv 10 zile de experiment. Astfel, după 5 zile de hrănire controlată, cel mai ridicat conținut de proteine s-a înregistrat la exemplele de *H. guttulatus* din Acvariu C (regimul combinat), în vreme ce valoarea minimă s-a înregistrat la căluții de mare hrăniți exclusiv cu rotiferi (Acvariu A). Însă, după 10 zile, aceste valori s-



au inversat: cea mai mare valoare a proteinelor s-a înregistrat la exemplarele din Acvariul A (regimul cu *B. plicatilis*), iar cea mai mică în Acvariul C (regimul combinat) (Fig. 3.4.4). Conținutul de lipide a fost cel mai ridicat în regimul cu *A. salina* (Acvariu B) după 10 zile, precum și în regimul combinat (Acvariu C) după 5 zile (Fig. 3.4.4).

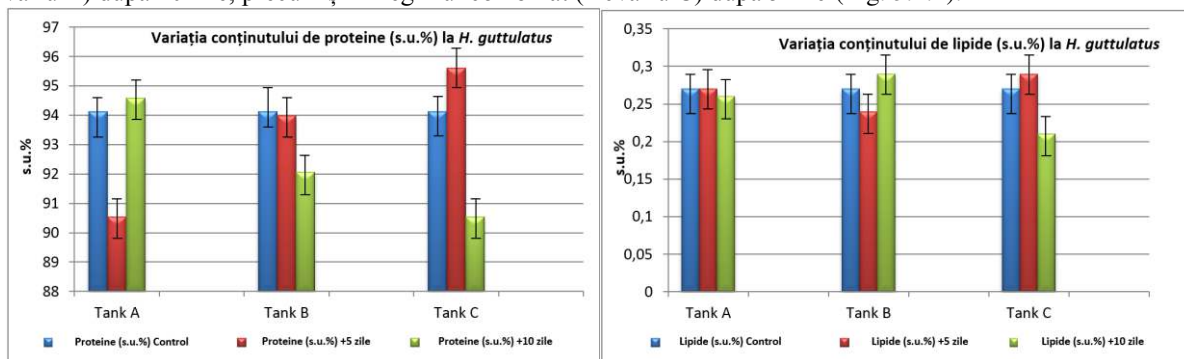


Fig. 3.4.4. Conținutul de proteine (s.u.%) și lipide (s.u.%) înregistrat la exemplarele de *H. guttulus* din cele trei acvarii experimentale (Nenciu et al., 2015).

Cu toate acestea, în urma analizei compoziției biochimice globale, s-a constatat că lotul hrănit cu *B. plicatilis* a avut un conținut de proteine mai mare, oarecum neașteptat după observarea comportamentului călușilor de mare, care au părut că preferă prada de dimensiuni mai mari (*A. salina*). Aceste valori pot fi, însă, explicate prin conținutul de proteine mai ridicat al rotiferilor *B. plicatilis* (63% s.u.) (Léger et al., 1987) comparativ cu *A. salina* (54,3% s.u.) (Léger et al., 1987). Datorită compoziției sale biochimice, rotiferul *B. plicatilis* constituie o sursă de hrană de calitate (conținut lipide totale 12% s.u., proteine 63% s.u.) atunci când este hrănit cu *Nannochloropsis* sp. (Onciu, 1998).

Pe de altă parte, analiza compoziției biochimice globale a crustaceului *A. salina* a relevat un conținut ridicat de proteine, indicând că necesitățile de macronutrienți sunt în general satisfăcute pentru majoritatea prădătorilor, incluzând aici și călușii de mare. Compoziția biochimică a crustaceului *A. salina* (hrănit cu *Tetraselmis* sp.) este următoarea: lipide totale 18,9% s.u., proteine 52,2% s.u. în naupliile de *A. salina* (Léger et al., 1987). Conținutul de lipide totale la indivizii de *H. guttulus* a fost cel mai ridicat în regimul cu *A. salina* (Acvariul B) după 10 zile de experiment, precum și în cazul regimului combinat (Acvariul C) după 5 zile, aspect explicabil, având în vedere procentul mai mare de lipide din *A. salina* comparativ cu *B. plicatilis* (12% s.u.) (Onciu, 1998).

Nu se poate trece cu vederea nici influența factorilor de mediu, dat fiind că evoluția temperaturii și salinității pe parcursul celor 10 zile de experiment este posibil să fi influențat comportamentul de hrănire al exemplarelor de *H. guttulus* și, implicit, activitatea lor metabolică. Se remarcă evoluția conținutului de proteine în cazul celor trei loturi: cu excepția Acvariului A (hrănire exclusiv cu rotiferul *B. plicatilis*), în cazul Acvariilor B (*H. guttulus* hrăniți exclusiv cu *A. salina*) și C (regimul de hrană combinat), conținutul de proteine a scăzut după 10 zile de hrănire controlată, de la 93,98% s.u. la 92,07% s.u. și, respectiv, de la 95,62% s.u. la 90,54% s.u. Când s-a corelat această scădere a conținutului de proteine cu temperatura și salinitatea, s-a observat că, la exact 5 zile de la începerea experimentului, temperatura a început să crească (de la 23,5°C la 25,22°C), în timp ce salinitatea a început să scadă (de la 14 PSU‰ la 12,92 PSU‰), sugerând că este posibil ca metabolismul exemplarelor de *H. guttulus* să fi fost încetinit.

Concluziile acestei cercetări preliminare sunt că un regim de hrană combinat cu rotiferi (*B. plicatilis*) și crustacee (*A. salina*) este cel mai recomandat pentru creșterea în captivitate a călușilor de mare (*H. guttulus*), datorită avantajelor pe care le prezintă fiecare dintre cele două nevertebrate. Pe de-o parte, rotiferii se dezvoltă în densități mari și au un conținut de proteine mai ridicat (care s-a reflectat și în conținutul de proteine al exemplarelor din loturile experimentale analizate), iar, pe de altă parte, crustaceele au un conținut de lipide mai ridicat și sunt mai ușor de vânat, fiind mai mari și mai vizibile în acvariu.

Este recomandat să se experimenteze și cu alte regimuri de hrană. Cercetări viitoare vor viza analiza conținutului stomacal al exemplarelor de *H. guttulus* rezultate din capturile complementare de la punctele pescărești situate de-a lungul litoralului românesc, tocmai pentru a determina cu acuratețe tipul de pradă preferat de această specie în Marea Neagră.

3.5. Investigarea acumulării de poluanți în țesutul global al călușului de mare *Hippocampus guttulus*

H. guttulus (ca și celelalte specii de căluși de mare) trăiește în zonele de mică adâncime din apropierea coastei, unde găsește habitate propice în pajiștile de iarbă de mare și în zonele cu substrat pietros acoperite de tufe de alge macrofite. Însă, această vecinătate cu zona costieră îl face extrem de vulnerabil la deversările de origine antropică (Nenciu et al., 2013). În consecință, în prezentul studiu au fost analizați trei dintre cei mai importanți contaminanți ai mediului marin - pesticidele organoclorurate, hidrocarburile aromatice polinucleare și metalele grele (Cu, Cd, Pb, Ni, Cr) - în țesutul global al călușului de mare colectat de-a lungul litoralului românesc sudic. De asemenea, s-a determinat compoziția biochimică globală a țesutului integral de *H. guttulus*.

Metodologia de eșantionare (probele au fost prelevate din trei stații situate în sudul litoralului românesc al Mării Negre, Cazino-Constanța, Saturn-Venus și Mangalia), precum și cea de efectuare a analizelor specifice de laborator sunt detaliate în Subcapitolele 2.1. Colectarea probelor, 2.6. Determinarea concentrației de metale grele, 2.7. Determinarea concentrației de hidrocarburi aromatice polinucleare (HAP), 2.8. Determinarea concentrației de pesticide organoclorurate și 2.9. Determinarea compoziției biochimice globale din prezenta teză.

S-a determinat compoziția biochimică globală din țesutul de *H. guttulus* (substanță uscată, umiditate, substanță minerală, proteină brută, lipidă brută) (m.p. = material proaspăt, greutatea umedă; s.u. = substanță uscată). Substanța uscată (%) a variat între 26,64±0,50 (Mangalia) și 30,69±0,27 (Cazino-Constanța). Umiditatea (% m.p.) a variat între 69,31±0,27 (Cazino-Constanța) și 73,36±0,5 (Mangalia). Substanța minerală (% s.u.) a variat între 17,90±0,95 (Saturn-Venus) și 19,38±0,62 (Mangalia). Conținutul de proteine în țesutul de *H. guttulus* (% s.u.) a variat între 70,82±5,15 (Cazino-Constanța) și 74,07±3,55 (Mangalia), iar conținutul de lipide (% s.u.) între 1,17±0,13 (Mangalia) și 1,28±0,21 (Cazino-Constanța) (Fig. 3.5.1.a).

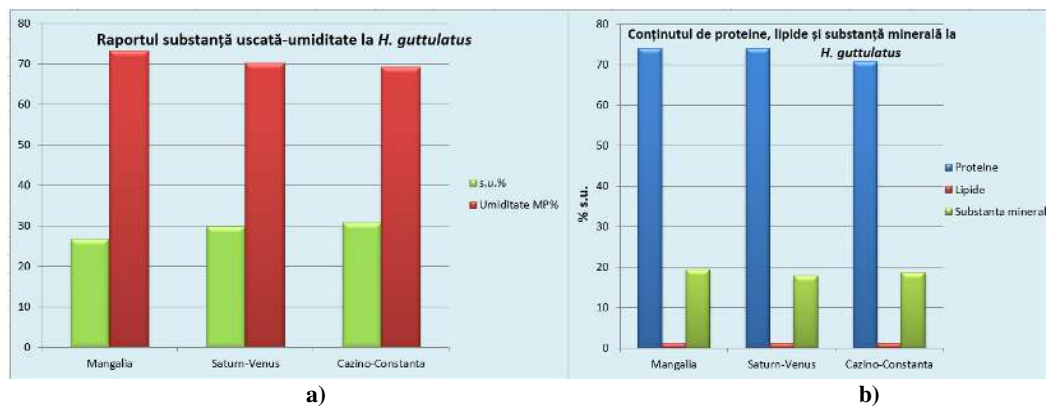


Fig. 3.5.1. a) Raportul substanță uscată-umiditate și b) conținutul de proteine, lipide și substanță minerală (% s.u.) în țesutul de *H. guttulatus* (Nenciu et al., 2014b).

Astfel, substanța uscată și conținutul de lipide au înregistrat valorile minime în țesutul de căluț de mare colectat de la Mangalia și valorile maxime în cel colectat din stația Cazino-Constanța. Umiditatea și conținutul de proteine au fost minime în probele colectate de la Cazino-Constanța, iar valorile maxime au fost înregistrate la Mangalia (Fig. 3.5.1.b).

Analiza nivelului **pesticidelor organoclorurate (POC)** în țesutul de căluț de mare a evidențiat anumite diferențe între stațiile de prelevare a probelor, precum și între pesticidele analizate. Astfel, valoarea maximă a fost înregistrată pentru aldrin la Mangalia (0,2081 $\mu\text{g/g m.p.}$), iar lindanul a fost aproape sub limita de detecție a metodei (0,0004 $\mu\text{g/g m.p.}$) în toate cele trei locații de eșantionare. Valorile înregistrate pentru hexaclorobenzen (HCB) au fost relativ reduse în toate cele trei stații de prelevare (medie 0,0161 $\mu\text{g/g m.p.}$), iar pentru heptaclor valoarea înregistrată la Cazino-Constanța (0,0836 $\mu\text{g/g m.p.}$) a fost semnificativ mai mare față de celelalte două stații (0,0003 $\mu\text{g/g m.p.}$). De asemenea, și valorile înregistrate pentru p,p'DDT la Cazino-Constanța (0,0514 $\mu\text{g/g m.p.}$) au fost mai mari decât cele înregistrate la Saturn-Venus (0,0263 $\mu\text{g/g m.p.}$) și Mangalia (0,0125 $\mu\text{g/g m.p.}$).

În ceea ce privește ceilalți compuși organoclorurați analizați (dieldrin - medie 0,0688 $\mu\text{g/g m.p.}$, endrin - medie 0,0726 $\mu\text{g/g m.p.}$, p,p'DDE - medie 0,0824 $\mu\text{g/g m.p.}$, p,p'DDD - 0,0844 $\mu\text{g/g m.p.}$), valorile înregistrate au fost relativ apropiate, cu mici diferențe între stațiile de prelevare a probelor (Fig. 3.5.2).

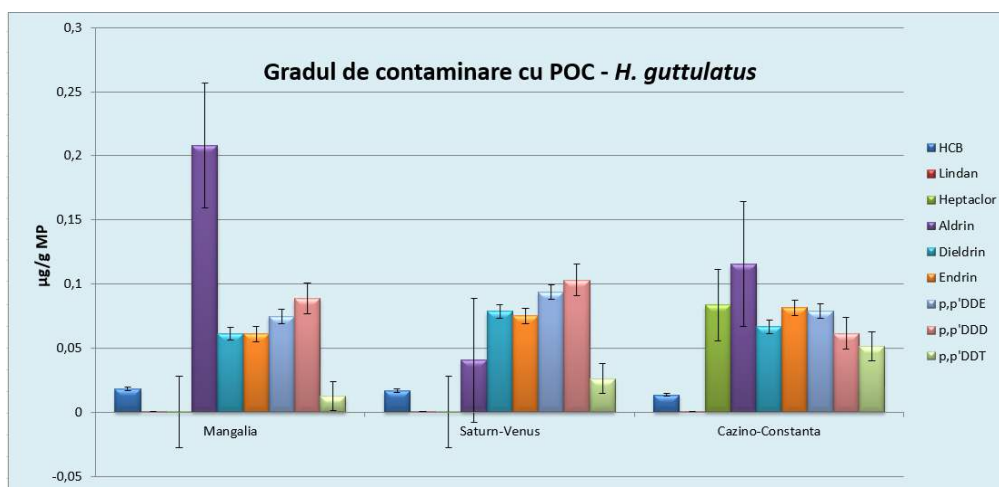


Fig. 3.5.2. Contaminarea cu POC ($\mu\text{g/g m.p.}$) a țesutului de *H. guttulatus* pe compuși (Nenciu et al., 2014b).

Conținutul total de pesticide organoclorurate în țesutul global de căluț de mare a variat între valoarea minimă 0,4350 $\mu\text{g/g m.p.}$ la Saturn-Venus și 0,5534 $\mu\text{g/g m.p.}$ la Cazino Constanța (medie 0,5047), indicând astfel o contaminare totală mai mare cu pesticide organoclorurate în zona adiacentă Portului Constanța.

Analiza valorilor POC înregistrate în țesutul de *H. guttulatus* a arătat că, în ciuda conținutului scăzut de lipide comparativ cu alte organisme marine (spre exemplu, midiile), căluții de mare bioacumulează compuși organoclorurați, care de obicei sunt absorbiți de țesutul gras. Cu toate acestea, doar cercetări ulterioare pot clarifica în ce mod este afectat metabolismul și activitatea enzimatică a căluților de mare de această contaminare cu pesticide organoclorurate.

În mod similar cu pesticidele organoclorurate, **hidrocarburile aromatice polinucleare (HAP)** au fost identificate în țesutul de *H. guttulatus* cu diferențe între cei 16 compuși analizați (Fig. 3.5.3).

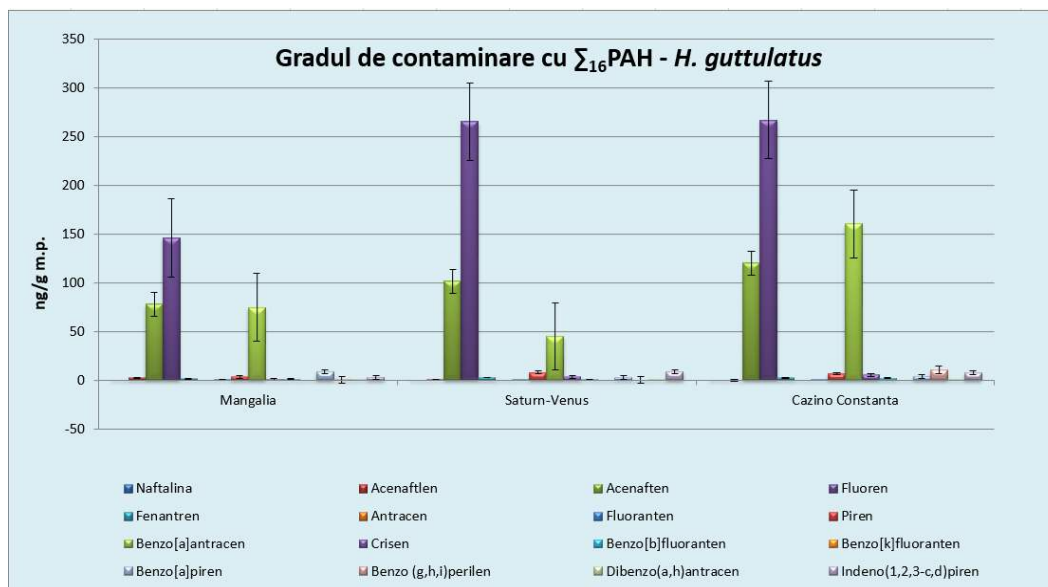


Fig. 3.5.3. Contaminarea cu hidrocarburi aromatice polinucleare (ng/g m.p.) a țesutului de *H. guttulatus* pe compuși (Nenciu et al., 2014b).

Cel mai ridicat nivel a fost înregistrat de fluoren atât la Saturn-Venus, cât și la Cazino-Constanța (265,7 ng/g m.p. și, respectiv, 267,3 ng/g m.p.), în vreme ce naftalina, antracenul și benzo[k]fluorantenul au fost sub limita de detecție a metodei. Fluorenul este o HAP cu greutate moleculară mică, cu 2-3 inele aromatice, caracteristică pentru deversările de petrol și produse petroliere (Țigănuș et al., 2013). Această valoare ridicată înregistrată de fluoren în țesutul de căluț de mare în toate cele trei stații poate indica tocmai acest tip de poluare a zonelor din care au fost prelevate probele, ce a condus la o bioacumulare a acestei HAP în organismul peștelui studiat. Trei dintre compușii aromatici polinucleari au înregistrat valori mai ridicate, și anume acenaftenul, fluorenul și benzo[a]antracenul (medii 100,0 ng/g m.p., 226,4 ng/g m.p. și, respectiv, 93,5 ng/g MP), în timp ce celelalte hidrocarburi aromatice polinucleare nu au indicat o contaminare alarmantă. Cu toate acestea, conținutul total de hidrocarburi aromatice polinucleare în țesutul de căluț de mare a arătat un grad de contaminare mai mare în stația Cazino-Constanța (587,8 ng/g m.p.), înregistrând o tendință descrescătoare către sud - 439,5 ng/g m.p. la Saturn-Venus și 322,5 ng/g m.p. la Mangalia.

Nu au existat date disponibile pentru a compara nivelurile de pesticide organoclorurate și hidrocarburi aromatice polinucleare înregistrate în țesutul de căluț de mare la Marea Neagră cu valori înregistrate la specii din genul *Hippocampus* din alte zone marine ale lumii, pentru a putea vedea dacă aceste valori sunt normale sau excepționale. Există posibilitatea ca valorile obținute să fie rezultatul unor interferențe ale anumitor compuși, dat fiind că au rămas pigmenți în extract după etapa de purificare (Nenciu et al., 2014b). Așadar, analizele trebuie repetate, folosind probe din aceleași stații de prelevare.

Pe de altă parte, pentru **metalele grele**, au fost disponibile anumite date pentru a realiza o comparație cu alte șase specii de căluț de mare (Qiang et al., 2008). Astfel, conținutul de metale grele determinat în țesutul de *H. guttulatus* a fost similar și comparabil pentru cupru, cadmiu și plumb, după cum urmează: Cu - 5,56 μg/g s.u. la *H. guttulatus* și 6,03 μg/g s.u. la *Hippocampus kuda* (Bleeker, 1852), Cd - 1,51 μg/g s.u. la *H. guttulatus* și 1,54 μg/g s.u. la *Hippocampus spinosissimus* (Roule, 1916), Pb - 2,50 μg/g s.u. la *H. guttulatus* și 2,07 μg/g s.u. la *H. histrix* (Kaup, 1856). Aceste valori comparabile confirmă acuratețea analizei efectuate probelor colectate din Marea Neagră și indică faptul că specia de căluț de mare de la litoralul românesc bioacumulează metale grele (Nenciu et al., 2014b).

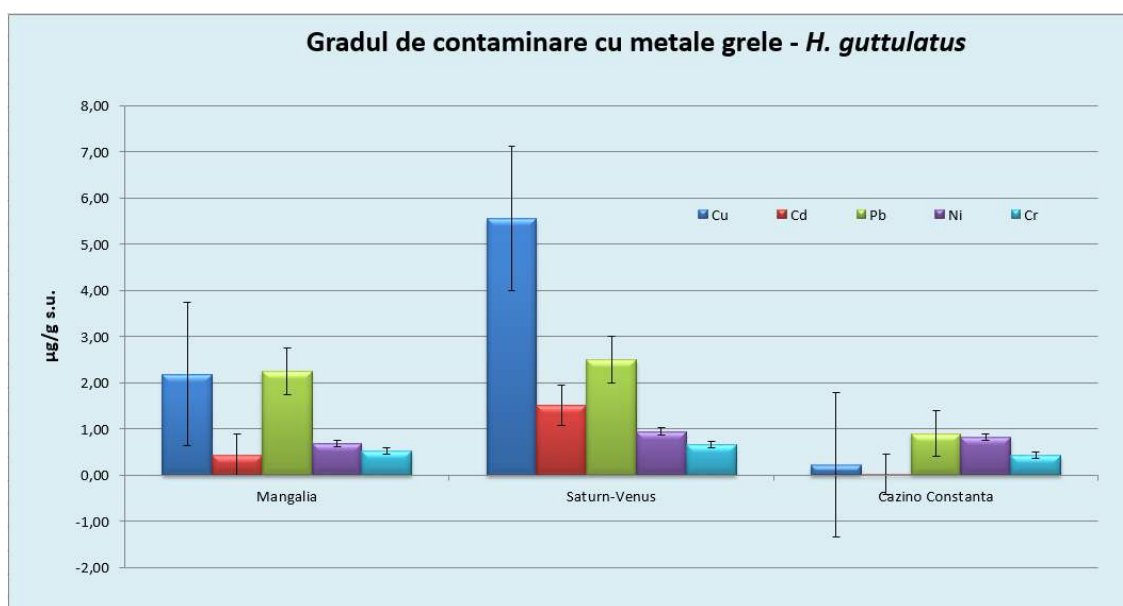


Fig. 3.5.4. Contaminarea cu metale grele (μg/g s.u.) a speciei *H. guttulatus* pe elemente (Nenciu et al., 2014b).



Cea mai mare valoare a fost înregistrată de cupru la Saturn-Venus (5,56 $\mu\text{g/g}$ s.u.), iar cel mai scăzut nivel de contaminare s-a înregistrat la cadmiu, în stația Cazino-Constanța (0,02 $\mu\text{g/g}$ s.u.). De asemenea, și contaminarea cu plumb a fost semnificativă, cu o medie de 1,88 $\mu\text{g/g}$ s.u. Cadmiul, nichelul și cromul au înregistrat valori medii similare, variind între 0,54 $\mu\text{g/g}$ s.u. (Cr) și 0,82 $\mu\text{g/g}$ s.u. (Ni) (Fig. 3.5.4). Din cauza nivelurilor ridicate ale cuprului și plumbului la Saturn-Venus, această stație a rezultat ca cea mai contaminată cu metale grele (total 11,19 $\mu\text{g/g}$ s.u.), urmată de Mangalia (6,10 $\mu\text{g/g}$ s.u.) și Cazino-Constanța (2,39 $\mu\text{g/g}$ s.u.). Acest nivel ridicat al cuprului în țesutul de *H. guttulatus* a rezultat, probabil, în urma unei contaminări cu cupru a apei marine din zonă, din cauza traficului naval (cuprul este adesea folosit ca agent antifouling pe chilele navelor) (Nenciu et al., 2014b).

Concluzia acestei cercetări a nivelului de bioacumulare a xenobioticelor în țesutul de *H. guttulatus* la litoralul românesc al Mării Negre confirmă ipoteza potrivit căreia căluții de mare, ca majoritatea speciilor marine, preiau substanțele ce ajung în mediul acvatic (Nenciu et al., 2014b). Toți acești compuși detectați în urma analizelor efectuate sunt extrem de toxici, chiar și în concentrații scăzute, în special atunci când se acumulează în situsurile metabolice active, și ar putea influența supraviețuirea unei specii extrem de sensibile cum este *H. guttulatus*. Este, așadar, necesar să se efectueze cercetări viitoare care să studieze modul în care pesticidele organoclorurate, hidrocarburile aromatice polinucleare și metalele grele influențează activitatea metabolică și enzimatică a căluțului de mare.

3.6. Studii privind bioacumularea de metale grele în țesutul global al căluțului de mare *Hippocampus guttulatus* și al acului de mare *Syngnathus acus* de la litoralul românesc exprimată prin Factorul de Bioconcentrare (BCF) și Factorul de Bioacumulare Biota-Sediment (BSAF)

Prezenta cercetare a avut ca obiectiv analiza bioacumulării de metale grele (Cu, Cd, Pb, Ni, Cr) la două specii de Syngnathidae care populează apele puțin adânci de la litoralul românesc: căluțul de mare (*Hippocampus guttulatus*, Cuvier, 1829) și acul de mare (*Syngnathus acus*, Linnaeus, 1758), raportată la concentrațiile aceluiași elemente din apă și sedimentele înconjurătoare, exprimată prin Factorul de Bioconcentrare (BCF) și Factorul de Bioacumulare Biota-Sediment (BSAF).

Metodologia de eșantionare, precum și cea de efectuare a analizelor specifice de laborator prin spectrometrie cu absorbție, utilizând spectrometrele cu absorbție atomică cu cupor de grafit model ATI-UNICAM 939Z și SOLAAR M6 Dual Thermo Electron-UNICAM din dotarea INCDM „Grigore Antipa” Constanța, sunt detaliate în Subcapitolele 2.1. *Colectarea probelor* și 2.6. *Determinarea concentrației de metale grele* din prezenta teză.

BCF și BSAF la speciile *Hippocampus guttulatus* și *Syngnathus acus* (2014)

Analizele efectuate au arătat că cele cinci metale grele (Cu, Cd, Pb, Ni, Cr) au înregistrat valori variabile în cele două stații de prelevare, în toate cele trei medii analizate [biota $\mu\text{g/kg}$ substanță uscată (s.u.), apă $\mu\text{g/l}$, sediment $\mu\text{g/kg}$ s.u.], cu diferențe semnificative statistic ($p < 0,05$, testul T). Pentru a uniformiza valorile în vederea calculării factorilor BCF și BSAF, unitățile de măsură au fost transformate în ppb (parts per billion - părți la un miliard). Rezultatele sunt prezentate în Tabelul 3.6.1.

Tabel 3.6.1. Valori ale contaminării cu metale grele în biotă, apă și sedimente (2014).

Stația	Cazino Constanța					
		Cu	Cd	Pb	Ni	Cr
ppb $\mu\text{g/kg}$	<i>H. guttulatus</i>	14000	220	280	3220	120
ppb $\mu\text{g/kg}$	<i>S. acus</i>	7890	90	1220	1330	730
ppb $\mu\text{g/l}$	Apă	1,64	0,84	3,05	1,15	1,09
ppb $\mu\text{g/kg}$	Sedimente	18850,00	210,00	5280,00	73090,00	48930,00
Stația	Costinești					
		Cu	Cd	Pb	Ni	Cr
ppb $\mu\text{g/kg}$	<i>H. guttulatus</i>	17270	120	260	6640	11790
ppb $\mu\text{g/kg}$	<i>S. acus</i>	7120	110	130	1510	480
ppb $\mu\text{g/l}$	Apă	0,84	0,86	2,95	1,64	1,81
ppb $\mu\text{g/kg}$	Sedimente	15460,00	170,00	3210,00	50530,00	79120,00

Astfel, în **probele de biotă**, în stația Cazino Constanța, cele mai ridicate valori au fost înregistrate de cupru atât în țesutul de *H. guttulatus* (14000 $\mu\text{g/kg}$ s.u.), cât și de *S. acus* (7890 $\mu\text{g/kg}$ s.u.), urmate de nichel în țesut de *H. guttulatus* (3220 $\mu\text{g/kg}$ s.u.) și *S. acus* (1330 $\mu\text{g/kg}$ s.u.). În aceeași stație, plumbul a înregistrat valoarea maximă în țesut de *S. acus* (1220 $\mu\text{g/kg}$ s.u.), la fel și cromul (730 $\mu\text{g/kg}$ s.u.). Per total, în stația Cazino Constanța, la specia *H. guttulatus*, cele cinci metale grele au înregistrat valori descrescătoare în ordinea $\text{Cu} > \text{Ni} > \text{Pb} > \text{Cd} > \text{Cr}$, iar la specia *S. acus* ordinea a fost $\text{Cu} > \text{Ni} > \text{Pb} > \text{Cr} > \text{Cd}$ (Fig. 3.6.1).

În stația sudică, Costinești, tot cuprul a înregistrat valorile maxime la ambele specii: 17270 $\mu\text{g/kg}$ s.u. la *H. guttulatus* și 7120 $\mu\text{g/kg}$ s.u. la *S. acus*. Cromul și nichelul au înregistrat și ele valori mari în țesutul de *H. guttulatus*: 11790 $\mu\text{g/kg}$ s.u., respectiv 6640 $\mu\text{g/kg}$ s.u. Ordinea concentrațiilor de metale grele a fost următoarea: $\text{Cu} > \text{Cr} > \text{Ni} > \text{Pb} > \text{Cd}$ la *H. guttulatus* și $\text{Cu} > \text{Ni} > \text{Cr} > \text{Pb} > \text{Cd}$ la *S. acus* (Fig. 3.6.1).

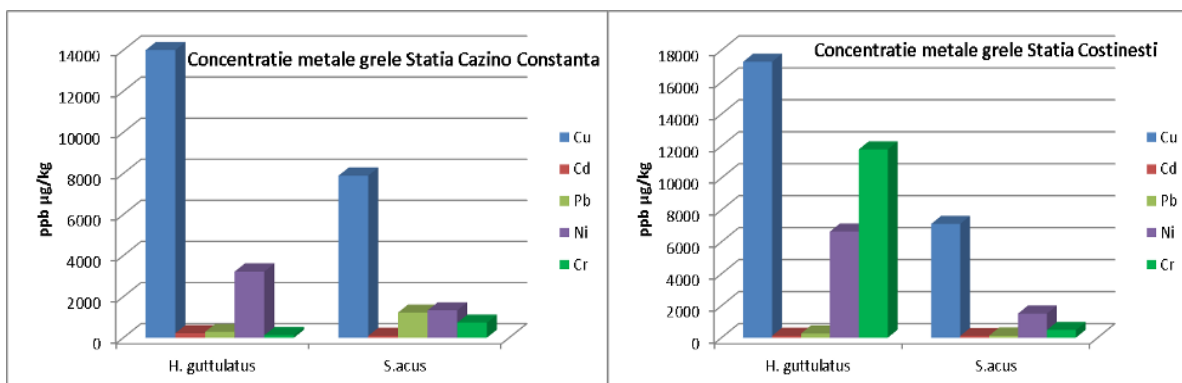
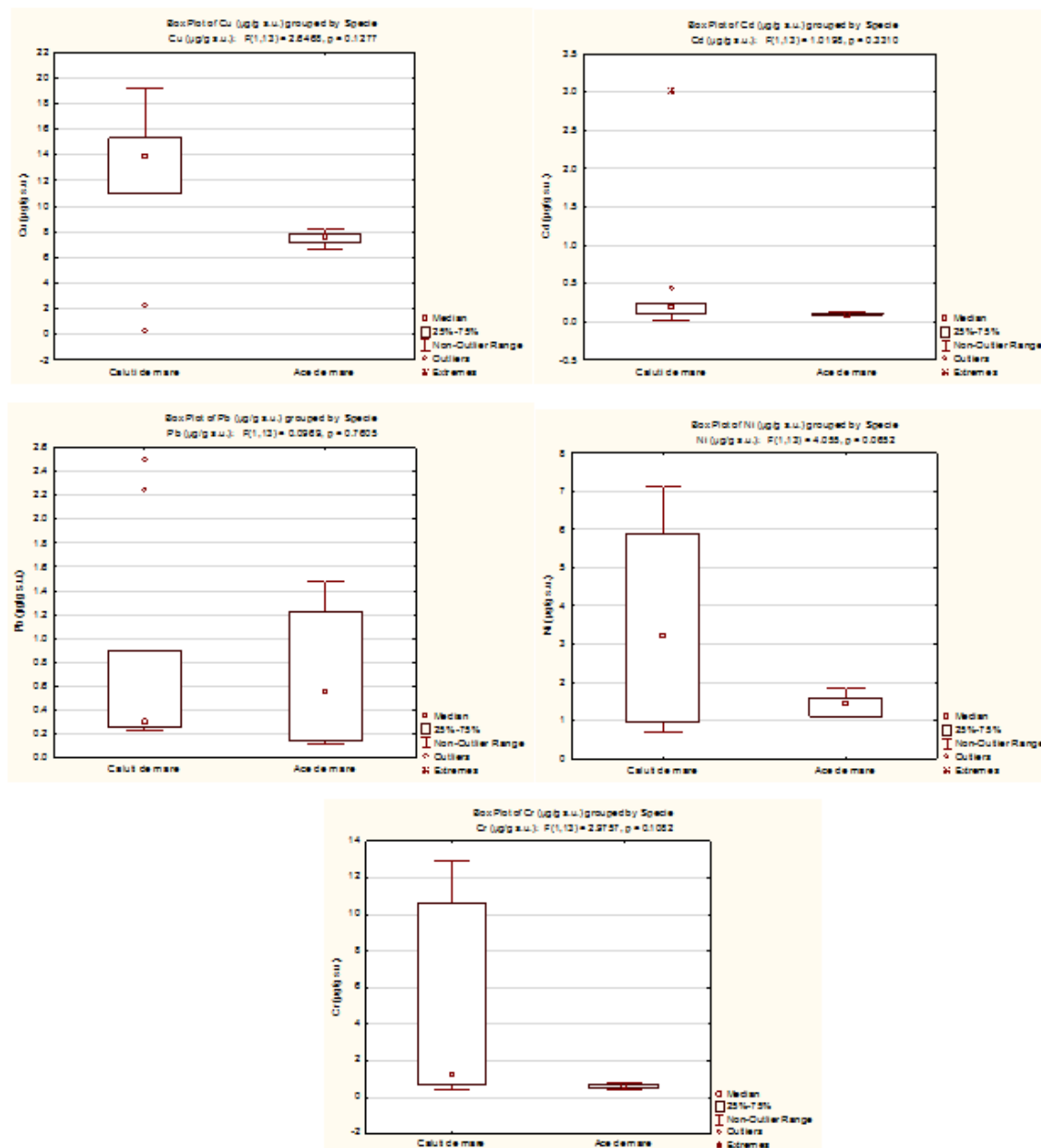


Fig. 3.6.1. Concentrația de metale grele în biotă în Stațiile Cazino Constanța și Costinești (2014).

Fig. 3.6.2. Comparație între nivelurile de Cu, Cd, Pb, Ni și Cr din țesutul integral de *H. guttulatus* și *S. acus*.

În probele de apă, datorită proceselor de diluție și variabilității naturale, concentrațiile de metale grele au fost diminuate, în ambele stații. Cu toate acestea, se remarcă valorile mai ridicate înregistrate de plumb în ambele stații (3,05 $\mu\text{g/l}$ la Cazino Constanța și 2,95 $\mu\text{g/l}$ la Costinești). Și cromul a înregistrat valori crescute în ambele locații. Valori ridicate au fost înregistrate și de cupru la Cazino Constanța (1,64 $\mu\text{g/l}$) și crom la Costinești (1,81 $\mu\text{g/l}$). Cadmiul a înregistrat cele mai mici valori în ambele stații de prelevare: 0,84 $\mu\text{g/l}$ la Cazino Constanța și 0,86 $\mu\text{g/l}$ la Costinești (Fig. 3.6.3). Ordinea concentrațiilor celor cinci metale grele în apă a fost următoarea: la Cazino Constanța $\text{Pb} > \text{Cu} > \text{Ni} > \text{Cr} > \text{Cd}$, iar la Costinești $\text{Pb} > \text{Cr} > \text{Ni} > \text{Cd} > \text{Cu}$.



În **sedimentele marine**, ordinea concentrațiilor celor cinci metale grele analizate a fost următoarea: la Cazino Constanța $Ni > Cr > Cu > Pb > Cd$, iar la Costinești $Cr > Ni > Cu > Pb > Cd$. Se remarcă valorile ridicate ale nichelului acumulat în sedimente la Cazino Constanța (73090 $\mu\text{g/kg}$ s.u.), dar și la Costinești (50530 $\mu\text{g/kg}$ s.u.). De asemenea, și cromul a înregistrat valori ridicate, cu valoarea maximă la Costinești (79120 $\mu\text{g/kg}$ s.u.), și 48930 $\mu\text{g/kg}$ s.u. la Cazino Constanța. Cele mai mici valori în sedimente s-au înregistrat la cadmiu: 210 $\mu\text{g/kg}$ s.u. la Cazino Constanța și 170 $\mu\text{g/kg}$ s.u. la Costinești (Fig. 3.6.3).

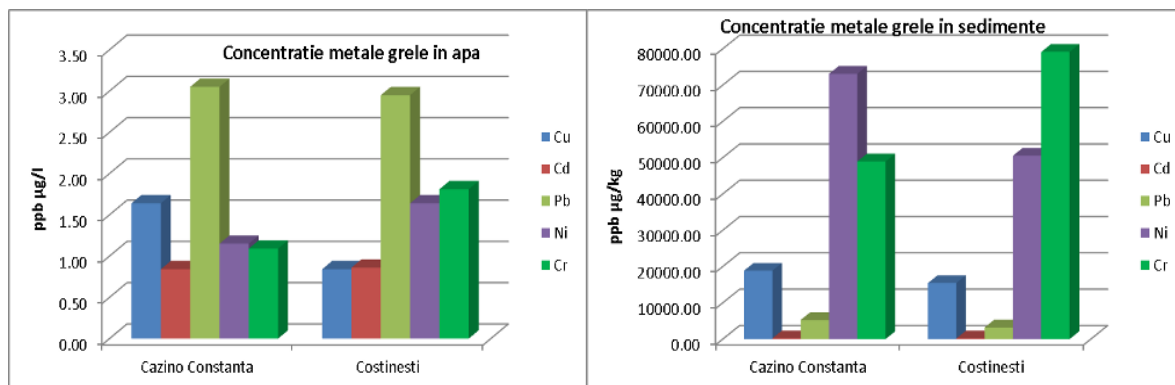


Fig. 3.6.3. Concentrația de metale grele în probele de apă și sedimente (2014).

Per total, iese în evidență concentrația ridicată înregistrată de cupru în ambele stații de prelevare, la ambele specii, ceea ce atrage atenția asupra necesității identificării sursei potențiale de contaminare.

Aplicând formulele de calcul menționate anterior, s-au obținut următoarele valori pentru **factorul de bioconcentrare** și **factorul de bioacumulare biota-sediment** (cu roșu depășiri de valori limită) (Tabel 3.6.2):

Tabel 3.6.2. Valorile BCF și BSAF înregistrate pentru *H. guttulatus* și *S. acus* în cele două stații de prelevare (2014).

Stația Cazino Constanța	Cu	Cd	Pb	Ni	Cr
BCF <i>H. guttulatus</i>	8536,58 ^c	261,9	91,8	2800 ^{a,b}	110,09
BSAF <i>H. guttulatus</i>	0,74	1,04 ^d	0,05	0,04	0,002
BCF <i>S. acus</i>	4819,97 ^{a,b}	107,14	400	1156,52 ^a	669,72
BSAF <i>S. acus</i>	0,41	0,42	0,23	0,018	0,014
Stația Costinești	Cu	Cd	Pb	Ni	Cr
BCF <i>H. guttulatus</i>	20599,52 ^c	139,53	88,13	4048,78 ^{a,b}	6513,81 ^c
BSAF <i>H. guttulatus</i>	1,11 ^d	0,7	0,08	0,13	0,14
BCF <i>S. acus</i>	8476,19 ^c	127,9	44,06	920,73	265,19
BSAF <i>S. acus</i>	0,46	0,64	0,04	0,02	0,006

^a BCF ≥ 1000 (bioacumulator) (REACH)

^b BCF ≥ 2000 (bioacumulator) (TSCA)

^c BCF ≥ 5000 (foarte bioacumulator) (REACH & TSCA)

^d BSAF > 1 (microconcentrator) (Dallinger, 1993)

^e BSAF > 2 (macroconcentrator) (Dallinger, 1993)

BSAF < 1 (deconcentrator) (Dallinger, 1993)

În concordanță cu nivelurile mari ale concentrațiilor înregistrate de cupru în ambele specii studiate, valoarea maximă a Factorului de Bioconcentrare (BCF) a fost înregistrată pentru acest element în ambele stații de prelevare la ambele specii (Fig. 3.6.4 a și b). Astfel, conform valorilor înregistrate la specia *H. guttulatus*, cuprul este *foarte bioacumulator*, valoarea BCF fiind > 5000 , iar la *S. acus* este *foarte bioacumulator* la Costinești (BCF > 5000) și *bioacumulator* (BCF > 2000) la Cazino Constanța.

Un alt element *bioacumulator* este, conform rezultatelor obținute, nichelul, care a înregistrat depășiri în stația Cazino Constanța atât la *H. guttulatus*, cât și la *S. acus* (BCF > 2000). Și în stația Costinești, valoarea nichelului a condus la concluzia că este *bioacumulator* (BCF > 2000), însă numai la specia *H. guttulatus*. Tot în Stația Costinești, o valoare foarte mare a Factorului de Bioconcentrare a fost înregistrată și de crom (BCF > 5000), la căluțul de mare.

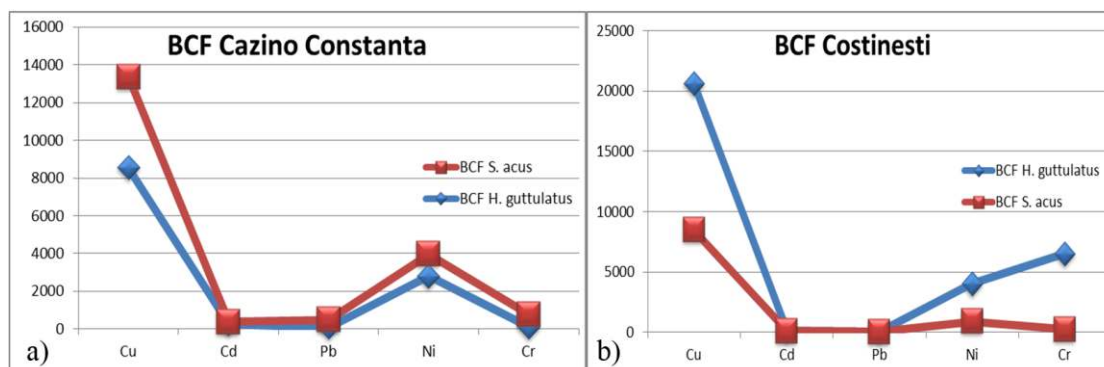


Fig. 3.6.4. Valorile Factorului de Bioconcentrare (BCF) în cele două stații (2014).



Valorile Factorului de Bioacumulare Biota-Sediment (BSAF) înregistrate la acul de mare au fost mici (<1), în vreme ce la căluțul de mare s-au înregistrat valori depășite doar la cadmiu (Constanța) și cupru (Costinești) (BSAF >1). Celelalte elemente au înregistrat valori ce le clasifică drept deconcentratore (BSAF < 1) (Fig. 3.6.5 a și b).

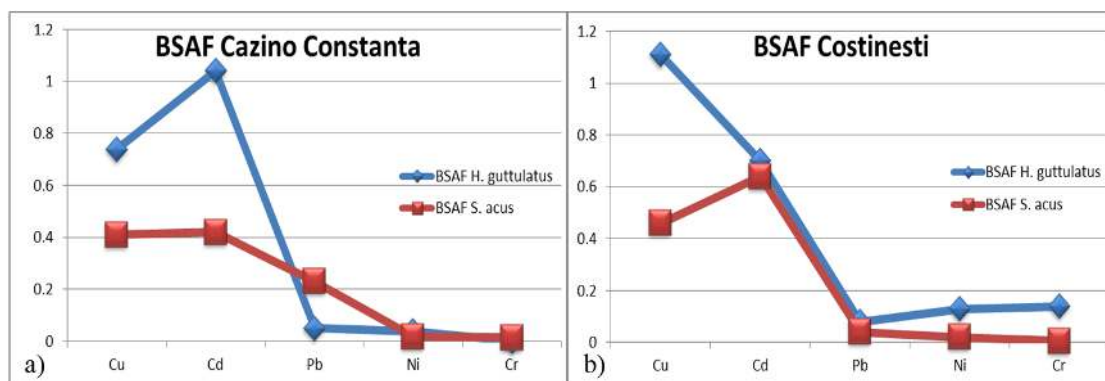


Fig. 3.6.5. Valorile Factorului de Bioacumulare Biota-Sediment (BSAF) în cele două stații (2014).

BCF și BSAF la specia *Hippocampus guttulatus* (2013)

Formulele de calcul pentru factorul de bioconcentrare și factorul de bioacumulare biota-sediment s-au aplicat și pentru datele de contaminare cu metale grele din 2013 (nivelurile înregistrate în 2013 de cele cinci metale grele analizate în probele de țesut de *H. guttulatus*, Cu, Cd, Cr, Ni și Pb, sunt detaliate în Subcapitolul 3.5. *Investigarea acumulării de poluanți în țesutul global de căluț de mare Hippocampus guttulatus* din prezenta teză).

Valoarea maximă în probele de **apă** s-a înregistrat la crom în stația Cazino-Constanța (8,4 ppb). Mai spre sud, la Saturn-Venus, cromul a atins nivelul de 4,3 ppb, iar la Mangalia 1 ppb, observându-se diferențe mari între stații. Cuprul, însă, a înregistrat concentrații descrescătoare de la sud la nord: 4,1 ppb la Mangalia, 2,3 ppb la Saturn-Venus și 1,3 ppb în Cazino-Constanța (Nenciu et al., 2014a) (Fig. 3.6.6). Și cadmiul a înregistrat valoarea maximă la Mangalia (1 ppb), urmată de 0,6 ppb la Cazino-Constanța și 0,3 ppb la Saturn-Venus. Valoarea maximă pentru plumb s-a înregistrat la Saturn-Venus (2,4 ppb), iar în stațiile Cazino-Constanța și Mangalia concentrațiile au fost mult mai mici (0,7 ppb, respectiv 0,5 ppb). Nichelul a înregistrat concentrația maximă la Cazino-Constanța (1,3 ppb), urmată de concentrații apropiate la Saturn-Venus (0,9 ppb) și Mangalia (0,8 ppb). Per total, gradul cel mai înalt de contaminare al apei marine cu metale grele s-a înregistrat în stația Cazino-Constanța (12,5 ppb), urmată de Saturn-Venus (10,3 ppb) și Mangalia (7,5 ppb). Valoarea maximă în probele de **sedimente** s-a înregistrat la cupru în stația Cazino-Constanța (43540 ppb s.u.), urmată de Mangalia (12460 ppb s.u.), iar valoarea minimă s-a înregistrat la Saturn-Venus (5010 ppb s.u.).

Și cadmiul a înregistrat concentrația maximă la Cazino-Constanța (1910 ppb s.u.), în timp ce la Saturn-Venus și Mangalia s-au înregistrat valori mult mai mici (120 ppb s.u. și, respectiv 60 ppb s.u.) (Fig. 3.6.6).

Valoarea maximă în țesutul de *H. guttulatus* s-a înregistrat la cupru în stația Saturn-Venus (5560 ppb s.u.). Tot cuprul a înregistrat o valoare ridicată la Mangalia (2190 ppb s.u.), în timp ce la Cazino-Constanța a atins doar 220 ppb s.u. Și cadmiul a înregistrat valoarea maximă tot la Saturn-Venus (1510 ppb s.u.), urmată de Mangalia (440 ppb s.u.) și Cazino-Constanța (20 ppb s.u.) (Fig. 3.6.7).

Concentrațiile înregistrate de plumb au fost apropiate la Saturn-Venus (2500 ppb s.u.) și Mangalia (2250 ppb s.u.), în timp ce la Cazino-Constanța valoarea a fost mult mai mică (900 ppb s.u.). Nichelul a înregistrat valori comparabile între cele 3 stații (820 ppb s.u. - Cazino-Constanța, 950 ppb s.u. - Saturn-Venus și 690 ppb s.u. - Mangalia), la fel și cromul (430 ppb s.u. - Cazino-Constanța, 670 ppb s.u. - Saturn-Venus și 530 ppb s.u. - Mangalia).

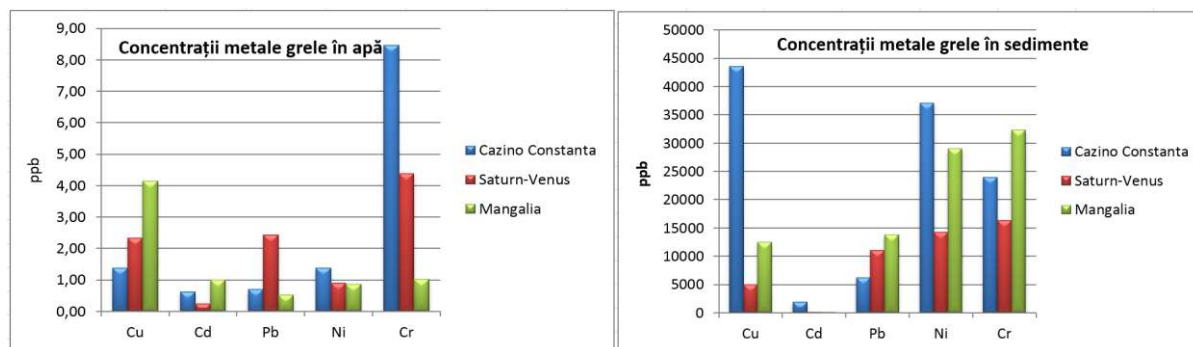
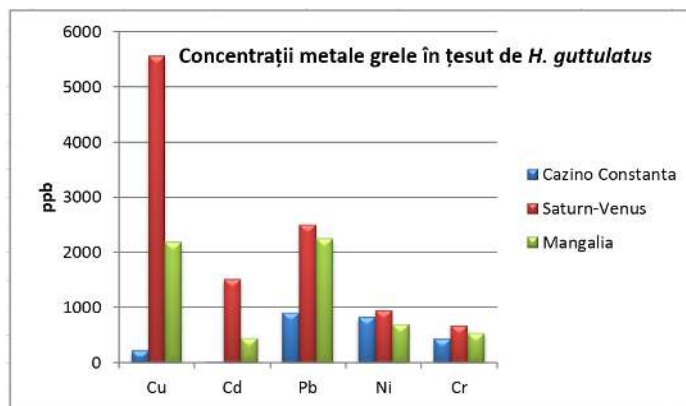


Fig. 3.6.6. Concentrațiile de metale grele în apă și sedimente (2013).

Din cauza nivelurilor ridicate de cupru și plumb, stația Saturn-Venus a rezultat ca fiind cea mai contaminată cu metale grele (total 11190 ppb s.u.), urmată de Mangalia (6100 ppb s.u.) și Cazino-Constanța (2390 ppb s.u.).

Fig. 3.6.7. Concentrațiile de metale grele din țesutul de *H. guttulatus* (2013).

Tabelul 3.6.3. prezintă valorile BCF și BSAF înregistrate pentru *H. guttulatus* în cele trei stații de prelevare din 2013, cu roșu fiind marcate depășirile de praguri. Marcajul cu galben indică a valoare foarte mare a Factorului de Bioconcentrare înregistrată la cadmiu.

Cel mai ridicat BCF s-a înregistrat la Cd în stația Saturn-Venus ($6291 \geq 5000$ = foarte bioacumulator și la Pb la Mangalia ($4326 \geq 1000$) = bioacumulator. Alte depășiri semnificative au fost înregistrate de (Fig. 3.6.8): Cu la Saturn-Venus ($2376 \geq 1000$) = bioacumulator; Pb la Cazino-Constanța ($1285 \geq 1000$) = bioacumulator; Ni la Saturn-Venus ($1055 \geq 1000$) = bioacumulator; Pb la Saturn-Venus ($1024 \geq 1000$) = bioacumulator.

Tabel 3.6.3. Valorile BCF și BSAF înregistrate pentru *H. guttulatus* în cele trei stații de prelevare (2013) (Nenciu et al., 2014a).

Metale grele					
Factor	Cu	Cd	Pb	Ni	Cr
Stația Cazino-Constanța					
BCF	159	31	1285 ^a	594	50
BSAF	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
Stația Saturn-Venus					
BCF	2376 ^b	6291 ^c	1024 ^a	1055 ^a	152
BSAF	1,1 ^d	12,5 ^e	< 1	< 1	< 1
Stația Mangalia					
BCF	528	435	4326 ^b	793	519
BSAF	< 1	7,3 ^e	< 1	< 1	< 1
^a BCF ≥ 1000 (bioacumulator) (REACH)			^d BSAF > 1 (microconcentrator) (Dallinger, 1993)		
^b BCF ≥ 2000 (bioacumulator) (TSCA)			^e BSAF > 2 (macroconcentrator) (Dallinger, 1993)		
^c BCF ≥ 5000 (foarte bioacumulator) (REACH & TSCA)					

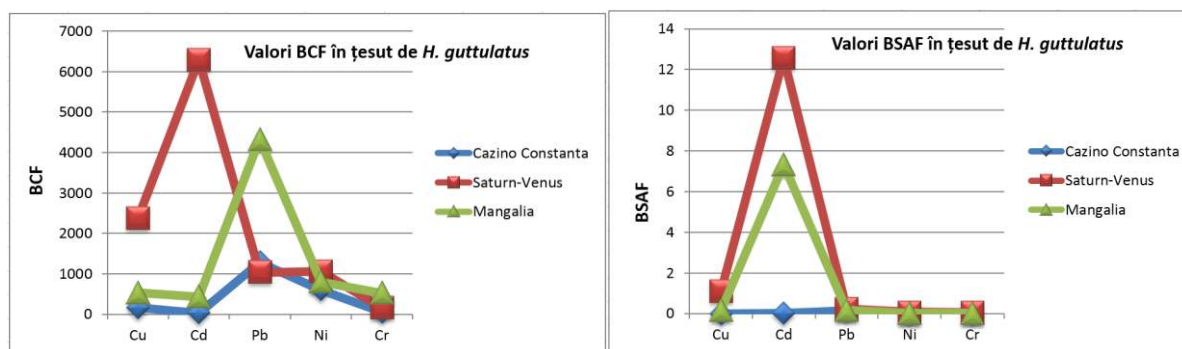


Fig. 3.6.8. Valorile Factorului de Bioconcentrare (BCF) și ale Factorului de Bioacumulare Biota-Sediment (BSAF) în cele trei stații (2013) (Nenciu et al., 2014a).

Cu toate că *H. guttulatus* nu este o specie bentică propriu-zisă, s-au calculat și valorile BSAF, dat fiind că specia populează zonele din apropierea substratului, agățată de talurile algelor macrofite, ceea ce o face susceptibilă la bioacumulare din sedimentele contaminate. S-au înregistrat depășiri ale valorilor limită indicate în literatura de specialitate la: Cd ($12,5 > 2$) la Saturn-Venus = macroconcentrator, Cd ($7,3 > 2$) la Mangalia = macroconcentrator, Cu ($1,1 > 1$) la Saturn-Venus = microconcentrator (Fig. 3.6.8).

Corelații statistice între valorile metalelor grele înregistrate în apă, sedimente și biota (2013, 2014)

Pentru a determina corelațiile statistice ce se stabilesc între concentrațiile de metale din țesutul integral de *H. guttulatus*, *S. acus* și alte specii de pești, precum și cele din apă și sediment, datele obținute în 2013 și 2014 au fost analizate utilizând soft-ul



Statistica v. 10. Reprezentarea grafică a valorilor înregistrate permite rezumarea concentrațiilor celor cinci metale înregistrate pe durata perioadei de cercetare la cele două specii vizate.

Rezultatele pentru *H. guttulatus* sunt prezentate în Fig. 3.6.9-3.6.10. Reiese foarte clar că, în 2014, în stația Costinești s-au înregistrat niveluri ridicate de Cu, Ni și Cr, în vreme ce Cd și Pb au înregistrat valori scăzute. Este interesant de remarcat că, în afară de Pb, în stația Cazino-Constanța, în anul 2014 s-au înregistrat valori mai mari comparativ cu anul 2013.

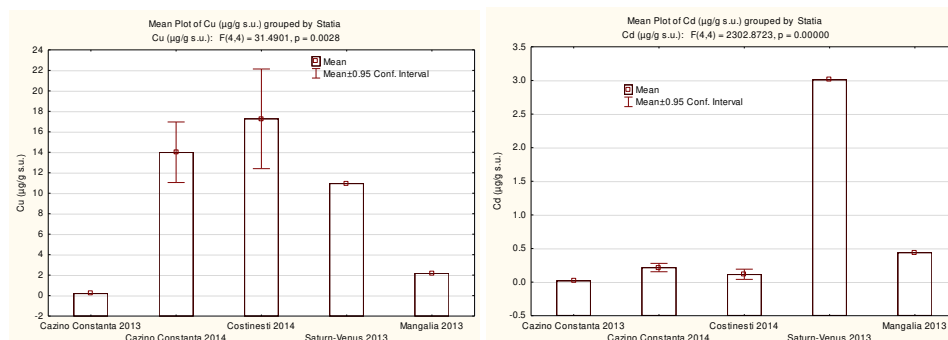


Fig. 3.6.9. Concentrațiile Cu și Cd înregistrate în țesutul de *H. guttulatus* (2013, 2014).

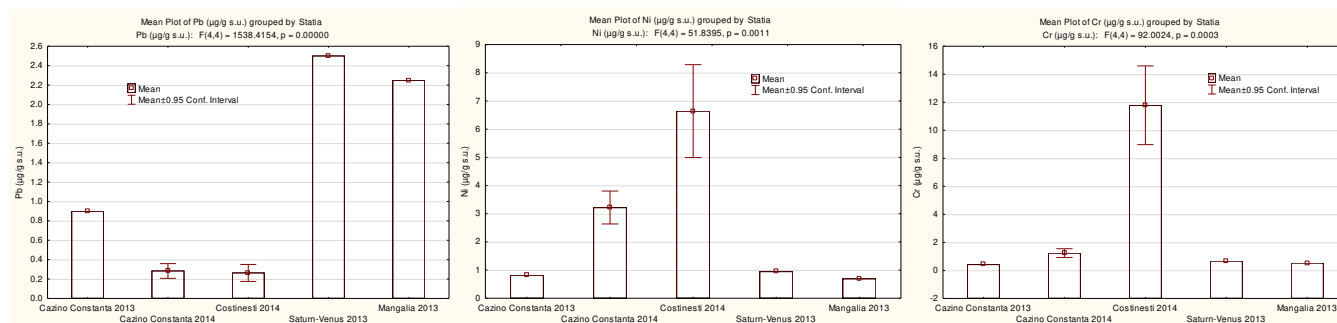


Fig. 3.6.10. Concentrațiile Pb, Ni și Cr înregistrate în țesutul de *H. guttulatus* (2013, 2014).

Rezultatele pentru *S. acus* sunt prezentate în Fig. 3.6.11-3.6.12. Referitor la concentrațiile de metale înregistrate în țesutul de *S. acus*, pentru trei dintre elemente (Cu, Pb și Cr), valori mai mari au fost înregistrate în stația Cazino-Constanța, în timp ce Cd și Ni au înregistrat valori mai ridicate în stația mai sudică - Costinești.

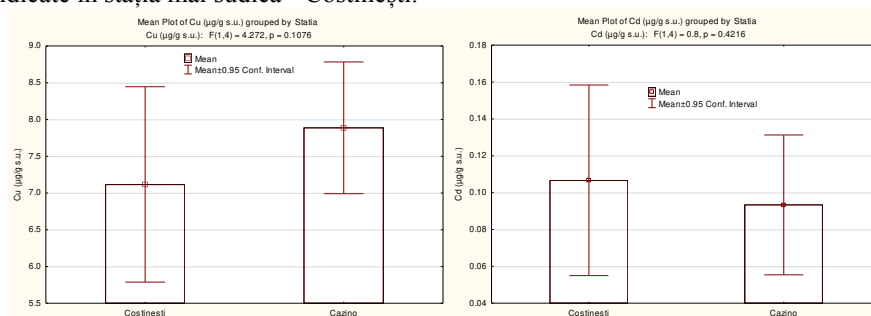


Fig. 3.6.11. Concentrațiile Cu și Cd înregistrate în țesutul de *S. acus* (2014).

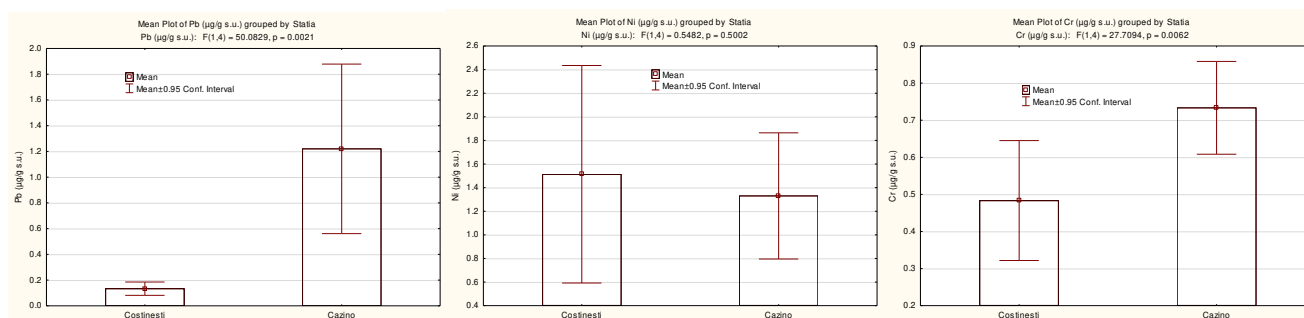


Fig. 3.6.12. Concentrațiile Pb, Ni și Cr înregistrate în țesutul de *S. acus* (2014).

În ceea ce privește corelația dintre concentrațiile înregistrate de biota (*H. guttulatus* și *S. acus*) și cele din apa de mare, s-a observat o corelație pozitivă doar pentru Cu ($p < 0,05$) și Pb ($p > 0,05$, nesemnificativă din punct de vedere statistic) (Fig. 3.6.13-3.6.14).

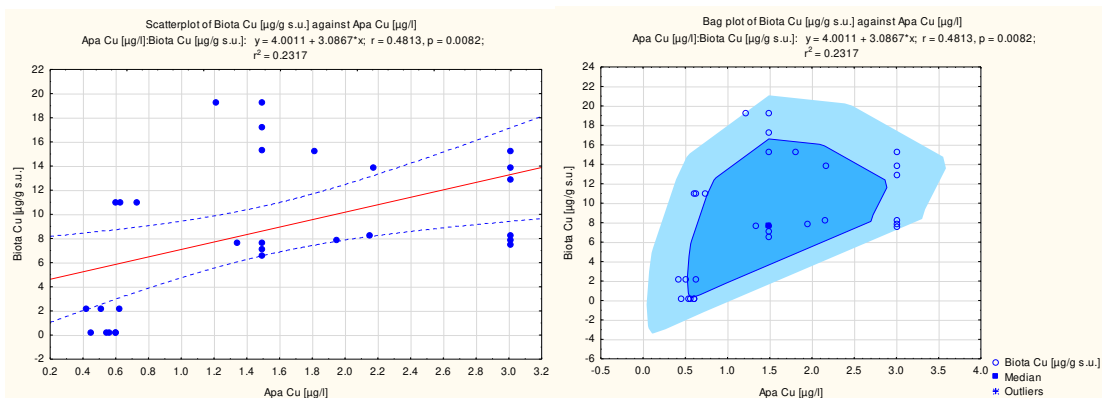


Fig. 3.6.13. Corelația între concentrațiile Cu înregistrate de biota și cele din apa de mare (2013-2014).

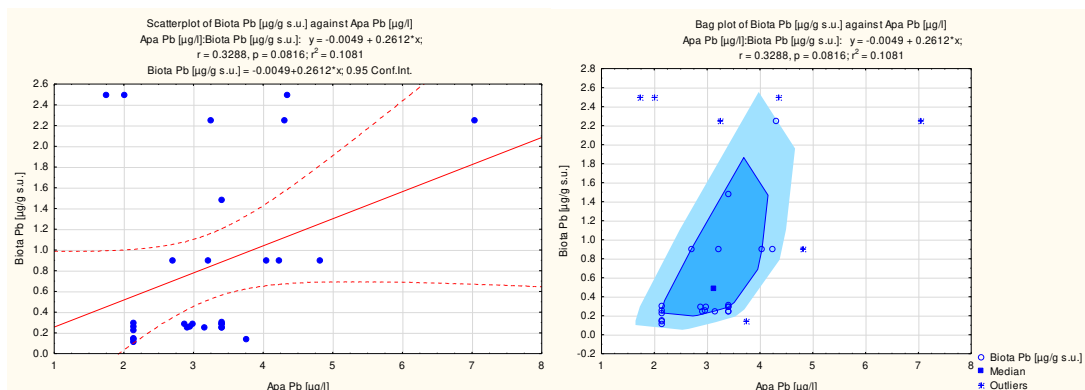


Fig. 3.6.14. Corelația între concentrațiile Pb înregistrate de biota și cele din apa de mare (2013-2014).

Pentru sedimente, singura corelație pozitivă stabilită pornind de la valorile din biota a fost pentru elementul Pb, însă nesemnificativ statistic ($p > 0,05$) (Fig. 3.6.15).

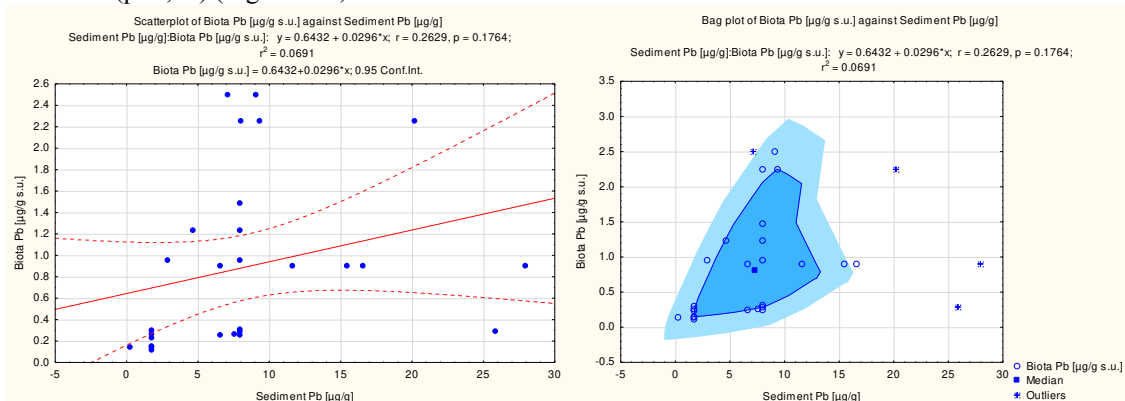
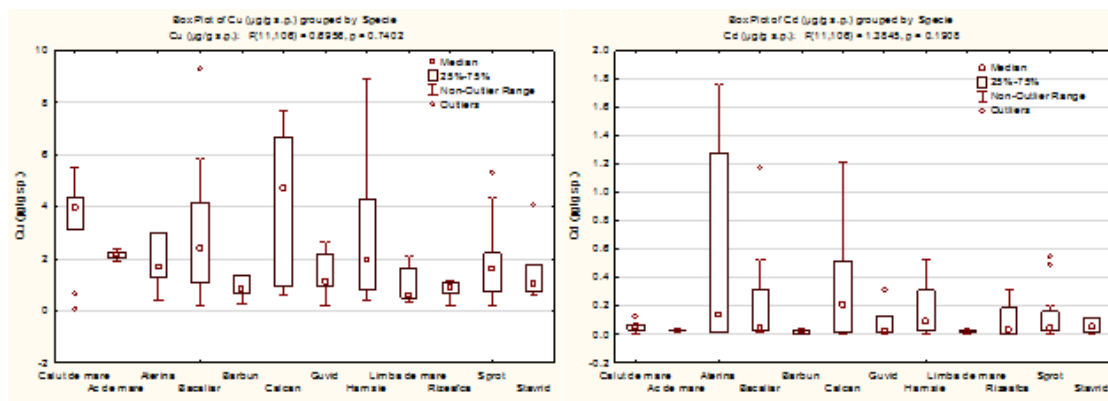


Fig. 3.6.15. Corelația între concentrațiile Pb înregistrate de biota și cele din sedimente (2013-2014).

Având în vedere nivelurile de bioacumulare a metalelor grele înregistrate la cele două specii studiate, a fost interesant să se compare aceste valori cu cele înregistrate de cele cinci metale grele la alte specii de pești (Fig. 3.6.16) și moluște (Fig. 3.6.17) de la litoralul românesc al Mării Negre.



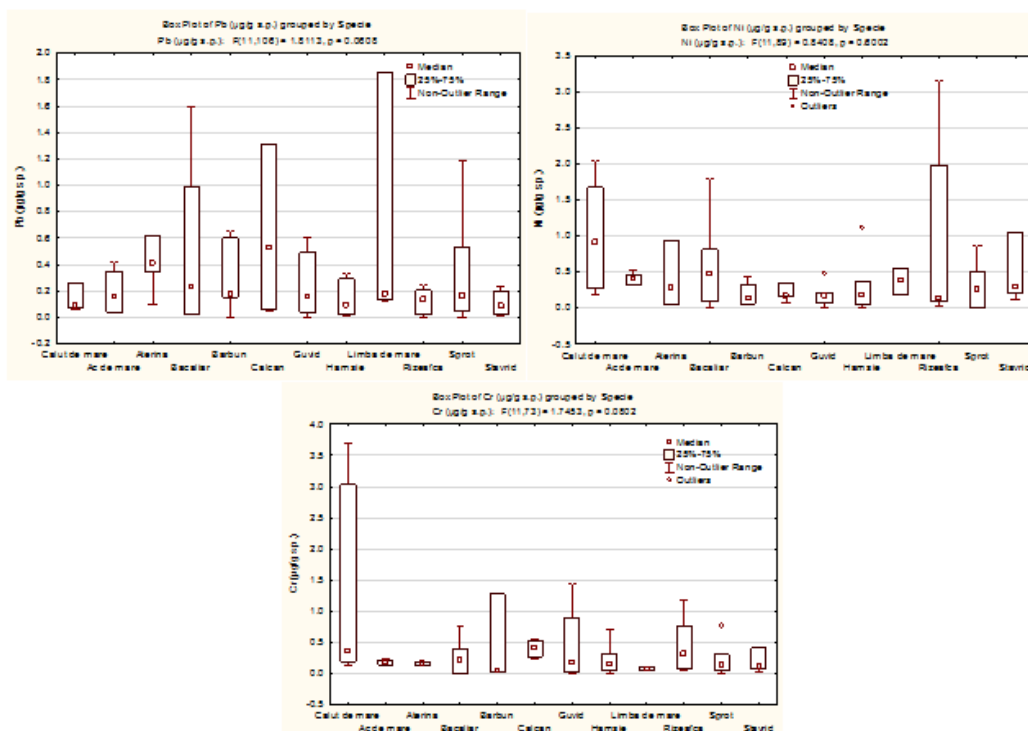


Fig. 3.6.16. Niveluri de contaminare cu metale grele la Syngnathidae comparativ cu alte specii de pești din apele românești ale Mării Negre.

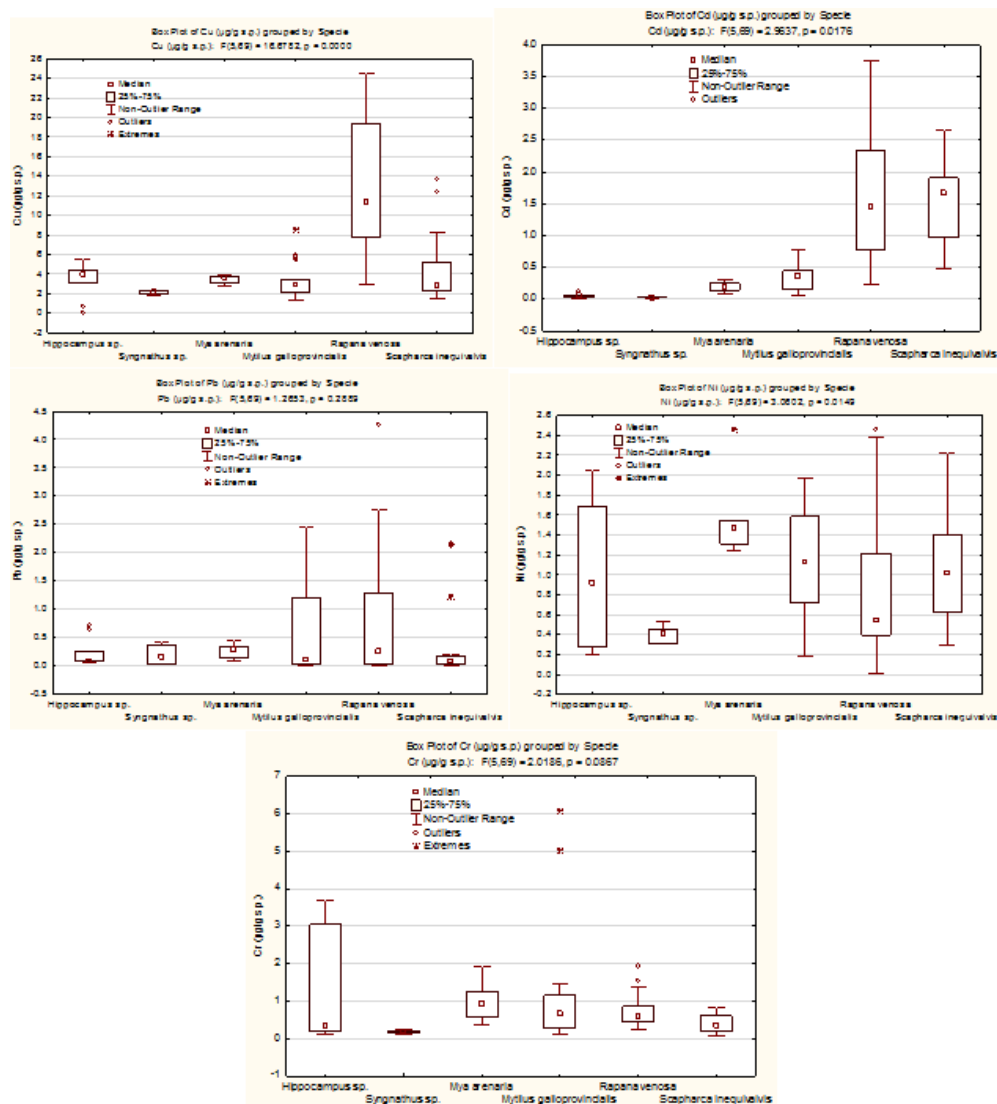


Fig. 3.6.17. Niveluri de contaminare cu metale grele la Syngnathidae comparativ cu specii de moluște din apele românești ale Mării Negre.



Valorile foarte ridicate înregistrate de cupru în țesuturile anumitor organisme marine pot fi explicate de prezența hemocianinei, o proteină respiratorie sub formă de metaloproteine care conține doi atomi de cupru, care se leagă reversibil cu o moleculă de oxigen. Hemocianina dezoxigenată este incoloră, iar prezența oxigenului îi conferă o culoare albastră („sânge albastru”). Ea transportă oxigenul în hemolimfa (sângele nevertebratelor) unor moluște și la majoritatea artropodelor. Acest lucru explică valorile mari înregistrate de Cu la *Rapana venosa* și celelalte moluște analizate. Cu toate acestea, nu este cazul Syngnathidae și celorlalte specii de pești din Marea Neagră, care, fiind vertebrate, au în sânge pigmentul respirator hemoglobină (Rainbow et al., 1989). În consecință, sursa de cupru este probabil una externă și, cel mai sigur, de origine antropică.

Rezultatele obținute au demonstrat că atât căluții, cât și acele de mare colectate din apele puțin adânci bioacumulează metale grele la rate diferite, înregistrându-se diferențe semnificative ($p < 0,05$, testul T) și între stațiile de prelevare. Spre exemplu, în 2014, cuprul a înregistrat nivelurile cele mai ridicate la ambele specii. Valori mari au fost înregistrate la căluțul de mare pentru nichel și crom (Costinești), iar la acul de mare pentru plumb (Constanța).

3.7. Cercetări privind contaminarea cu hidrocarburi aromatice polinucleare (HAP) a Syngnathidae din apele litorale românești

Hidrocarburi aromatice polinucleare sunt rezultatul arderii incomplete a cărbunelui, petrolului, gazului, lemnului etc., iar alte surse antropice HAP-uri pot fi deversările de petrol, deșeurile industriale sau deversările de la stațiile de epurare a apelor uzate (Țigănuș et al., 2013). Principalele căi de introducere a HAP-urilor în mediul marin sunt depunerile atmosferice, deșeurile și deversările industriale ori produsele petroliere ce ajung direct în mediul marin (Țigănuș, 2015). Contaminarea apelor marine și mai ales a sedimentelor afectează bentosul marin, prin faptul că acești compuși se depozitează și acumulează în substrat, devenind o sursă de substanțe toxice. Syngnathidae sunt specii de pești care trăiesc în apropierea substratului, fiind dependente de vegetația care se dezvoltă pe acesta, în consecință pot fi afectate de HAP-urile acumulate în sedimente. Analizele probelor colectate în 2013 au confirmat faptul că specia *H. guttulatus* bioacumulează acest tip de compuși, în ciuda conținutului său scăzut de lipide.

Prezența cercetare a vizat realizarea unei comparații a nivelurilor de bioacumulare a HAP-urilor la cele două specii de Syngnathidae luate în studiu: *H. guttulatus* și *S. acus*. Metodologia de eșantionare (probele au fost prelevate din două stații situate în sudul litoralului românesc al Mării Negre, Cazino-Constanța și Costinești), precum și cea de efectuare a analizelor specifice de laborator sunt detaliate în Subcapitolele 2.1. Colectarea probelor și 2.7. Determinarea concentrației de hidrocarburi aromatice polinucleare (HAP).

În urma analizării probelor de țesut, s-a constatat că cea mai mare concentrație la *H. guttulatus* s-a înregistrat pentru benzo[a]antracen în stația Costinești (876,2 ng/g m.p.), în timp ce ceilalți compuși poliaromatici au înregistrat valori scăzute (Fig. 3.7.1). În țesutul de *S. acus*, tot benzo[a]antracenul a înregistrat valoarea maximă, dar de această dată în stația Cazino Constanța (59,2 ng/g m.p.). O valoare relativ apropiată a avut și benzo(g,h,i)perilenul în stația Costinești (58,6 ng/g m.p.) (Fig. 3.7.1).

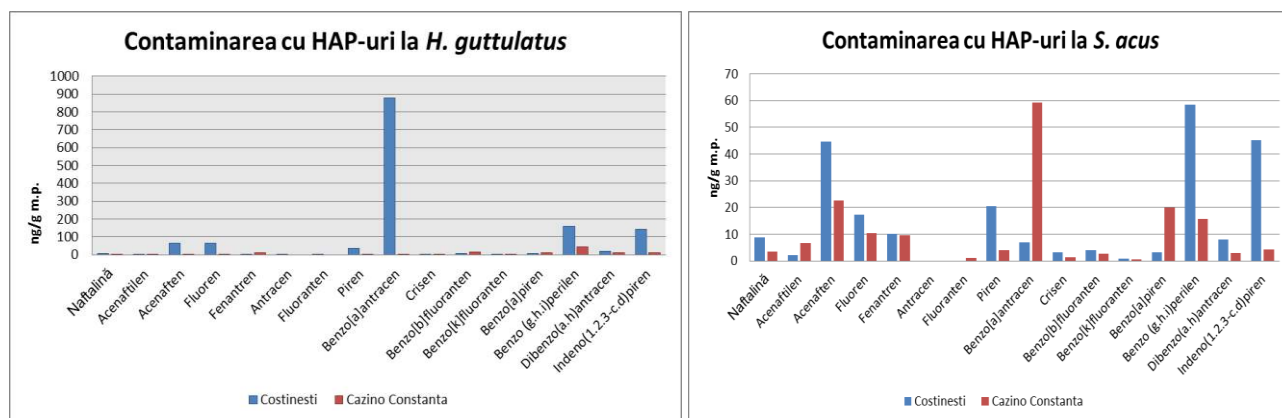
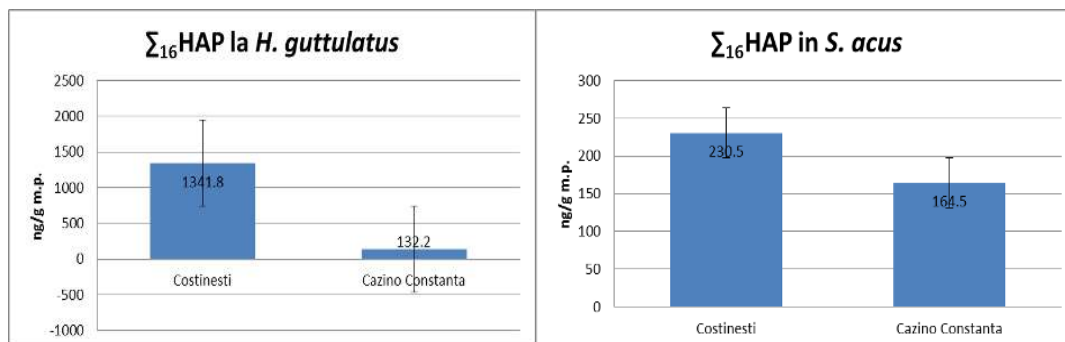


Fig. 3.7.1. Contaminarea cu hidrocarburi aromatice polinucleare la speciile *H. guttulatus* (stg.) și *S. acus* (dr.) pe compuși (2014).

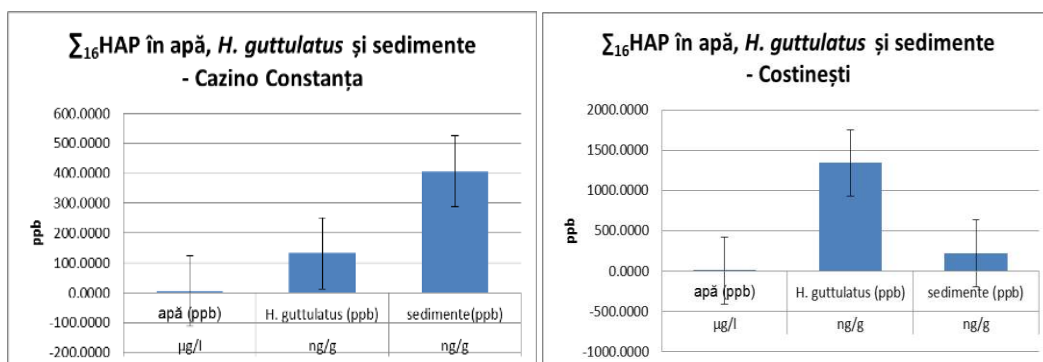
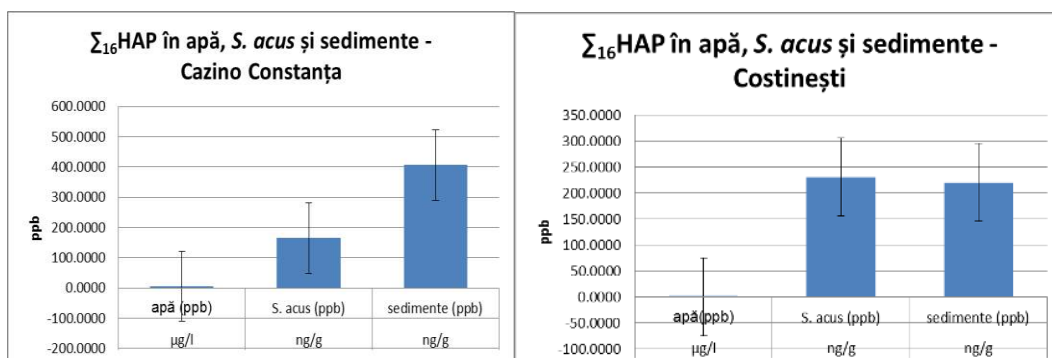
Sursele de benzo(g,h,i)perilen în mediul marin sunt emisiile de gaze de eșapament și cele rezultate în urma arderii lemnului și a cărbunelui, efluenții industriali, deversările de la stațiile de epurare a apelor uzate, incineratoarele de deșeuri și topitoriile de aluminiu. Cantități reziduale se găsesc și în fumul de țigară. Benzo(g,h,i)perilenul este toxic și se suspectează că este carcinogen. La acul de mare, antracenul și fluorantenul au înregistrat valori foarte scăzute (sub limita de detecție) în ambele stații de prelevare. Cu toate că valorile înregistrate de suma celor 16 compuși aromatici au fost mult mai mari la *H. guttulatus*, se remarcă faptul că la *S. acus* s-au înregistrat valori mai apropiate între mai mulți compuși, în timp ce la *H. guttulatus* valoarea mare este dată de concentrația foarte ridicată a benzo[a]antracenului: $\sum_{16} \text{HAP} = 737 \text{ ng/g m.p.}$ la *H. guttulatus*, respectiv $\sum_{16} \text{HAP} = 197,2 \text{ ng/g}$ la *S. acus*.

Per total, probele de biotă au rezultat ca fiind mai contaminate în stația Costinești, la ambele specii (Fig. 3.7.2).

Pe specii, căluții de mare au acumulat într-o mai mare măsură compuși poliaromatici, pe de-o parte datorită conținutului mare mare de lipide și, pe de altă parte, datorită mobilității lor mai scăzute comparativ cu acele de mare.

Fig. 3.7.2. Contaminarea cu Σ_{16} HAP la *H. guttulatus* și *S. acus* pe stații (2014).

În ceea ce privește valorile înregistrate în componentele de mediu, sedimentele au fost mai contaminate cu suma celor 16 compuși (Σ_{16} HAP) la Constanța (valoare sedimente Constanța 406,5 ng/g s.u., sedimente Costinești 220,5 ng/g s.u.). Și în apă s-au înregistrat concentrații mai ridicate tot la Constanța (5,71 $\mu\text{g/l}$), în vreme ce la Costinești valorile au fost mici (0,61 $\mu\text{g/l}$). Însă, așa cum s-a arătat anterior, în biota, la ambele specii studiate, cele mai mari concentrații de Σ_{16} HAP s-au înregistrat la Costinești (Fig. 3.7.3).

Fig. 3.7.3. Contaminarea cu Σ_{16} HAP a *H. guttulatus* comparativ cu nivelurile din apă și sedimente - Cazino Constanta și Costinești (2014).Fig. 3.7.4. Contaminarea cu Σ_{16} HAP a *S. acus* comparativ cu nivelurile din apă și sedimente - Cazino Constanta și Costinești (2014).

Potrivit lui Varanasi et al. (Varanasi et. al., 1993), organismele marine pot fi clasificate în patru categorii, în funcție de conținutul total de HAP-uri: *necontaminate*, *ușor contaminate*, *moderat contaminate* și *foarte contaminate* (Tabel 3.7.1.)

Tabel 3.7.1. Clasificarea probelor de *H. guttulatus* și *S. acus* în funcție de gradul de contaminare cu HAP-uri.

Clasificare		Cazino <i>H. guttulatus</i>	Costinești <i>H. guttulatus</i>	Cazino <i>S. acus</i>	Costinești <i>S. acus</i>
	Σ_{16} HAP (ng g ⁻¹ m.p.)	Σ_{16} PAHs (ng g ⁻¹ ww)			
		medie	medie	medie	medie
Necontaminate	<10	-	-	-	-
Ușor contaminate	10–99	-	-	-	-
Moderat contaminate	100–1000	132,2 ± 14,1		164,4 ± 22,7	230,5 ± 14,5
Foarte contaminate	>1000		1341,8 ± 84,1		

Rezultatele obținute au confirmat faptul că cele două specii de Syngnathidae (*H. guttulatus* și *S. acus*) studiate rețin compuși aromatici polinucleari din mediul marin, toate probele analizate fiind clasificate ca fiind contaminate într-o anumită măsură (o probă



foarte contaminată - țesutul de căluț de mare de la Costinești $1341,8 \pm 84,1$ ng/g m.p. și celelalte trei moderat contaminate, cu valori peste 100 ng/g m.p.).

Se remarcă faptul că, din probele de biota analizate, una singură a înregistrat un conținut total de $\sum_{16}\text{HAP}$ mai mare de 1000 (în țesutul de căluț de mare de la Costinești $1341,8 \pm 84,1$ ng/g m.p.), ceea ce clasifică această probă drept *foarte contaminată*. În cazul tuturor celorlalte probe s-au înregistrat valori mult mai mici (ace de mare Costinești: $230,5 \pm 14,1$ ng/g m.p.; ace de mare Constanța: $164,4 \pm 22,7$ ng/g m.p.; căluți de mare Constanța: $132,2 \pm 14,1$ ng/g m.p.), cu toate acestea tot sunt clasificate ca fiind *moderat contaminate*.

CONCLUZII GENERALE

Cercetarea de față a constituit un prim demers de studiere extensivă a Syngnathidaelor de la litoralul românesc al Mării Negre și s-a orientat pe cele trei categorii de obiective stabilite inițial, și anume de *îmbogățire a cunoștințelor privind biologia și ecologia speciilor vizate, de realizare de analize genetice pentru determinarea speciilor și de cuantificare a contaminării cu substanțe de origine antropică*. Atingerea acestor obiective s-a realizat printr-o serie de investigații ce au condus la formularea unor concluzii pertinente.

Caracterizarea speciilor din familia Syngnathidae

Familia Syngnathidae face parte din Ordinul Syngnathiformes și cuprinde căluții de mare (*Hippocampus* sp.), peștii tubulari și conductă și dragonii de mare - sea dragons. Cele mai vechi fosile de Syngnathidae datează din Miocenul Mediu (Sarmațianul Inferior, Orizontul Coprolitic) și au fost descoperite în Slovenia (Zalohar et al., 2009). Procesele evolutive au condus la transformarea unui pește cu formă convențională într-unul care nu mai arată ca un pește (Zalohar et al., 2012). Una dintre caracteristicile morfologice utilizate pentru încadrarea taxonomică a Syngnathidaelor este fuziunea structurilor craniene și de hrănire. Acest grup de pești extrem de atipici a definit Ordinul Syngnathiformes, având ca trăsătură comună faptul că toate familiile pe care le cuprinde includ indivizi cu fălcile/maxilarele sudate.

Familia Syngnathidae este una dintre cele mai mari familii ai cărei membri prezintă una dintre cele mai rare strategii reproductive din lumea animală: sarcina/gestația la masculi, definind gestația ca procesul de incubație a embrionilor ce are loc în interiorul organismului după contopirea dintre ovul și spermatozoid (Stolting & Wilson, 2007).

Căluțul de mare *H. guttulatus* (subfamilia Hippocampinae) este una dintre cele mai carismatice specii din Marea Neagră și, cu toate că aparent nu prezintă importanță economică (nu este o specie ce poate fi utilizată ca sursă de hrană pentru populație), suscită interes pentru utilizare fie ca bioresursă pentru medicina tradițională, fie în domeniul acvaristic, din ce în ce mai dezvoltat, fie pur și simplu este vândut ilegal ca suvenir și curiozitate. În apele românești ale Mării Negre, este semnalată de sursele bibliografice (Lourie et al., 2004; Foster & Vincent, 2004) prezența a 3 specii, și anume *H. guttulatus*, *H. hippocampus* și *H. fuscus*.

De asemenea, în Marea Neagră sunt citate mai multe specii din subfamilia Syngnathinae, aparținând la două genuri, *Syngnathus* și *Nerophis* (*S. typhle*, *S. schmidtii*, *S. variegatus*, *S. tenuirostris*, *S. abaster*, *N. ophidion*) (Radu & Radu, 2008). Pe durata celor trei ani de cercetări, au fost identificate în capturile complementare de la punctele pescărești situate de-a lungul litoralului românesc toate speciile citate de ace și aște de mare, și anume *S. typhle*, *S. schmidtii*, *S. variegatus*, *S. tenuirostris*, *S. abaster*, *N. ophidion*, însă, în ceea ce privește căluții de mare, singura specie identificată a fost *H. guttulatus*, aspect confirmat și de rezultatele analizelor genetice efectuate (Subcapitolul 3.3. *Analize genetice la specia H. guttulatus de la litoralul românesc al Mării Negre*).

Stabilirea corelației lungime - greutate la specia *Hippocampus guttulatus* de la litoralul românesc al Mării Negre

Principala concluzie a acestei cercetări a fost că, per total, exemplarele de *H. guttulatus* de la litoralul românesc al Mării Negre au o creștere alometrică negativă ($b = 2,72$), ceea ce înseamnă că lungimea exemplarelor crește mai repede comparativ cu greutatea acestora. Realizând o comparație a valorilor lungimii medii la exemplare de *H. guttulatus* din diferite regiuni marine, s-a constatat că lungimile căluților de mare de la litoralul românesc sunt comparabile cu cele înregistrate în partea sud-estică a Mării Negre, în vreme ce exemplarele din Marea Egee (Gulful Izmir) sunt mult mai mari, având dimensiuni comparabile cu cele de la coastele Atlanticului (Estuarul Arade, Portugalia). În ceea ce privește greutatea exemplarelor de *H. guttulatus*, a reieșit că indivizii din Marea Egee - Gulful Izmir sunt mult mai grei, diferența dintre aceștia și cei din Marea Neagră (atât din nord-vest, cât și din sud-est) fiind semnificativă din punct de vedere statistic. S-a observat, de asemenea, că exemplarele din Marea Neagră, indiferent de zona de colectare, înregistrează greutăți similare.

Pentru specia *H. guttulatus* nu s-au găsit date disponibile privind relația lungime - greutate în FishBase (Froese & Pauly, 2004), iar specia este clasificată de IUCN ca Data Deficient (DD) (Woodall, 2012), ceea ce confirmă necesitatea efectuării de cercetări viitoare, în vederea obținerii de date noi pentru Marea Neagră.

Analize genetice la specia *Hippocampus guttulatus* de la litoralul românesc al Mării Negre

În apele românești ale Mării Negre, este semnalată de sursele bibliografice (Lourie et al., 2004; Foster & Vincent, 2004) prezența a 3 specii (*H. guttulatus*, *H. hippocampus* și *H. fuscus*). La litoralul românesc, în lucrări mai recente, este semnalată o singură specie (Radu & Radu, 2008).

Rezultatele prezentei cercetări au condus la concluzia că exemplarele de *H. guttulatus* colectate de la litoralul românesc al Mării Negre au un cariotip cu valori diploide $2n = 44$ cromozomi și nu prezintă cromozomi diferențiați din punct de vedere sexual. După analiza la microscop a tipului de cromozomi, s-a constatat că specia *H. guttulatus* are 42 de cromozomi acrocentrici, și 2 cromozomi meta-submetacentrici, rezultând un număr fundamental de 46 brațe cromozomiale, $2\text{sm-m}+42\text{a}$; $\text{FN} = 46$.

S-a concluzionat că toate exemplarele analizate prin tehnica PCR-RFLP aparțin aceleiași specii, și anume *H. guttulatus*. Cu toate că în urma analizei ADNmt nu s-a identificat niciun polimorfism la exemplarele utilizate în prezentul studiu, este posibil ca rezultatele să fi fost influențate de numărul relativ redus de exemplare avute la dispoziție, precum și de faptul că acestea au fost colectate din aceeași zonă de prelevare. În consecință, este necesară continuarea acestor studii, utilizând exemplare de căluți de mare



capturate din locații diferite de-a lungul litoralului românesc, pentru a realiza amplificări ulterioare de ADNmt, precum și secvențieri de nucleotide, în vederea clarificării ipotezei prezenței uneia sau mai multor specii din genul *Hippocampus*.

Determinarea efectelor diferitelor regimuri de hrană vie asupra căluțului de mare *Hippocampus guttulatus*

Rezultatele experimentului de hrănire diferențiată a căluțului de mare au demonstrat o creștere lineară în lungime a exemplarelor de *H. guttulatus* în cazul tuturor celor trei regimuri de hrană lungimea finală (+10 zile) fiind mai mare decât cea înregistrată după +5 zile și, evident, cea inițială. Creșterea maximă în lungime s-a înregistrat la exemplarele din Acvariul C (unde s-a administrat regimul de hrană combinat *Brachionus plicatilis* + *Artemia salina*), urmată îndeaproape de regimul cu *A. salina* (Acvariul B). Cea mai redusă creștere în lungime s-a înregistrat la căluții de mare hrăniți exclusiv cu rotiferul *B. plicatilis* (Acvariul A). Referitor la variațiile de greutate, creșterea maximă s-a înregistrat tot la exemplarele din Acvariul C (unde s-a administrat regimul de hrană combinat *B. plicatilis* + *A. salina*), urmate de cele din Acvariul B (regimul cu *A. salina*) și Acvariul A (regimul cu rotiferul *B. plicatilis*).

Concluziile acestei cercetări preliminare sunt că un regim de hrană combinat cu rotiferi (*B. plicatilis*) și crustacee (*A. salina*) este cel mai recomandat pentru creșterea în captivitate a căluților de mare (*H. guttulatus*), datorită avantajelor pe care le prezintă fiecare dintre cele două nevertebrate. Pe de-o parte, rotiferii se dezvoltă în densități mari și au un conținut de proteine mai ridicat (care s-a reflectat și în conținutul de proteine al exemplarelor din loturile experimentale analizate), iar, pe de altă parte, crustaceele au un conținut de lipide mai ridicat și sunt mai ușor de vânat, fiind mai mari și mai vizibile în acvariu. Este recomandat să se experimenteze și cu alte regimuri de hrană, având în vedere că studii recente au demonstrat că Amphipoda, Anomura, Decapoda și Mysidacea par a fi categoriile de hrană predominante în mediul natural (Kitsos et al., 2008; Gurkan et al., 2011). Cercetări viitoare vor viza analizarea conținutului stomacal al exemplarelor de *H. guttulatus* rezultate din capturile complementare de la punctele pescărești situate de-a lungul litoralului românesc, tocmai pentru a determina cu acuratețe tipul de pradă preferat de această specie în Marea Neagră. Pe de altă parte, s-a constatat că și temperatura și salinitatea influențează metabolismul *H. guttulatus*. Creșterea temperaturii peste 23°C și scăderea salinității sub 14 PSU‰ au condus la modificări în compoziția biochimică a exemplarelor analizate. Sunt necesare cercetări ulterioare care să acopere o perioadă de timp mai lungă (minimum 30 zile), pentru a monitoriza modul în care relația lungime-greutate evoluează în timp în corelație cu regimul de hrană aplicat, precum și cu compoziția biochimică a exemplarelor de *H. guttulatus* hrănite diferențiat, bineînțeles fără a neglija factorii de mediu. De asemenea, trebuie luate în considerare și diferențele între sexe și între diferitele stadii de dezvoltare (juvenili vs. adulți). Obiectivul final al cercetărilor în această direcție este stabilirea unui regim de hrană optim pentru creșterea în captivitate a căluților de mare utilizând hrană vie ușor de obținut în mediul artificial.

Investigarea acumulării de poluanți în țesutul global al căluțului de mare *Hippocampus guttulatus*

Pornind de la lacunele de cunoștințe privind modul și proporția în care poluanții ajunși în mediul marin influențează căluții de mare de la litoralul românesc, studiul a vizat evaluarea bioacumulării de poluanți în țesutul global al speciei *H. guttulatus*. De asemenea, s-au determinat și o serie de parametri biochimici (substanță uscată, umiditate, proteină brută, lipidă brută, substanță minerală). Concluzia acestei cercetări a nivelului de bioacumulare a xenobioticelor în țesutul de *H. guttulatus* la litoralul românesc al Mării Negre confirmă ipoteza potrivit căreia căluții de mare, ca majoritatea speciilor marine, preiau substanțele ce ajung în mediul acvatic (Nenciu et al., 2014b).

Sintetizând, valorile înregistrate de pesticidele organoclorurate (POC) în țesutul de căluț de mare au arătat că, în ciuda conținutului scăzut de lipide comparativ cu alte organisme marine, căluții de mare bioacumulează compuși organoclorurați, care sunt absorbiți de obicei de țesutul gras. Niveluri totale mai ridicate de POC au fost înregistrate în stația Cazino-Constanța. În ceea ce privește conținutul total de hidrocarburi aromatice polinucleare (HAP) în țesutul de căluț de mare, probele analizate au demonstrat un grad mai mare de contaminare tot în stația Cazino-Constanța, descrescând către sud (probabil din cauza vecinătății Portului Constanța). La metalele grele, însă, cele mai mari valori (la cupru), s-au înregistrat într-una dintre stațiile sudice, Saturn-Venus, cel mai probabil din cauza traficului naval din zonă.

Toți acești compuși detectați în urma analizelor efectuate sunt extrem de toxici, chiar și în concentrații scăzute, în special atunci când se acumulează în situsurile metabolice active, și ar putea influența supraviețuirea unei specii extrem de sensibile cum este *H. guttulatus*. Este, așadar, necesar să se efectueze cercetări viitoare care să studieze modul în care pesticidele organoclorurate, hidrocarburi aromatice polinucleare și metalele grele influențează activitatea metabolică și enzimatică a căluțului de mare.

Studii privind bioacumularea de metale grele în țesutul global al căluțului de mare *Hippocampus guttulatus* și al acului de mare *Syngnathus acus* de la litoralul românesc exprimată prin Factorul de Bioconcentrare (BCF) și Factorul de Bioacumulare Biota-Sediment (BSAF)

Rezultatele obținute au demonstrat că atât căluții, cât și acele de mare colectate din apele puțin adânci bioacumulează metale grele la rate diferite, înregistrându-se diferențe semnificative și între stațiile de prelevare. Spre exemplu, în 2014, cuprul a înregistrat nivelurile cele mai ridicate la ambele specii. Valori mari au fost înregistrate la căluțul de mare și de nichel și crom (Costinești), iar la acul de mare de plumb (Constanța).

În 2014, Factorul de Bioconcentrare (BCF) a înregistrat valori ridicate la cupru (>5000, foarte bioacumulator) și nichel (>2000, bioacumulator) la ambele specii în Stația Constanța. La Costinești, rezultatele au fost similare la cupru (>5000, foarte bioacumulator) la ambele specii, în timp ce nichelul și cromul au înregistrat valori mari (>5000, foarte bioacumulator) doar la căluțul de mare. Valorile Factorului de Bioacumulare Biota-Sediment (BSAF) înregistrate la acul de mare au fost mici (<1), în vreme ce la căluțul de mare s-au înregistrat depășiri doar la cadmiu (Constanța) și crom (Costinești). La probele din 2013, s-au înregistrat depășiri ale BCF la Cd, Pb, Cu și Ni, iar depășiri ale BSAF la Cd și Cu. În cazul ambilor indici de bioacumulare, cele mai mici valori s-au înregistrat în stația Cazino-Constanța, ceea ce ridică unele semne de întrebare, dat fiind că această se află în imediata vecinătate a Portului Constanța, unde influența antropică este majoră (Nenciu et al., 2014a). Valorile BCF și BSAF cele mai ridicate s-au calculat la Saturn-Venus (valoare extrem de mare a BCF la Cd), acolo unde s-au înregistrat concentrații foarte ridicate și în țesutul de *H. guttulatus* (Cu).



Aceste rezultate demonstrează că speciile *H. guttulatus* și *S. acus* asimilează metalele grele din mediul înconjurător, fiind specii bioacumulatoare și bioconcentratoare. Referitor la diferențele interspecifice, din cauza mobilității lor mai scăzute și arealelor de habitat mai reduse pe care le ocupă în comparație cu acele de mare, căluții de mare tind să acumuleze mai multe substanțe chimice.

Unele dintre aceste metale (Cu, Cr) sunt prezente în mod normal în organism, având anumite funcții fiziologice, însă pot deveni toxice atunci când concentrațiile cresc din cauza aportului antropic. Alte metale (Cd, Pb) sunt toxice chiar și în concentrații mici. Valorile foarte ridicate înregistrate de cupru în țesuturile anumitor organisme marine pot fi explicate de prezența hemocianinei, o proteină respiratorie sub formă de metaloproteine care conține doi atomi de cupru, care se leagă reversibil cu o moleculă de oxigen. Hemocianina dezoxigenată transportă oxigenul în hemolimfa unor moluște și la majoritatea artropodelor. (Rainbow et al., 1989). Cel mai cunoscut exemplu de animal marin cu sânge la care oxigenarea se face pe bază de cupru este crabul-potcoavă nord-american *Limulus polyphemus*, dar sunt și numeroase specii de moluște și artropode (așa se explică și nivelurile relativ mari înregistrate la *Rapana venosa* și celelalte moluște studiate de la litoralul românesc al Mării Negre). Deși în mod normal fierul este mai eficient decât cuprul, în condiții de temperatură scăzută oxigenarea pe bază de cupru este mai eficientă. Cu toate acestea, nu este cazul Syngnathidaelor și celorlalte specii de pești din Marea Neagră, care, fiind vertebrate, au în sânge pigmentul respirator hemoglobină (Rainbow et al., 1989). În consecință, sursa de cupru este probabil una externă și, cel mai sigur, de origine antropică, cauzată potențial de trafic naval din zonele de prelevare a probelor, având în vedere că acest metal este utilizat ca agent antifouling pe chilele navelor (Nenciu et al., 2014b).

Cu toate acestea, nu se poate trece cu vederea și influența altor factori asupra bioacumulării de metale grele: asimilarea prin hrană (biomagnificare), vârsta, gradul de maturitate, starea fiziologică, boli etc. Bioacumularea de metale grele de către speciile marine poate fi un bun indicator al calității mediului, oferind informații suplimentare celor obținute în urma analizării concentrațiilor din coloana de apă și sedimente.

Cercetări privind contaminarea cu hidrocarburi aromatice polinucleare (HAP) a Syngnathidaelor din apele litorale românești

Principalele căi de introducere a HAP-urilor antropice în mediul marin sunt depunerile atmosferice, deversări menajere și industriale, scurgerea directă a petrolului și produselor petroliere. Odată ajunși în apă, compușii care nu se evaporă tind să adere la suprafața particulelor organice și anorganice datorită caracterului puternic hidrofob, urmând a fi transportați în coloana de apă și, în final, se acumulează în sedimente. Contaminarea sedimentelor afectează direct bentosul marin și speciile care trăiesc în apropierea substratului (ca Syngnathidaele) și reprezintă o sursă continuă de substanțe toxice în mediu acvatic.

Rezultatele obținute au confirmat faptul că cele două specii de Syngnathidae (*H. guttulatus* și *S. acus*) studiate rețin compușii aromatici polinucleari din mediul marin, toate probele analizate fiind clasificate ca fiind contaminate într-o anumită măsură (o probă foarte contaminată - țesutul de căluț de mare de la Costinești $1341,8 \pm 84,1$ ng/g m.p. și celelalte trei moderat contaminate, cu valori peste 100 ng/g m.p.).

Pe specii, căluții de mare au acumulat într-o mai mare măsură HAP-uri, pe de-o parte datorită conținutului mare de lipide și, pe de altă parte, datorită mobilității lor mai scăzute comparativ cu acele de mare.

Având în vedere că hidrocarburile aromatice polinucleare sunt clasificate de Directiva Cadru Apă ca fiind „substanțe periculoase prioritare”, sunt reglementate de Directiva Cadru privind Deșeurile, că sunt compuși extrem de stabili care persistă în mediul marin o lungă perioadă de timp (poluanți organici persistenti), contaminarea cu HAP-uri a organismelor marine poate servi drept indicator al calității mediului. De asemenea, nu pot fi ignorate efectele negative pe care acești compuși le pot avea asupra organismelor marine, ceea ce poate periclita biodiversitatea unui ecosistem aflat într-un echilibru fragil cum este cel al Mării Negre.

În consecință, în vederea obținerii de date suplimentare referitoare la biologia și ecologia Syngnathidaelor de la litoralul românesc al Mării Negre și la modul în care aceste specii sunt afectate de substanțele de origine antropică ce ajung în mediul marin, propunem următoarele **direcții de cercetare**:

- Extinderea colectării de exemplare (în special de *H. guttulatus*) din capturile complementare de la punctele pescărești de-a lungul litoralului românesc, în vederea realizării de măsurători și calculării parametrilor de creștere (pe locații, sezoane etc.), precum și pentru analiza conținutului stomacal și a contaminanților acumulați în organismul acestor pești;
- Realizarea amplificării ADNmt pe un număr mai mare de exemplare de căluți de mare, colectate din diferite locații de-a lungul litoralului românesc al Mării Negre (din capturile complementare de la punctele pescărești, ne-exercitând, astfel, niciun fel de presiune suplimentară asupra stocurilor), pentru a confirma concluzia preliminară a acestei cercetări (și anume că *H. guttulatus* este singura specie de la litoralul românesc al Mării Negre, celelalte două citate de sursele bibliografice, *H. hippocampus* și *H. fuscus*, nefiind semnalate pe parcursul realizării cercetărilor incluse în prezenta teză);
- Reluarea experimentului de identificare a dietei optime pentru creșterea căluților de mare în captivitate, extinzând durata acestuia, precum și paleta de hrană oferită animalelor;
- Realizarea de teste de toxicitate pe exemplare de *Syngnathus* sp. (fără vreun statut de protecție și ușor de colectat din mediul natural), în special cu produse de origine petroliară, care pot ajunge foarte ușor în zonele de mică adâncime pe care aceste specii le habitează;
- Aplicarea metodelor de studiu și analiză și asupra altor organisme din ecosistemul Mării Negre, în vederea completării informațiilor referitoare la răspunsul pe care îl dau acestea la impactul activităților antropice.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Bașusta A., Özer E., Girgin H., Serdar O., Bașusta N. (2014), Length-Weight Relationship and Condition Factor of *Hippocampus hippocampus* and *Hippocampus guttulatus* Inhabiting Eastern Black Sea, in Pakistan J. Zool., vol. 46(2), pp. 447-450;
2. Bănărescu P. (1964), Fauna Republicii Populare Române, Pisces - Osteichthyes (Pești ganoizi și osoși), vol. XIII, Ed. Academiei R.P.R., 959 p.;



3. Butler P.A. (1971), Monitoring organisms, in Food and Agricultural Organisation Technical Conference on Marine Pollution and its Effects on Living Resources and Fishing, Rome, 1970. Supplement I: Methods of detection, measurement and monitoring of pollutants in the marine environment. M. Ruivo (ed.), London, Fishing News (Books) Ltd., pp. 101-112;
4. Caldwell I.R., Vincent A.C.J. (2012), A sedentary fish on the move: effects of displacement on long-snouted seahorse (*Hippocampus guttulatus* Cuvier) movement and habitat use. *Environmental Biology of Fishes*, 96(1), pp. 67-75;
5. Carlander, K.D. (1977), Handbook of freshwater fishery biology, Volume 2. The Iowa State University Press, Ames, Iowa, 431 p.;
6. Coatu V., Țigănuș D., Oros A., Lazăr L. (2013), Analysis of Hazardous Substance Contamination of the Marine Ecosystem in the Romanian Black Sea Coast, Part of the Marine Strategy Framework Directive (2008/56/EEC) Implementation, in *Cercetări Marine / Recherches Marines, INCDM Constanța*, vol. 43, ISSN: 0250-3069, pp. 174-186;
7. Foster S.J., Vincent A.C.J. (2004), Life history and ecology of seahorses: implications for conservation and management. *Journal of Fish Biology* 65, pp. 1-61;
8. Froese R. (2006), Cube law, condition factor and weight-length relationships: history, meta-analysis and recommendations. *Journal of Applied Ichthyology*, 22, pp. 241-253;
9. Froese R., Pauly D. (2004), FishBase. World Wide Web electronic publication. <http://www.fishbase.org.status>: July 2004;
10. Grasshoff K., Kremling K., Ehrhardt MG (1999), Methods of Seawater Analysis (3rd Edition). VCH Publishers. 632 pp;
11. Gurkan S., Taşkavak E. (2007), Length-Weight relationships for Syngnathid fishes of Aegean Sea, Turkey. *Belg. J. Zool.*, 137, pp. 219-222;
12. Gurkan S., Taşkavak E., Sever T.M., Akalin S. (2011), Gut contents of two European seahorses *Hippocampus hippocampus* and *Hippocampus guttulatus* in the Aegean Sea, Coasts of Turkey. *Pakistan J. Zool.*, vol. 43 (6), pp. 1197-1201;
13. Hafez R., Labat R., Quillier R. (1981), Recherches sur les chromosomes surnuméraires de lablette (*Alburnus alburnus* L.). *Cybiurn*, 5, pp. 81-87;
14. Haug A.S. (1974), Estimation of heavy metal pollution in two Norwegian fjord areas by analysis of the brown alga (*Ascophyllum nodosum*). *Environ. Pollut.*, 7, pp. 179-192;
15. INCDM, (2012a), Evaluarea inițială a apelor românești ale Mării Negre, cerință a Directivei Strategia pentru Mediul Marin: Boicenco L., Alexandrov L., Anton E., Coatu V., Cristea M., Cristescu T., Diaconeasa D., Dumitrache C., Filimon A., Lazăr L., Malciu V., Marin O., Mateescu R., Micu D., Mihailov M., Nicolaev S., Niță V., Oros A., Radu G., Spînu A., Stoica E., Tabarcea C., Țigănuș D., Timofte F., Zaharia T., 219 p.
http://www.mmediu.ro/beta/wp-content/uploads/2012/07/2012-07-17_evaluare_impact_planuri_evaluareinitialamediumarin.pdf;
16. Kasapoglu N., Duzgunes E. (2014), Some Population Characteristics of Long-snouted Seahorse (*Hippocampus guttulatus* Cuvier, 1829) (Actinopterygii: Syngnathidae) in the Southeastern Black Sea, *Acta Zool. Bulg.*, 66 (1), pp. 127-131;
17. Kitsos, M.S., Tzomos, T.H., Anagnostopoulou, L., Koukouras, A. (2008), Diet composition of the seahorses, *Hippocampus guttulatus* Cuvier 1829 and *Hippocampus hippocampus* (L., 1758) (Teleostei, Syngnathidae) in the Aegean Sea. *J. Fish Biol.*, 72, pp. 1259-1267, DOI 10.1111/j.1095-8649.2007.01789.x;
18. Kleiber, D., Blight, L., Caldwell, I., Vincent, A. (2011), The importance of seahorses and pipefishes in the diet of marine animals. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 21, pp. 205-223;
19. Léger P., Bengtson D.A., Sorgeloos P., Simpson K.L., Beck A.D. (1987), The nutritional value of Artemia: a review. *Artemia Research and its Applications*. 1987. Vol. 3. Ecology, Culturing, Use in aquaculture. Sorgeloos P., Bengtson D. A., Decler W., and Jaspers E. (Eds). Universa Press, Wetteren, Belgium, 556 p.;
20. Lourie S.A., Foster S.J., Cooper E.W.T., Vincent A.C.J. (2004), A Guide to the Identification of Seahorses. Project Seahorse and TRAFFIC North America, University of British Columbia and World Wildlife Fund, Washington D.C;
21. Lowry O.H., Rosenbrougf N.J., Lewis-Farr A., Randall R.J. (1951), Protein measurement with the Folin Phenol reagent, in *Journal of Biological Chemistry*, 193, pp. 265-275;
22. Ludwig A., Debus L. et al. (2002), A Molecular Approach to Control the International Trade in Black Caviar. *International Review of Hydrobiology* 87(5-6), pp. 661-674;
23. Mamaev V., Aubrey D., Ereemeev V., (eds.) (1995), Black Sea Bibliography 1974-1994, United Nations Publications, New York, 364 p.;
24. **Nenciu (Zaharia) M.-I.**, Roșioru D., Coatu V., Oros A., Roșoiu N. (2013), Characterization of the Environmental Conditions of the Long-Snouted Seahorse Habitat at the Romanian Coast, in *Journal of Environmental Protection and Ecology*, ISSN 1311-5065, Vol. 14, No. 4, pp. 1695-1702 - Thomson Reuters ISI Web of Knowledge, factor impact 0,338, <http://www.jepe-journal.info/vol14-no4-2013>;
25. **Nenciu M.I.**, Roșioru D., Oros A., Galațchi M., Roșoiu N. (2014a), Bioaccumulation of Heavy Metals in Seahorse Tissue at the Romanian Black Sea Coast, in 14th SGEM GeoConference on Water Resources. Forest, Marine And Ocean Ecosystems, www.sgem.org, SGEM2014 Conference Proceedings, ISBN 978-619-7105-14-8 / ISSN 1314-2704, June 19-25, 2014, Vol. 2, pp. 547-554, DOI: 10.5593/SGEM2014/B32/S15.072 - indexată BDI (Thomson Reuters ISI Web of Knowledge, SCOPUS, CrossRef Database (DOI for each paper), CrossRef Cited By Linking, ProQuest & GeoRef, EBSCO, Mendeley, CiteULike, UlrichsWeb, Google Scholar), <http://www.sgem.org/sgemlib/spip.php?article4518>;
26. **Nenciu M.-I.**, Coatu V., Oros A., Roșioru D., Țigănuș D., Roșoiu N. (2014b), Pollutant Bioaccumulation in the Long-Snouted Seahorse at the Romanian Coast, in *Journal of Environmental Protection and Ecology*, ISSN 1311-5065, Vol. 15, No. 4, pp. 1650-1659 - Thomson Reuters ISI Web of Knowledge, factor impact 0,838, <http://www.jepe-journal.info/journal-content/vol-15-no-4-2014>;
27. **Nenciu M.-I.**, Roșoiu N., Petcu C. L., Zaharia T., Niță V., Maximov V., Roșioru D. (2015), Effects of Different Live Feed Diets Applied to the Long-Snouted Seahorse (*Hippocampus guttulatus* Cuvier, 1829), in *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences (TrJFAS)*, Central Fisheries Research Institute, Trabzon, TURKEY, 15, pp. 406-415, ISSN 1303-2712, DOI: 10.4194/1303-2712-v15_2_26 - Thomson Reuters ISI Web of Knowledge, factor impact 0,384, <http://www.trjfas.org/new.html>;
28. Onăra D., Taflan E., Cociaș Ș., Bercsényi M., Szűcs R., Suciu R. (2012), Comparative genetic diversity study of two European populations of pikeperch using PCR-RFLP, *Scientific Annals of the Danube Delta Institute Tulcea, Romania*, vol. 18/2012, ISSN 1842 - 614X; on-line ISSN 2247 - 9902 203, doi: 10.7427/DDI.18.10, pp. 203 - 210;
29. Onciu T. (1998), Cultura unor nevertebrate utilizate în hrana peștilor și crustaceelor cu valoare economică - obiect al mariculturii românești, Teză de Doctorat, Institutul de Biologie din București, 180 p.;
30. Oros A.N., Pecheanu I., Mihnea R. (2003), Some aspects concerning trace metals bioaccumulation in *Mytilus galloprovincialis* along the Romanian Black Sea coastal area, in *Journal of Environmental Protection and Ecology*, Volume 4, Issue 4, pp. 850-856;
31. Oros A.N. (2009), Contribuții la cunoașterea consecințelor poluării cu metale grele asupra ecosistemelor marine costiere de la litoralul românesc al Mării Negre, Teză de Doctorat, Universitatea „Ovidius” Constanța, Facultatea de Științe ale Naturii și Științe Agricole, Specializarea Ecologie și Protecția Mediului, 212 p.;



32. Oros A.N., Gomoiu M.-T. (2012), A review of metal bioaccumulation levels in the Romanian Black Sea biota during the last decade - A requirement for implementing Marine Strategy Framework Directive (Descriptors 8 and 9), in *Journal of Environmental Protection and Ecology*, Volume 13, Issue 3A, pp. 1730-1743;
33. Petcu L.C. (2011), Analiza statistică cu SPSS - Note de curs, Ed. Ovidius University Press, ISBN: 978-973-614-641-1, 303 p.;
34. Phillips D.J.H., (1980), Trace metals. In: *The International Mussel Watch*. National Academy of Sciences, Washington DC, pp. 78-132;
35. Qiang L., Lin J., Lu J., Li B. (2008), Biochemical Composition of Six Seahorse Species, *Hippocampus* sp., from the Chinese Coast, in *Journal of the World Aquaculture Society*, Vol. 39, No. 2, pp. 225-234;
36. Rainbow P.S., Moore P.G., Watson D. (1989), Talitrid amphipods (Crustacea) as biomonitors for copper and zinc. *Estuarine Coast. Shelf Sci.*, 28, pp. 567-582;
37. Radu G., Radu E. (2008), Determinator al principalelor specii de pești din Marea Neagră, Ed. Virom Constanța, 558 p.;
38. Ricker W.E. (1975), Computations and interpretation of biological statistics of fish populations. *Fisheries Research Board Canada Bulletin*, 191: p. 382;
39. Roșioru D. (2008), „Studiul biochimic al aglomerărilor de organisme marine în interacțiune cu mediul ambiant”, Teză de Doctorat, Universitatea „Ovidius” Constanța, Facultatea de Științe ale Naturii și Științe Agricole, conducător științific prof. univ.dr. CS I Natalia Roșoiu, 210 p.;
40. Roșioru D., Coatu V., Oros A., Vasiliu D., Țigănuș D. (2012) , Marine environment quality of the growth and exploitation of the main mollusks from the Romanian Black Sea, in *Journal of Environmental Protection and Ecology*, Volume 13, Issue 3A, pp. 1799-1805;
41. Roșioru D., Abaza V., Dumitrache C., Filimon A., Timofte F. (2014) Ecological and biochemical aspects of *Mytilus galloprovincialis* from the Romanian Black Sea Coast, 14th SGEM GeoConference on Water Resources. Forest, Marine and Ocean Ecosystems, Vol. 2, No. SGEM2014 Conference Proceedings, ISBN 978-619-7105-14-8 / ISSN 1314-2704, June 19-25, 2014, Vol. 2. (2014), pp. 569-576, doi:10.5593/SGEM2014/B32/S15.075;
42. Sericano J.L., Atlas E.L., Wade T.L., Brooks J.M. (1990), NOAA's status and trends mussel watch program: chlorinated pesticides and PCBs in oysters (*Crassostrea virginica*) and sediments from the Gulf of Mexico, 1986-1987. *Marine Environ. Res.*, 29, pp. 161-203;
43. Sneath P. H. A., Sokal R. R. (1973), Numerical taxonomy. Ed. Freeman, San Francisco CA. (abstract);
44. Stoltz K.N., Wilson A.B. (2007), Male pregnancy in seahorses and pipefish: beyond the mammalian model. *BioEssays*. 29, pp. 884-896;
45. Taggart J.B., Hynes, R.A., Prodohl, P.A., Ferguson, A. (1992), A simplified protocol for routine total DNA isolation from salmonid fishes, *Journal of Fish Biology* 40: pp. 963 - 965;
46. Teske, P.R., Beheregaray, L.B. (200), Evolution of seahorses' upright posture was linked to Oligocene expansion of seagrass habitats. *Biology Letters*. 5, pp. 521-523;
47. Țigănuș D., Coatu V., Lazăr L., Oros A., Spînu A. D. (2013). Identification of the sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments from the Romanian Black Sea sector, *Cercetări Marine*, INCDM Constanța, vol. 43, ISSN: 0250-3069, pp. 187-196;
48. Țigănuș D. (2015), Hidrocarburi Aromatice Polinucleare, în Golumbeanu M. & Nicolaev S. (editori) (2015), *Study on Integrated Coastal Zone Management*, Editura Ex Ponto Constanța, versiunea originală în limba engleză, ISBN 978-606-598-397-7, 454 p, Anexa 3, pp. 439-445;
49. Varanasi U., Casillas E., Arkoosh M.R., Hom T., Misitano D., Brown D.W., Chan S., Collier T.K., McCain B.B., Stein J.E. (1993), Contaminant Exposure and Associated Biological Effects in Juvenile Chinook Salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) from Urban and Nonurban Estuaries of Puget Sound, WA, NOAA Tech. Memo NMFS-NWFSC-8. U.S. Department of Commerce, Rockville, MD;
50. Veiga, P., Machado D., Almeida, C., Bentes L., Monteiro P., Oliveira F., Ruano M., Erzini, K., Gonçalves J.M.S. (2009), Weight-length relationships for 54 species of the Arade estuary, southern Portugal. *J. appl. Ichthyol.*, DOI: 10.1111/j.1439-0426.2009.01230.x, 25: pp. 493-496.;
51. Woodall L. (2012). *Hippocampus guttulatus*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2015.2. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 23 August 2015;
52. Zallohar, J., Hitij, T., Križnar, M. (2009), Two new species of seahorses (Syngnathidae, Hippocampus) from the Middle Miocene (Sarmatian) Coprolitic Horizon in Tunjice Hills, Slovenia: The oldest fossil record of seahorses, *Annales de paléontologie*. Elsevier, pp. 71-96;
53. Zallohar, J., Hitij, T. (2012), The first known fossil record of pygmy pipefishes (Teleostei: Syngnathidae: Hippocampinae) from the Miocene coprolitic horizon, Tunjice Hills, Slovenia, *Annales de Paléontologie*. Elsevier, pp. 131-151;
54. *** IAEA-MEL (1995). Marine Environmental Studies Laboratory, Training Manual on the Measurement of Organochlorine and Petroleum Hydrocarbons in Environmental samples;
55. *** IAEA-MEL (1999). Standard operating procedures for trace metals analyses

LUCRĂRI ȘTIINȚIFICE PUBLICATE ÎN CURSUL STAGIULUI DE DOCTORAT

A. LUCRĂRI ȘTIINȚIFICE PUBLICATE ÎN REVISTE COTATE ISI CU FACTOR DE IMPACT

1. ZAHARIA TANIA, MAXIMOV VALODIA, MICU DRAGOȘ, NIȚĂ VICTOR, NEDELICU MARIUS, GANEA GABRIEL, URSACHE CORNEL, GOLUMBEANU MARIANA, NENCIU MAGDA, 2012, Romanian Marine Fisheries and Natura 2000 Network, in *Journal of Environmental Protection and Ecology*, Volume 13, Issue 3A, pp. 1792-1798 - **Thomson Reuters ISI Web of Knowledge, factor impact 0,259**, <http://www.jepe-journal.info/journal-content/vol13-no-3a>;
2. NENCIU (ZAHARIA) MAGDA-IOANA, ROȘIORU DANIELA, COATU VALENTINA, OROS ANDRA, ROȘOIU NATALIA, Characterization of the Environmental Conditions of the Long-Snouted Seahorse Habitat at the Romanian Coast, 2013, in *Journal of Environmental Protection and Ecology*, ISSN 1311-5065, Vol. 14, No. 4, pp. 1695-1702 - **Thomson Reuters ISI Web of Knowledge, factor impact 0,338**, <http://www.jepe-journal.info/vol14-no4-2013>;
3. GOLUMBEANU MARIANA, OROS ANDRA, NENCIU MAGDA, ZAVATARELLI MARCO, DRAGO ALDO, 2014, Contribution of Environmental Indices in Meeting the Objectives and Principles of the Marine Strategy Framework Directive (MSFD), in *Journal of Environmental Protection and Ecology*, ISSN 1311-5065, Vol. 15, No. 3, pp. 1130-1138 - **Thomson Reuters ISI Web of Knowledge, factor impact 0,838**, <http://www.jepe-journal.info/journal-content/https-sites-google-com-a-jepe-journal-info-jepe-journal-vol-15-no-3-2014>;



4. MAXIMOV VALODIA, ȚIGANOV GEORGE, PARASCHIV MARIAN, NENCIU MAGDA-IOANA, ZAHARIA TANIA, (2014), Preliminary Data on the Monitoring of Sturgeon Species in Romanian Marine Waters, in **Journal of Environmental Protection and Ecology**, ISSN 1311-5065, Vol. 15, No. 3, pp. 933-943 - **Thomson Reuters ISI Web of Knowledge, factor impact 0,838**, <http://www.jepe-journal.info/journal-content/https-sites-google-com-a-jepe-journal-info-jepe-journal-vol-15-no-3-2014;>
5. GOLUMBEANU MARIANA, ZAHARIA TANIA, RADU GHEORGHE, MAXIMOV VALODIA, NENCIU MAGDA, 2014, Contributions of the Mareframe Project to Ecosystem-Based Fisheries Management Solutions for European Fish Stocks, in **Journal of Environmental Protection and Ecology**, ISSN 1311-5065, Vol. 15, No. 2, pp. 655-659 - **Thomson Reuters ISI Web of Knowledge, factor impact 0,838**, <http://www.jepe-journal.info/vol-15-no-2-2014;>
6. ZAHARIA TANIA, MAXIMOV VALODIA, RADU GHEORGHE, ANTON EUGEN, SPÎNU ALINA, NENCIU MAGDA, 2014, Romanian marine fisheries vs. Marine protected areas. Reconciling fisheries and habitat protection in coastal Romanian marine protected areas, in **Scientia Marina**, ISSN 0214-8358 Instituto de Ciencias del Mar de Barcelona (CSIC), Spain, pp. 95-101 - **Thomson Reuters ISI Web of Knowledge, factor impact 1,493**, [http://www.icm.csic.es/scimar/index.php/secId/6/IdArt/4251/;](http://www.icm.csic.es/scimar/index.php/secId/6/IdArt/4251/)
7. NENCIU MAGDA-IOANA, COATU VALENTINA, OROS ANDRA, ROȘIORU DANIELA, ȚIGĂNUȘ DANIELA, ROȘOIU NATALIA, 2014, **Pollutant Bioaccumulation in the Long-Snouted Seahorse at the Romanian Coast**, in **Journal of Environmental Protection and Ecology**, ISSN 1311-5065, Vol. 15, No. 4, pp. 1650-1659 - **Thomson Reuters ISI Web of Knowledge, factor impact 0,838**, <http://www.jepe-journal.info/journal-content/vol-15-no-4-2014;>
8. NENCIU MAGDA-IOANA, ROȘOIU NATALIA, PETCU CRISTIAN LUCIAN, ZAHARIA TANIA, NIȚĂ VICTOR, MAXIMOV VALODIA, ROȘIORU DANIELA, **Effects of Different Live Feed Diets Applied to the Long-Snouted Seahorse (*Hippocampus guttulatus* Cuvier, 1829)**, 2015, in **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences (TrJFAS)**, Central Fisheries Research Institute, Trabzon, TURKEY, 15, pp. 406-415, ISSN 1303-2712, DOI: 10.4194/1303-2712-v15_2_26 - **Thomson Reuters ISI Web of Knowledge, factor impact 0,566**, <http://www.trjfas.org/new.html>.

B. LUCRĂRI ȘTIINȚIFICE PUBLICATE ÎN REVISTE COTATE ISI FĂRĂ FACTOR DE IMPACT

1. NENCIU MAGDA-IOANA, ROȘIORU DANIELA, OROS ANDRA, GALAȚCHI MĂDĂLINA, ROȘOIU NATALIA, 2014, **Bioaccumulation of Heavy Metals in Seahorse Tissue at the Romanian Black Sea Coast**, in **14th SGEM GeoConference on Water Resources. Forest, Marine And Ocean Ecosystems**, www.sgem.org, **SGEM2014 Conference Proceedings**, ISBN 978-619-7105-14-8 / ISSN 1314-2704, June 19-25, 2014, Vol. 2, pp. 547-554, DOI: 10.5593/SGEM2014/B32/S15.072 - **indexată BDI** (Thomson Reuters ISI Web of Knowledge, SCOPUS, CrossRef Database (DOI for each paper), CrossRef Cited By Linking, ProQuest & GeoRef, EBSCO, Mendeley, CiteULike, UlrichsWeb, Google Scholar), <http://www.sgem.org/sgemlib/spip.php?article4518;>
2. GALAȚCHI MĂDĂLINA, ROȘIORU DANIELA, NENCIU MAGDA, ZAHARIA TANIA, COPREAN DRAGOMIR, 2015, **Aspects of Romanian Black Sea Coast Anchovy (*Engraulis encrasicolus*, Linnaeus, 1758) Biology during 2013-2014**, in 15th International Multidisciplinary Scientific GeoConference SGEM 2015, www.sgem.org, **SGEM2015 Conference Proceedings**, ISBN 978-619-7105-37-7 / ISSN 1314-2704, June 18-24, 2015, Book 3 Vol. 2, 603-610 pp, DOI: 10.5593/SGEM2015/B32/S15.080, **indexată BDI** (Thomson Reuters ISI Web of Knowledge, SCOPUS, CrossRef Database (DOI for each paper), CrossRef Cited By Linking, ProQuest & GeoRef, EBSCO, Mendeley, CiteULike, UlrichsWeb, Google Scholar), <http://www.sgem.org/sgemlib/spip.php?article6088;>

C. LUCRĂRI ȘTIINȚIFICE PUBLICATE ÎN REVISTE INDEXATE BDI

1. NIȚĂ VICTOR, ZAHARIA TANIA, NENCIU MAGDA, CRISTEA MĂDĂLINA, ȚIGANOV GEORGE - Current State Overview of the Vama Veche - 2 Mai Marine Reserve, Black Sea, Romania, 2012, in **Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation International Journal of the Bioflux Society**, Volume 5, Issue 1, February 2012, pp. 44-54, AACL Bioflux - <http://www.bioflux.com.ro/aac> - **C.N.C.S.I.S. B+** (indexată în Thomson Reuters Scientific - ISI Web of Knowledge, Scopus - Elsevier; Sciverse, Scimago - Journal Rank, EBSCO - EBSCOhost Online Research Databases), [http://www.bioflux.com.ro/docs/AACL_5.1.10.pdf;](http://www.bioflux.com.ro/docs/AACL_5.1.10.pdf)
2. NENCIU MAGDA, OROS ANDRA, ROȘIORU DANIELA, GALAȚCHI MĂDĂLINA, FILIMON ADRIAN, ȚIGANOV GEORGE, DANILOV CRISTIAN, ROȘOIU NATALIA, 2016, **Heavy Metal Bioaccumulation in Marine Organisms from the Romanian Black Sea Coast**, in **Annals of Academy of Romanian Scientists. Series on Biological Sciences**, on-line ISSN 2285 - 4177 Open Acces, printed ISSN 2285 - 4169, accepted for publication, *in press*.

D. Lucrări prezentate la manifestări științifice internaționale și publicate sub formă de rezumat

1. NENCIU (ZAHARIA) MAGDA-IOANA, ROȘIORU DANIELA, COATU VALENTINA, OROS ANDRA, ROȘOIU NATALIA, 2013, **Characterization of the Environmental Conditions of the Long-Snouted Seahorse Habitat at the Romanian Coast**, in Book of Abstracts of the UAB-B.EN.A. International Conference "Environmental Engineering and Sustainable Development", Alba Iulia, România, 23-25 mai 2013, ISBN 978-606-613-067-7, pp. 95-96;



2. **NENCIU MAGDA**, ROȘIORU DANIELA, LUPĂȘCU NALIANA, ROȘOIU NATALIA, 2013, **Identifying the Major Threats Seahorses are Facing at the Romanian Coast**, in Book of Abstracts of the 1st International U.O.C.-B.EN.A Conference “The Sustainability of Pharmaceutical, Medical and Ecological Education and Research” - SPHAMEER 2013, 20-23 iunie 2013, Constanța, ROMÂNIA“, ISBN 978-973-614-784-5, p. 166;
3. **NENCIU MAGDA**, ROȘIORU DANIELA, OROS ANDRA, COATU VALENTINA, CRISTEA MĂDĂLINA, GOLUMBEANU MARIANA, ROȘOIU NATALIA, 2013, **Major Threats on Seahorses at the Romanian Black Sea Coast**, in Book of Abstracts of the “Marine Research Horizon 2020 - MARES 2020” International Conference, Hotel “Admiral“, 17-21 septembrie 2013, Nisipurile de Aur, Bulgaria, ISBN 978-954-92-787-8-1, p. 154;
4. **NENCIU MAGDA-IOANA**, COATU VALENTINA, OROS ANDRA, ROȘIORU DANIELA ȚIGĂNUȘ, ROȘOIU NATALIA, 2014, **Pollutant Bioaccumulation in the Long-Snouted Seahorse at the Romanian Coast**, in Proceedings of the International Conference “New Tools for the Sustainable Management of Aquatic Resources“, Book of Abstracts, Bucharest, 17-18 January 2014, editors Dr. Deak Gyorgy, Prof. Dr. Fokion Vosniakos, ISBN 978-973-741-357-4, p. 103;
5. **NENCIU MAGDA-IOANA**, COATU VALENTINA, OROS ANDRA, ROȘIORU DANIELA, ȚIGĂNUȘ DANIELA, ROȘOIU NATALIA, 2014, **Xenobiotic Intake of *H. guttulatus* at the Romanian Black Sea Coast**, in Abstracts Book of the International Congress on “Green Infrastructures and Sustainable Societies/Cities” GreInSus 2014, Izmir, Turcia, 8-10 May 2014, ISBN 978-605-85204-0-0, p. 260;
6. **NENCIU MAGDA-IOANA**, OROS ANDRA, ROȘIORU DANIELA, GALAȚCHI MĂDĂLINA, ROȘOIU NATALIA, 2014, **Heavy Metal Bioaccumulation Indicators in Seahorse Tissue**, in Book of Abstracts of the 1st International Medical Conference “Environment and Public Health“ MEDENV 2014, Constanța, România, 12-14 septembrie 2014, ISBN 978-606-8066-486, p. 98;
7. **NENCIU MAGDA**, **Bioacumularea de metale grele în țesutul de căluț de mare (*Hippocampus guttulatus* Cuvier, 1829)**, în Volumul de Rezumate al Sesiunii Științifice de Toamnă a Academiei Oamenilor de Știință din România, 19-20 septembrie 2014, Constanța, România, p. 70;
8. **NENCIU MAGDA-IOANA**, ROȘIORU DANIELA, NIȚĂ VICTOR, MAXIMOV VALODIA, ROȘOIU NATALIA, 2014, **Effects of Different Live Feed Diets Applied to the Long-Snouted Seahorse (*Hippocampus guttulatus* Cuvier, 1829)**, in Abstract Book of the FABA 2014 International Symposium on Fisheries and Aquatic Sciences, Trabzon, Turkey, 25-27 September 2014, p. 296;
9. **NENCIU MAGDA-IOANA**, ROȘIORU DANIELA, ZAHARIA TANIA, ONĂRĂ DALIA, TAFLAN ELENA, HOLOȘTENCO DANIELA, ROȘOIU NATALIA, 2015, **First Attempt of Genetic Analyses for the Species *Hippocampus guttulatus* Cuvier 1829 in the Romanian Black Sea**, (2015), in Deltas and Wetlands (Book of Abstracts) (ed. L. Torok), vol. 3, ISSN 2344-3766, Danube Delta Technological Center Publishing House, Tulcea, Romania, 19-21 April 2015, p. 18, DOI 14592/DDI.D.W.03.2015;
10. **NENCIU MAGDA-IOANA**, OROS ANDRA, COATU VALENTINA, ȚIGĂNUȘ DANIELA, ROȘIORU DANIELA, ROȘOIU NATALIA, 2015, **Overview of Pollutants Identified in Long-Snouted Seahorse (*Hippocampus guttulatus*, Cuvier 1829) Samples from the Romanian Black Sea Coast**, in Book of Abstracts of the International U.A.B. - B.EN.A. Conference Environmental Engineering and Sustainable Development, Alba Iulia, Romania, May 28-30th, 2015, ISSN 245702829, p. 126;
11. **NENCIU MAGDA**, OROS ANDRA, ROȘIORU DANIELA, URSACHE CORNEL, ROȘOIU NATALIA, 2015, **Heavy Metal Bioconcentration in Syngnathids from the Romanian Black Sea**, în Abstracts Book of the 1st International Conference on Sea and Coastal Development in the Frame of Sustainability, MACODESU 2015, Trabzon, Turkey, 18-20 September 2015, p. 83;
12. **NENCIU MAGDA-IOANA**, ȚIGĂNUȘ DANIELA, OROS ANDRA, ROȘIORU DANIELA, ROȘOIU NATALIA, 2015, **Hydrocarbon Contamination of Syngnathids in Romanian Black Sea Waters**, în Proceedings Book of the 1st International Conference on “Ecology and Protection of Marine and Freshwater Environments - ECOPROWATER 2015“, Viterbo, Italy, 1-3 October 2015, ISBN: 9788890755361, p. 40;
13. **NENCIU MAGDA**, OROS ANDRA, ROȘIORU DANIELA, GALAȚCHI MĂDĂLINA, ȚIGANOV GEORGE, DANILOV CRISTIAN-SORIN, FILIMON ADRIAN, ROȘOIU NATALIA, 2015, **Bioacumularea metalelor grele la specii din familia Syngnathidae de la litoralul românesc al Mării Negre**, în Volumul de Rezumate al Sesiunii Științifice de Toamnă 2015 a Academiei Oamenilor de Știință din România, 24-26 septembrie 2015, Iași, România, p. 53-54;
14. ROȘIORU DANIELA MARIANA; OROS ANDRA, **NENCIU MAGDA**, LUMINIȚA LAZĂR, 2015, **Heavy Metals Contamination in *Mytilus galloprovincialis*, Water And Sediments from the Romanian Black Sea Coast**, în Book of Abstracts of the International Symposium PROTECTION OF THE BLACK SEA ECOSYSTEM AND SUSTAINABLE MANAGEMENT OF MARITIME ACTIVITIES - PROMARE 2015, 7th Edition, Constanta, Romania, 29-31 October 2015, editors S. Nicolaev, F.K. Vosniakos, T. Zaharia, M. Golumbeanu, M. Nenciu, ISBN: 978-606-8066-52-3, p. 57.



15. **NENCIU MAGDA-IOANA, ROȘIORU DANIELA, ZAHARIA TANIA, ONARĂ DALIA, TAFLAN**

ELENA, HOLOȘTENCO DANIELA, ROȘOIU NATALIA, 2015, **Preliminary Genetic Analyses for the Species *Hippocampus guttulatus* (Cuvier, 1829) in the Romanian Black Sea**, în Book of Abstracts of the International Symposium PROTECTION OF THE BLACK SEA ECOSYSTEM AND SUSTAINABLE MANAGEMENT OF MARITIME ACTIVITIES - PROMARE 2015, 7th Edition, Constanta, Romania, 29-31 October 2015, editors S. Nicolaev, F.K. Vosniakos, T. Zaharia, M. Golumbeanu, M. Nenciu, ISBN: 978-606-8066-52-3, p. 71.

PARTICIPĂRI LA CONGRESE ȘTIINȚIFICE INTERNAȚIONALE

1. UAB-B.EN.A. International Conference "Environmental Engineering and Sustainable Development", Alba Iulia, România, 23-25 mai 2013 - prezentare orală;
2. U.O.C.-B.EN.A Conference "The Sustainability of Pharmaceutical, Medical and Ecological Education and Research" - SPHAMEER 2013, Constanța, România, 20-23 iunie 2013 - prezentare orală;
3. "Marine Research Horizon 2020 - MARES 2020" International Conference, Hotel "Admiral", Nisipurile de Aur, Bulgaria, 17-21 septembrie 2013 - poster;
4. 4th Black Sea Scientific Conference - Black Sea, Challenges towards Good Environmental Status, Constanța, România, 28-31 octombrie 2013 - poster;
5. International Conference "New Tools for the Sustainable Management of Aquatic Resources", București, România, 17-18 ianuarie 2014 - prezentare orală + poster;
6. International Congress on "Green Infrastructures and Sustainable Societies/Cities" GreInSus 2014, Izmir, Turcia, 8-10 mai 2014 - poster;
7. 1st International Medical Conference "Environment and Public Health" MEDENV 2014, Constanța, România, 12-14 septembrie 2014 - poster;
8. BSB Net-Eco-"Deltas and Wetlands", 15-17 septembrie 2014, Tulcea, România - prezentare orală;
9. Sesiunea Științifică de Toamnă a Academiei Oamenilor de Știință din România, Constanța, România, 19-20 septembrie 2014 - prezentare orală;
10. FABA 2014 International Symposium on Fisheries and Aquatic Sciences, Trabzon, Turcia, 25-27 septembrie 2014 - poster;
11. The 24th Symposium "DELTAS and WETLANDS", 19-21 mai 2015, Tulcea, România - prezentare orală;
12. International U.A.B. - B.EN.A. Conference Environmental Engineering and Sustainable Development, Alba Iulia, România, 28-30 mai 2015 - prezentare orală;
13. 1st International Conference on Sea and Coastal Development in the Frame of Sustainability, MACODESU 2015, Trabzon, Turcia, 18-20 septembrie 2015 - prezentare orală;
14. Sesiunea Științifică de Toamnă 2015 a Academiei Oamenilor de Știință din România. Rolul instituțiilor academice în renașterea și dezvoltarea economică, socială și culturală a României, Iași, România, 24-26 septembrie 2015 - prezentare orală;
15. 1st International Conference on "Ecology and Protection of Marine and Freshwater Environments - ECOPROWATER 2015", Viterbo, Italia, 1-3 octombrie 2015 - prezentare orală;
16. Simpozionul Internațional PROTECTION OF THE BLACK SEA ECOSYSTEM AND SUSTAINABLE MANAGEMENT OF MARITIME ACTIVITIES - PROMARE 2015, 7th Edition, Constanța, România, 29-31 octombrie 2015 - prezentare orală;
17. Sesiunea Științifică a Academiei Oamenilor de Știință din România - Filiala Constanța, Constanța, România, 21 noiembrie 2015, cu lucrarea „Bioacumularea metalelor grele în organisme marine de la litoralul românesc al Mării Negre” - Magda Nenciu, Andra Oros, Daniela Roșioru, Natalia Roșoiu - prezentare orală;
18. Reuniunea de închidere a proiectului CoCoNet - A Coast to Coast NETWORK of protected areas: from the shore to the deep sea, Universitatea Salento, Lecce, Italia, 1-2 decembrie 2015 - Secțiunea Young Scientists, cu lucrarea: "Preliminary Genetic Analyses of *Hippocampus guttulatus* (Cuvier, 1829), charismatic species of Romanian MPAs" - prezentare orală.



PREMIU

Premiul I pentru cel mai bun poster în cadrul Conferinței Internaționale “Environment and Public Health” - MED ENV 2014, Constanța, România, 12-14 septembrie 2014, cu lucrarea “Heavy Metal Bioaccumulation Indicators in Seahorse Tissue”, **NENCIU MAGDA**, OROS ANDRA, ROȘIORU DANIELA, GALAȚCHI MĂDĂLINA, ROȘOIU NATALIA (2014);

Mențiune/ Recognition pentru Best Oral Presentation în cadrul Conferinței Internaționale International U.A.B. - B.EN.A. Conference Environmental Engineering and Sustainable Development, Alba Iulia, Romania, May 28-30th, 2015, pentru lucrarea “Overview of Pollutants Identified in Long-Snouted Seahorse (*Hippocampus guttulatus*, Cuvier 1829) Samples from the Romanian Black Sea Coast”, **NENCIU MAGDA-IOANA**, OROS ANDRA, COATU VALENTINA, ȚIGĂNUȘ DANIELA, ROȘIORU DANIELA, ROȘOIU NATALIA (2015);

Premiul III pentru Best Oral Presentation în cadrul Simpozionului Internațional PROTECTION OF THE BLACK SEA ECOSYSTEM AND SUSTAINABLE MANAGEMENT OF MARITIME ACTIVITIES - PROMARE 2015, 7th Edition, Constanța, România, 29-31 octombrie 2015, pentru lucrarea “Preliminary Genetic Analyses for the Species *Hippocampus guttulatus* (Cuvier, 1829) in the Romanian Black Sea”, **MAGDA-IOANA NENCIU**, DANIELA ROȘIORU, TANIA ZAHARIA, DALIA ONĂRĂ, ELENA TAFLAN, DANIELA HOLOȘTENCO, NATALIA ROȘOIU (2015).

PARTICIPĂRI ÎN CALITATE DE MEMBRU ÎN CONTRACTE DE CERCETARE

1. **PN 09320207 Obținerea informațiilor actualizate necesare extinderii rețelei ecologice europene NATURA 2000 (arii speciale de conservare) în zona marină românească** (coordonator INCDM „Grigore Antipa”);
2. **PN II - Capacități, Modul III: Intelligent Sensing and Information Processing Technology for Fish Product during Cold Chain Management, Contract nr. 623/01.01.2013** (bilaterală România - China), beneficiar UEFISCDI București, coordonator Universitatea „Dunărea de Jos” Galați;
3. **PNII - Parteneriate PCCA 2013, direcția de cercetare 5: Sistem informatic pentru trasabilitatea produselor pescărești bazat pe tehnologia cloud computing** (TraSiPesc), coordonator Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați, contract nr. 167/19.08.2014;
4. **Crearea unei metodologii de utilizare a dispersanților în Marea Neagră, care să poată constitui baza elaborării unui cadru legislativ privind utilizarea dispersanților în Marea Neagră**, contract nr. ROVOCON13-011/28.02.2013, beneficiar ExxonMobil Exploration and Production Romania Limited Nassau (Bahamas), sucursala București (coordonator INCDM „Grigore Antipa”);
5. **Asistență pentru obținerea acordurilor de mediu pentru perimetrele EX 27 - Muridava și EX 28 - Est Cobălcescu, Craiova S, Craiova N**, Contract de consultanță nr. 18/07.01.2013, beneficiar MELROSE RESOURCES ROMANIA B.V. AMSTERDAM (PETROCELTIC SRL), sucursala București (coordonator INCDM „Grigore Antipa”);
6. **Contract de servicii pentru parcurgerea procedurii de obținere a acordului de mediu și a avizului de gospodărire a apelor**, Contract de servicii ROVOCON12-016 din data de 19.06.2012, beneficiar ExxonMobil Exploration and Production Romania Limited Nassau (Bahamas), sucursala București (coordonator INCDM „Grigore Antipa”);
7. **Servicii pentru Monitorizarea stării de conservare a speciilor marine și a habitatelor costiere și marine de interes comunitar din România**, Contract nr. 1208/30.08.2012 (INTEGRA III), Anexa nr. 1 (coordonator INCDM „Grigore Antipa”);
8. **„Studiul privind managementul integrat al zonei costiere”** în cadrul proiectului „Îmbunătățirea managementului integrat al zonei costiere în regiunea Mării Negre, ICZM, contract nr. 84/28.08.2014, beneficiar ABADL Constanța (coordonator INCDM „Grigore Antipa”);
9. **Servicii de obținere a acordului de mediu pentru sonde offshore**, Contract nr. 99001716/01.07.2014, beneficiar OMV Petrom SA (coordonator INCDM „Grigore Antipa”);
10. **CE/PC7-OCEAN-2011: Policy-oriented Marine Environmental Research for the Southern European Seas (PERSEUS)**, Grant Agreement no. 287600/21.12.2011 (INCDM „Grigore Antipa” partener);
11. **CE/PC7 - OCEAN-2011: A Coast to Coast NETwork of protected areas:from the shore to the deep sea (CoCoNET)**, Grant Agreement no. 287844 (INCDM „Grigore Antipa” partener);
12. **DG Environment: Integrated regional monitoring implementation strategy in the South European Seas Grant Agreement 07.0335/2013/659540/SUB/C2 IRIS-SES** (INCDM „Grigore Antipa” partener);
13. **CE/PC: Co-creating ecosystem-based fisheries management solutions MARE FRAME**, Grant Agreement PC7 KBBE:2013-7- single-stage No. 613571 (INCDM „Grigore Antipa” partener).
14. **DG ENV: Sea Basin Checkpoints, LOT NO: 4 - Black Sea, 2015-2018** (INCDM „Grigore Antipa” partener).