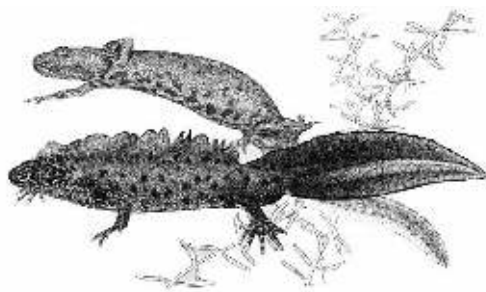


UNIVERSITATEA OVIDIUS DIN CONSTANȚA  
ȘCOALA DOCTORALĂ DE ȘTIINȚE APLICATE  
DOMENIUL DE DOCTORAT BIOLOGIE

## REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

# TRĂSĂTURILE CICLULUI DE VIAȚĂ ȘI COMPORTAMENTUL AMFIBIENILOR



© S.F.M. Teunis

Conducător de doctorat  
Prof.univ.dr. **DAN COGĂLNICEANU**

Student-doctorand  
**TOPLICEANU THEODOR-SEBASTIAN**

CONSTANȚA, 2023

**CUPRINS**

|                                                                                                                                                                  |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Mulțumiri                                                                                                                                                        | Pg. |
| 1. INTRODUCERE                                                                                                                                                   | 1   |
| 1.1 Amfibieni în studiile ecologice și evolutive                                                                                                                 | 1   |
| 1.2. Conservarea amfibienilor                                                                                                                                    | 6   |
| 2. ECOTOXICOLOGIE                                                                                                                                                | 8   |
| 2.1. Ecotoxicologie - aspecte generale                                                                                                                           | 8   |
| 3. COMPORTAMENTUL AMFIBIENILOR                                                                                                                                   | 12  |
| 3.1. Adaptări comportamentale                                                                                                                                    | 12  |
| 3.2. Efectele densității                                                                                                                                         | 12  |
| 3.3. Agresivitatea larvelor                                                                                                                                      | 13  |
| 3.4. Evitarea prădătorilor                                                                                                                                       | 14  |
| 4. STRUCTURA POPULAȚIEI                                                                                                                                          | 16  |
| 4.1. Parametrii de vârstă și dimensiunea corporală                                                                                                               | 16  |
| Scop si obiective                                                                                                                                                | 18  |
| CONTRIBUȚII PERSONALE                                                                                                                                            | 19  |
| 5. CUM INFLUENȚEAZĂ NUMĂRUL DE GRUPE DE OXID DE ETILENĂ TOXICITATEA<br>AGENȚILOR TENSIOACTIVI PE BAZĂ DE SULFAT LA O LINIE CELULARĂ<br>PROVENITĂ DE LA AMFIBIENI | 20  |
| 5.1. Materiale și metode                                                                                                                                         | 20  |

|                                                                                                                                                        |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 5.2. Rezultate                                                                                                                                         | 26 |
| 5.3. Discuții                                                                                                                                          | 30 |
| 6. COMPORTAMENTUL DE HRĂNIRE ȘI MODUL ÎN CARE DENSITATEA LARVELOR AFECTEAZĂ CREȘTEREA, HRĂNIREA ȘI RATA DE SUPRAVIEȚUIRE LA <i>TRITURUS DOBROGICUS</i> | 34 |
| 6.1. Specia studiată                                                                                                                                   | 35 |
| 6.2. Zona de studiu                                                                                                                                    | 36 |
| 6.3. Reproducerea <i>ex-situ</i> a speciei <i>Triturus dobrogicus</i>                                                                                  | 38 |
| 6.4. Mecanismul de hrănire                                                                                                                             | 40 |
| 6.4.1. Materiale și metode                                                                                                                             | 40 |
| 6.4.2. Rezultate                                                                                                                                       | 41 |
| 6.4.3. Discuții                                                                                                                                        | 45 |
| 6.5. Efectul densității asupra dimensiunii corporale și agresivității                                                                                  | 49 |
| 6.5.1. Materiale și metode                                                                                                                             | 49 |
| 6.5.2. Rezultate                                                                                                                                       | 50 |
| 6.5.3. Discuții                                                                                                                                        | 53 |
| 7. VARIAȚIA TRĂSĂTURILOR DE VIAȚĂ A AMFIBIENILOR                                                                                                       | 55 |
| 7.1. Speciile studiate                                                                                                                                 | 56 |
| 7.1.1. <i>Pelobates fuscus</i>                                                                                                                         | 56 |
| 7.1.2. <i>Bufo bufo</i>                                                                                                                                | 58 |
| 7.1.3. <i>Rana temporaria</i>                                                                                                                          | 61 |
| 7.2. Scheletocronologia                                                                                                                                | 63 |
| 7.3. Răspunsul speciei <i>Pelobates fuscus</i> la modificarea habitatului                                                                              | 65 |

|                                                                                                                                               |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 7.3.1. Materiale și metode                                                                                                                    | 65  |
| 7.3.2. Rezultate                                                                                                                              | 68  |
| 7.3.3. Discuții                                                                                                                               | 73  |
| 7.4. Modificările în timp ale parametrilor de vârstă și a dimensiunii corporale la două populații de <i>Bufo bufo</i>                         | 75  |
| 7.4.1. Materiale și metode                                                                                                                    | 75  |
| 7.4.2. Rezultate                                                                                                                              | 78  |
| 7.4.3. Discuții                                                                                                                               | 86  |
| 7.5. Analiza literaturii privind variația vârstei și a dimensiunii corporale la trei specii de amfibieni de-a lungul gradientului altitudinal | 87  |
| 7.5.1. Materiale și metode                                                                                                                    | 87  |
| 7.5.2. Rezultate                                                                                                                              | 89  |
| 7.5.3. Discuții                                                                                                                               | 95  |
| CONCLUZII                                                                                                                                     | 97  |
| REFERINȚE                                                                                                                                     | 99  |
| PUBLICAȚII ȘI COMUNICĂRI ȘTIINȚIFICE                                                                                                          | 114 |
| MATERIALE SUPLIMENTARE                                                                                                                        | 117 |

## Mulțumiri

Deoarece orice lucrare are nevoie de sprijin financiar, aş dori să mulțumesc în primul rând autorităților care au sprijinit financiar această lucrare:

- *"Is range limited by life history, environmental conditions, or biogeographical barriers? A study case using spadefoot toads (genus Pelobates)"* (Grant PN II IDEI - UEFISCDI)
- Două mobilități ERASMUS+ la Universitatea din Nis (Nis, Serbia) și la Universitatea din Shumen (Shumen, Bulgaria) (mobilități finanțate de Uniunea Europeană).
- Această lucrare a fost susținută și de proiectul ANTREPRENORDOC, în cadrul Programului Operațional Sectorial Dezvoltarea Resurselor Umane 2014-2020, finanțat din Fondul Social European prin contractul nr. 36355/23.05.2019 HRD OP /380/6/13 - Cod SMIS: 123847.
- Short Term Scientific Missions (STSM), parte a acțiunii COST (European Cooperation in Science and Technology) PERIAMAR CA18221 (Pesticide RIsk AssessMent for Amphibians and Reptiles) la Universitatea din Aveiro (Aveiro, Portugalia). Finanțat de Horizon Europe Framework Programme al Uniunii Europene.

De asemenea, aş dori să mulțumesc autorităților care au eliberat permisele necesare, aprobările și accesul pentru munca de teren în zonele special desemnate, alături de accesul la facilități pentru efectuarea experimentelor:

- Comisia de Etică a Facultății de Științe Naturale și Științe Agricole, Universitatea Ovidius din Constanța.
- Administrația Rezervației Biosferei Delta Dunării
- Administrația Parcului Național Munții Măcinului
- Universitatea din Shumen (Shumen, Bulgaria), Departamentul de Biologie
- Departamentul de Biologie al Universității din Aveiro (Aveiro, Portugalia)

Aş fi recunoscător persoanelor care m-au ajutat în timpul anilor de studiu cu toate eforturile, cunoștințele și bunăvoința lor de a furniza informații și date din teren:

- Îndrumarea și prezentarea modului de lucru pentru creșterea culturii celulare și desfășurarea experimentelor: Dr. Isabel Lopes, Dr. Miguel Oliveira, Dr. Monica Almeida, Sonia Coelho și Fabio Ribeiro de la Universitatea din Aveiro, departamentul de Biologie.
- Date din teren: Prof. Dr. Dan Cogălniceanu, Dr. Paul Székely, Dr. Diana Székely, Dr. Florina Stănescu de la Universitatea Ovidius din Constanța.
- Experimente de laborator: Dr. Nikolay Natchev și Dr. Teodora Koynova de la Universitatea din Shumen (Shumen, Bulgaria); Prof. Dr. Dan Cogălniceanu, Dr. Florina Stănescu, Dr. Tudor Marian, Drd. Telea Alexandra, Drd. Vlad Sabina Drd. Fânaru Geanina, Vizireanu Miruna, Voiculescu Lavinia de la Universitatea Ovidius din Constanța.

Fiecare comentariu critic, sprijin și îndrumări de-a lungul timpului au îmbunătățit această lucrare și pentru aceasta doresc să mulțumesc Dr. Florina Stănescu, Dr. Tudor Marian, Drd. Telea Alexandra, Drd. Fânaru Geanina, Dr. Marius Skolka, Dr. Raluca Băncilă, Dr. Cristina Preda, Dr. Danyiar Memedemin.

În cele din urmă, pentru tot ceea ce am menționat mai sus, pentru timpul petrecut pentru a mă ajuta cu această lucrare, pentru că m-a îndrumat și m-a împins să îmbunătățesc nu numai teza, ci și persoana și cercetătorul de acum, pentru că m-a încurajat să aplic la diferite mobilități și să întâlnesc noi cercetători și medii de lucru diferite, aș dori să îi mulțumesc mentorului meu Prof. Dr. Dan Cogălniceanu și îi voi fi recunoscător pentru fiecare moment petrecut în acești ani.

## **1. INTRODUCERE**

### **1.1 Amfibieni în studiile ecologice și evolutive**

Amfibienii sunt vertebrate care fac parte din grupul tetrapodelor ectoterme (temperatura lor internă variază în funcție de temperatura mediului înconjurător), fiind răspândite în întreaga lume, cu excepția regiunilor polare și cu o diversitate mai mare în habitatele tropicale (AmphibiaWeb, 2023). Amfibienii au un ciclu de viață complex care necesită atât habitate acvatice, cât și terestre. Acest ciclu de viață complex se exprimă prin modificări morfologice și fiziologice (aparitia membrelor, resorbția branhiilor și formarea plămânilor la adulți, resorbția cozii în momentul metamorfozei), dar și prin modificări etologice (modificări în locomoție și hrănire) (Duellman și Trueb, 1994). Majoritatea speciilor utilizează habitatele acvatice pentru depunerea ouălor și dezvoltarea larvelor până la metamorfoză, când majoritatea speciilor încep să utilizeze habitatele terestre. Alte specii sunt complet acvatice, stadiile lor embrionare, larvare și adulte au loc în apă, în timp ce alte specii (de exemplu, speciile vivipare și ovipare) sunt complet terestre, chiar dacă au nevoie de un mediu relativ umed pentru dezvoltarea embrionară (Duellman și Trueb, 1994). Amfibienii au o piele permeabilă, acoperită cu mucus care nu numai că îi protejează de infecții și paraziți, dar îi ajută și la termoreglare și schimbul de gaze (Wells, 2007).

### **1.2. Conservarea amfibienilor**

Conform Listei Roșii a IUCN (2023), amfibienii sunt cel mai periclitat grup de vertebrate terestre din întreaga lume. Mai mult de 35% dintre specii sunt listate ca fiind vulnerabile (VU), în pericol (EN), în pericol critic (CR), dispărute din natură (EW) sau dispărute (EX). Mai mult de 5% sunt susceptibile de a fi în pericol în viitor, fiind listate ca fiind aproape amenințate (NT). Restul speciilor sunt enumerate ca fiind cu probabilitate mică de dispariție (44%), iar pentru mai mult de 15% dintre specii nu există suficiente date privind distribuția geografică și starea populației pentru a evalua riscul de amenințare. Datele privind distribuția geografică a speciilor sunt esențiale pentru acțiunile de conservare, deoarece reprezintă principala componentă pentru estimarea diversității specifice și pentru explicarea trăsăturilor ecologice ale speciilor (Chapman, 2005). Multe specii de amfibieni se confruntă cu amenințări serioase, din cauza pierderii habitatului, schimbărilor climatice, poluării (Baillie și colab., 2010; Beebe și Griffiths, 2005; Blaustein și colab., 1994;

Jensen și Camp, 2003) dar și bolilor (Berger și colab., 1998; Daszak și colab., 2000; Kiesecker și colab., 2001; Laurance și colab., 1996;), ceea ce duce la un declin sever al populațiilor de amfibieni. Eforturile de conservare au ca scop reducerea amenințărilor la adresa populațiilor de amfibieni și protejarea habitatelor acestora (IUCN, 2022). Aceste eforturi pot include refacerea habitatului (Pabijan și colab., 2020), programe de reproducere în captivitate (Silla și colab., 2021) și de reintroducere (Vaissi și colab., 2019), precum și punerea în aplicare a legilor și politicilor de protecție a amfibienilor și a habitatelor acestora.

## **2. ECOTOXICOLOGIE**

### **2.1. Ecotoxicologie - aspecte generale**

Amploarea, diversitatea și lunga perioadă de conflicte între conservarea biodiversității, pe de o parte, și activitățile umane, pe de altă parte, sugerează că Pământul se află deja în epoca Antropocenului (Lewis și Maslin, 2015). Aceștia au numit două crize majore, criza de mediu (pe care mă voi concentra în această teză) și criza socială (World Economic Forum, 2023). Riscul global care va fi cel mai pronunțat în următorul deceniu, conform raportului, este "Pierderea biodiversității și prăbușirea ecosistemelor" (World Economic Forum, 2023). Intensificarea industriei și a nevoilor agricole, modificarea peisajului din cauza urbanizării și, în general, încălzirea globală și schimbările climatice duc la un declin puternic al biodiversității (Vitt și Caldwell, 2014).

Populațiile de amfibieni sunt în declin, iar principalul factor determinant este reprezentat de activitățile umane. La începutul anului 1990, problema declinului populației de amfibieni și a modului în care starea lor se schimbă rapid a fost recunoscută pe scară largă (Blaustein, 1990; Vitt și colab., 1990). Producția de substanțe chimice a contribuit de-a lungul timpului la îmbunătățirea calității vieții umane, creând compuși chimici utili cu o eficiență ridicată. Cu toate acestea, toate aceste substanțe au fost dezvoltate cu puțină preocupare față de efectele negative asupra mediului (Zimmerman și colab., 2020).



### **3. COMPORTAMENTUL AMFIBIENILOR**

#### **3.1. Adaptări comportamentale**

Domeniul ecologiei comportamentale cuprinde diverse aspecte ale trăsăturilor legate de istoria vieții amfibienilor, cum ar fi locomoția, interacțiunile sociale, căutarea hranei și evitarea prădătorilor. Deciziile luate de indivizi cu privire la comportamentul lor le afectează fitness-ul, deoarece determină capacitatea lor de a concura cu alți indivizi (interacțiuni intraspecifice sau interspecifice), de a scăpa de prădători și de a se hrăni (Vitt și Caldwell, 2014). Indivizii se străduiesc să echilibreze avantajele comportamentului social, care sporesc fitness-ul individual, cu costurile de obținere a resurselor necesare pentru a menține activitatea și cu potențialele pericole reprezentate de prădători în timp ce sunt implicați în aceste activități (Vitt și Caldwell, 2014). Un alt factor care modifică comportamentul amfibienilor este disponibilitatea apei. Modificările nivelului apei în timpul perioadelor de depunere a icrelor și a larvelor pot afecta succesul reproductiv al populațiilor locale (Wells, 2007), amfibienii renunțând la reproducere dacă mediul acvatic nu corespunde nevoilor ecologice. Mediul acvatic este important, deoarece poate modela trăsăturile de viață ale amfibienilor începând cu stadiile de viață tinere (ouă și larve), care sunt vulnerabile la secetă (Kiesecker și colab., 2001; Vignoli și colab., 2018). Absența parțială sau totală a succesului de reproducere a amfibienilor în timpul sezonului de reproducere este principalul efect pe termen scurt al secetei (Carey și colab., 2003) și, extrapolat pe termen mediu, poate cauza declinul populației (Stewart, 1995)

#### **3.2. Efectele densității**

Densitățile mari reprezintă evenimente forțate de agregare cauzate de mai mulți factori. În cele mai multe cazuri, aceste evenimente sunt rezultatul perioadelor de reproducere și al perioadelor de inactivitate (hibernare sau estivare) la indivizii adulți, în care amfibienii sunt supraaglomerați în adăposturi, atâta timp cât factorii de mediu nu corespund cerințelor lor ecologice (Vitt și Caldwell, 2014). În schimb, la larve, apar atât agregarea, cât și evitarea. Atracția socială, comportamentul și cooperarea limitată au fost observate în rândul unor mormoloci de anure, ceea ce contrastează cu comportamentul solitar al majorității larvelor de amfibieni. Aceste interacțiuni sunt adesea facilitate de recunoașterea rudelor apropiate (Pfennig, 1997). Pentru

larvele de anure, există beneficii care rezultă din agregare, iar acest comportament a fost observat în 10 familii de anure (Wells, 2007). Beneficiile agregării au fost observate în ceea ce privește factorii fiziologici (termoreglarea), hrănirea și protecția împotriva prădătorilor (Wells, 2007). În timp ce larvele de anure manifestă comportamente de agregare, larvele de urodele sunt de obicei solitare și tind să evite interacțiunea cu alți indivizi. Atunci când apar interacțiuni, indivizii manifestă agresivitate și chiar canibalism în cadrul populației lor (Wells, 2007). De asemenea, concurența pentru resurse, cum ar fi hrana și oxigenul, ar putea fi un factor declanșator pentru ca larvele de urodele să evite agregarea.

### **3.3. Agresivitatea larvelor**

Majoritatea larvelor de amfibieni au un comportament solitar, dar acest model este larg răspândit la larvele de urodele datorită comportamentului lor agresiv și canibalistic (Wells, 2007). Comportamentul solitar manifestat de larvele de tritoni și salamandre este probabil legat de concurența ridicată între larve, de apariția canibalismului oportunist și de apariția unor forme de canibalism specific (Wells, 2007). Deși canibalismul este prezent la larvele de salamandă, indivizii preferă să evite conspecificii dacă este disponibilă o altă sursă de hrană (Pfennig și colab., 1994). Acest mecanism este legat de conservarea fitness-ului general al populației locale (Pfennig și colab., 1994). Efectele pe termen scurt ale unei densități ridicate în stadiul timpuriu de viață al larvelor de amfibieni includ dimensiuni corporale și rate de creștere mai mici și dimensiuni mai mici la metamorfoză (Székely și colab., 2017), metamorfoză accelerată (Denver și colab., 1998; Kohli și colab., 2019) și o mortalitate mai mare asociată cu concurența intraspecifică și interspecifică (Rowe și Dunson, 1995; Vaissi și Sharifi, 2016). Efectele pe termen lung ale agresivității induse de densitate la larvele de urodele sunt reprezentate de o rată de creștere mai mică a indivizilor subadulți (Vignoli și colab., 2018). Experimentele de laborator au arătat că adulții se pot recupera după un start nereușit cauzat de densități larvare ridicate, dar acest lucru se poate întâmpla numai în medii favorabile, fără prădători și fără boli și cu rezerve de hrană nelimitate (Vignoli și colab., 2018).

### 3.4. Evitarea prădătorilor

La întâlnirea cu prădătorii, speciile pradă manifestă o serie de reacții comportamentale, cum ar fi mutarea imediată sau modificarea tiparelor de mișcare și activitate (Lima și Dill, 1990). Influența prădătorilor asupra dezvoltării diferitelor trăsături ale ciclului de viață al amfibienilor, inclusiv strategiile utilizate pentru a scăpa de prădători, secreția de substanțe toxice, utilizarea camuflajului (culoare criptică) sau a culorilor de avertizare (culoare aposematică) a jucat un rol semnificativ în evoluția amfibienilor. Deși este evident că prădătorii au jucat un rol crucial în evoluție, dovezile indică faptul că animalele posedă capacitatea de a-și evalua și ajusta vulnerabilitatea la prădători prin comportamentul lor în timpul vieții (Lima și Dill, 1990). Mai mult, prădătorii sunt considerați un instrument selectiv care are un impact asupra a numeroase alte adaptări ale comportamentului și asupra ecologiei amfibienilor (Tuttle și Ryan, 1981; Wilbur, 1980).

Multe specii de nevertebrate sunt prădători ai speciilor de amfibieni, în toate stadiile de viață: ouă, larve, juvenili și adulți. Astfel, lipitorile atacă șiucid adulții de *Lissotriton vulgaris*, *Bufo bufo* și *Rana temporaria* (Merilä și Sterner, 2002). Axelsson și colab. (1997) au arătat că larvele și ouăle de *R. temporaria*, *B. bufo*, *Hyla arborea*, *Epidalea calamita* și *Pelophylax esculentus* sunt consumate de două specii de raci (*Pacifastacus leniusculus* și *Astacus astacus*) în diferite condiții de laborator. Mormolocii și juvenili de *Pelobates cultripes* sunt prădați de indivizi de dimensiuni similare de *Triops cancriformis* (Phyllopoda) (Knoepffler, 1978).

## 4. STRUCTURA POPULAȚIEI

### 4.1. Parametrii de vârstă și dimensiunea corporală

Înțelegerea dinamicii pe clase de vârstă a populației este una dintre cele mai importante baze de referință în conservarea biodiversității (Tarsi și Tuff, 2012). Studiile demografice pot oferi informații despre factorii care influențează dimensiunea, structura și distribuția populațiilor de animale. Aceste informații pot fi utilizate pentru a dezvolta strategii de conservare și planuri de gestionare pentru speciile amenințate sau pe cale de dispariție (Caughley, 1994). Un alt avantaj al studiilor demografice îl reprezintă identificarea speciilor în declin, ceea ce este esențial pentru eforturile de conservare. Urmărind tendințele unei populații de-a lungul timpului, cercetătorii pot

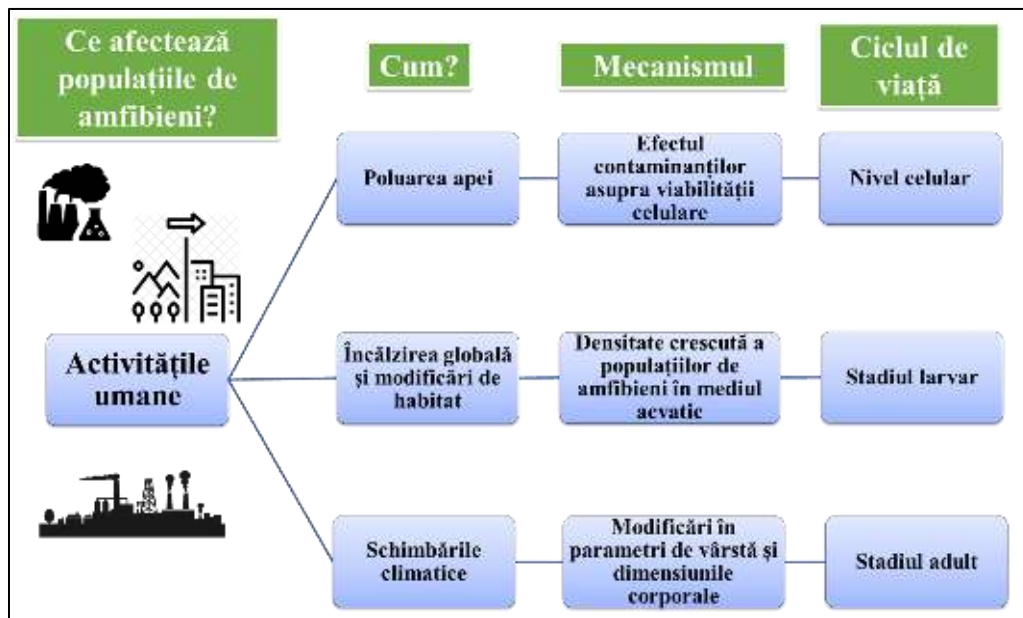
detecta schimbările în mărimea sau structura populației și pot identifica amenințările potențiale la adresa speciei (Caughley, 1994). Încă un avantaj este reprezentat de capacitatea studiilor demografice de a estima ratele de creștere ale populațiilor, ceea ce poate ajuta la prezicerea dimensiunilor viitoare ale populației și la determinarea capacității de suport a ecosistemelor (Sibly și Hone, 2002).

Estimarea vârstei este importantă pentru înțelegerea istoriei vieții și a ecologiei populațiilor de amfibieni, ceea ce este esențial pentru conservarea acestora. Acest lucru poate fi realizat prin mai multe metode, dar capturarea-marcarea-recapturare (CMR) și scheletocronologia sunt cele mai utilizate metode.

## Scopul și obiectivele

Această teză a contribuit la evaluarea efectele amenințărilor generate de activitățile umane asupra diferitelor stadii de viață ale amfibienilor. Am analizat efectele la nivel celular (viabilitatea celulelor); stadiul larvar (supraviețuire, dimensiuni la metamorfoză iar suplimentar a fost descris mecanismul de hrănire); și adulții (structura pe clase de vârstă și creșterea). Au fost stabilite patru obiective:

- 1) evaluarea concentrației letale a contaminanților asupra viabilității celulare a amfibienilor;
- 2) descrierea mecanismului de hrănire a larvelor și evaluarea efectului secetei asupra supraviețuirii și dimensiunii la metamorfoză la *Triturus dobrogicus*;
- 3) efectul densității asupra stadiului larvar al *T. dobrogicus*
- 4) analiza efectului variației geografice și identificarea răspunsului populației asupra parametrilor legați de vârstă și de mărime în cazul populațiilor de *Bufo bufo*, *Pelobates fuscus* și *Rana temporaria*.





## 5. CUM INFLUENȚEAZĂ NUMĂRUL DE GRUPE DE OXID DE ETILENĂ TOXICITATEA AGENȚILOR TENSIOACTIVI PE BAZĂ DE SULFAT LA O LINIE CELULARĂ PROVENITĂ DE LA AMFIBIENI

Acest capitol are la bază manuscrisul "**The number of ethylene oxide groups of sulphate-based surfactants influence the cytotoxicity of mixed micelles to an amphibian cell line**" de **Sebastian Topliceanu**, Monica Almeida, Miguel Oliveira, Dan Cogălniceanu, Isabel Lopes, trimis spre publicare la Archives of Environmental Contamination and Toxicology. Contribuția mea la această lucrare a inclus: investigația, conceptualizarea manuscrisului, metodologia aplicată, analiza datelor și redactarea articolului original.

În acest capitol am testat dacă există diferențe în concentrația letală ( $CL_{50}$ ) între diferitele structuri chimice ale lauril eter sulfatului de sodiu. Pe baza rezultatelor, se poate afirma dacă testarea *in vitro* folosind linii celulare de amfibieni reprezintă o alternativă la testarea ecotoxicologică clasică pe animale vii.

### 5.1. Materiale și metode

#### Substanța testată

Lauril eter sulfatul de sodiu ( $SLE_nS$ ) este utilizat în pesticidele comerciale ca adjuvant, în produsele de îngrijire personală și de curățare, dar și în procesele de excavare industrială, datorită costului său scăzut și faptului că este un agent spumant foarte eficient. A fost evaluată toxicitatea a șase surfactanți anionici diferiți. Tipurile de  $SLE_nS$  se diferențiază prin numărul de unități de oxid de etilenă prezente în structura lor chimică. Următoarele soluții stoc de  $SLE_nS$  au fost furnizate de BASF SE (BASF GmbH, Dusseldorf) și testate:  $SLE_0S$ ,  $SLE_1S$ ,  $SLE_4S$ ,  $SLE_{11}S$ ,  $SLE_{30}S$ ,  $SLE_{50}S$ , unde numărul reprezintă la unitățile de oxid de etilenă (EO).

## Modelul biologic

Linia celulară utilizată în acest studiu a fost linia celulară epitelială A6 (ECACC 89072613), izolată din rinichiul unui mascul adult de *Xenopus laevis* (Rafferty Jr., 1969). Linia celulară a fost pusă la dispoziție de către profesorul Peter Lorenz de la Universitatea din Rostock (Germania).

## Testele MTT și Resazurina

Pentru a evalua citotoxicitatea celor șase variante de SLE<sub>n</sub>S pentru liniile celulare A6, au fost efectuate două teste de viabilitate diferite: MTT și Resazurina, în conformitate cu orientările Institutului Național de Sănătate (NIH) (Riss și colab., 2016), care au fost adaptate la linia celulară A6.

## 5.2. Rezultate

### MTT

Viabilitatea celulară a arătat o diferență semnificativă între timpii de expunere de 24 h și 48 h pentru SLE<sub>1</sub>S și SLE<sub>11</sub>S, în timp ce nu au existat diferențe semnificative în ceea ce privește timpul de expunere pentru SLE<sub>0</sub>S, SLE<sub>4</sub>S, SLE<sub>30</sub>S și SLE<sub>50</sub>S. Pe baza valorilor CL<sub>50</sub> estimate, atât la timpii de expunere de 24 h, cât și la 48 h, variantele cu unități EO mai mici, SLE<sub>0</sub>S, SLE<sub>1</sub>S și SLE<sub>4</sub>S au prezentat o citotoxicitate ușor mai mare decât SLE<sub>11</sub>S, SLE<sub>30</sub>S și SLE<sub>50</sub>S (fig. 1). Deși această tendință a variantelor SLE<sub>n</sub>S cu unități EO mai mari prezintă o citotoxicitate mai mică, nu s-a observat o asociere pozitivă semnificativă între numărul de unități EO și valorile CL<sub>50</sub>, după 24 și 48 de ore de expunere.

### Resazurina

Viabilitatea celulară nu a prezentat diferențe semnificative între 24 și 48 de ore de expunere, pentru toate cele șase variante de SLE<sub>n</sub>S. Valorile CL<sub>50</sub> estimate au crescut odată cu unitățile EO ale variantelor SLE<sub>n</sub>S, atât la 24 h, cât și la 48 h (fig. 1). S-a constatat o asociere pozitivă semnificativă la 24 h și 48 h de expunere, între numărul de unități EO ale variantelor SLE<sub>n</sub>S și valorile LC<sub>50</sub> calculate.

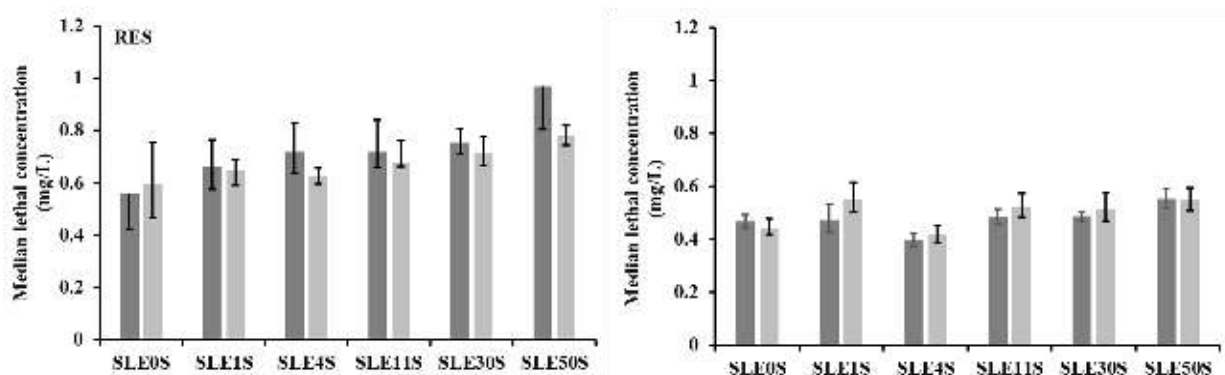


Figura 1. Concentrațiile letale medii ( $LC_{50}$ ) calculate pentru cele șase variante  $SLE_nS$ , după 24 de ore (bare gri închis) și 48 de ore (bare gri deschis), pe baza testelor MTT și resazurină (RES). Barele de eroare reprezintă intervalul de confidență (95 %), lipsa barelor superioare înseamnă că limita superioară de confidență de 95 % nu a putut fi calculată.

### 5.3. Discuții

Rezultatele obținute au variat în funcție de testul utilizat. Testul cu resazurină a indicat că variantele  $SLE_nS$  cu un număr mai mic de unități EO au fost cele mai toxice pentru liniile celulare A6, prezentând valori mai mici ale  $LC_{50}$ . Cu toate că rezultatele testului MTT au arătat un model similar, în care un număr mai mic de unități de EO asociat cu o toxicitate mai mare, nu s-a observat nicio asociere semnificativă între valorile calculate ale  $LC_{50}$  și numărul de grupuri de OE.



## 6. COMPORTAMENTUL DE HRĂNIRE ȘI MODUL ÎN CARE DENSITATEA LARVELOR AFECTEAZĂ CREȘTEREA, HRĂNIREA ȘI RATA DE SUPRAVIEȚUIRE LA *TRITURUS DOBROGICUS*

Acest capitol a fost publicat în două articole științifice în cadrul unei colaborări internaționale cu cercetătorii de la Universitatea Shumen, Shumen Bulgaria și Universitatea din Viena, Viena, Austria.

Contribuția mea la primul articol "**Ontogenetic Changes of the Aquatic Food Uptake Mode in the Danube Crested Newt (*Triturus dobrogicus* Kiritzescu 1903)**" de Nikolay Natchev, Kristina



Yordanova, **Theodor-Sebastian Topliceanu**, Teodora Koynova, Dimitar Doichev și Dan Cogălniceanu, constă în designul experimental, implementarea experimentului, analiza datelor și redactarea secțiunilor material și metode și rezultate pentru articol. Această lucrare a fost publicată în 2021 în *Frontiers in Ecology and Evolution* (a se vedea citarea completă în secțiunea de referință). Articolul poate fi găsit aici:

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fevo.2021.641657/full>

Cel de-al doilea articol intitulat " **Short-term effects of larval density on the body size and behaviour in *Triturus dobrogicus* (Kiritzescu 1903)**" de **Theodor-Sebastian Topliceanu**, Nikolay Natchev, Teodora Koynova și Dan Cogălniceanu, a fost publicat în *Analele Academiei Oamenilor de Știință din România*, seria Științe Biologice, 12(1), 21 – 28. Contribuția mea la acest articol a inclus redactarea manuscrisului original, analiza datelor și corespondența cu editorii. Articolul poate fi găsit aici: <https://www.aos.ro/wp-content/anale/BVol12Nr1Art.2.pdf>

În acest capitol, am urmărit să descriu mecanismul de hrănire și locomoția larvelor de *Triturus dobrogicus* și am testat o serie de ipoteze. Am estimat dacă dimensiunea la metamorfoză și rata de supraviețuire a larvelor sunt mai mici la densități mai mari și am testat dacă agresivitatea este mai intensă la o densitate individuală mai mare.

### 6.1. Specia studiată

Tritonul cu creastă dunărean *Triturus dobrogicus* are o arie de distribuție restrânsă, fiind prezent în câmpiile inundabile ale râurilor mari din estul Austriei până în Delta Dunării (Fahrbach și Gerlach, 2018). Specia se caracterizează printr-un corp lung și membrele scurte. Tritonul cu creastă dunărean este specia cu cea mai mare dependență de mediul acvatic dintre speciile genului său și are cel mai lung stadiu larvar dintre speciile de *Triturus* sp. (Furtula și colab., 2009).

### 6.2. Zona de studiu

Animalele au fost colectate din partea sudică a Rezervației Biosferei Delta Dunării (Grindul Lupilor: 44°37'15.83" N, 28°48'24.92" E). Șaptesprezece adulți (9 masculi și 8 femele) de *Triturus dobrogicus* au fost capturați dintr-o baltă temporară înainte de perioada de reproducere din 2020.

### 6.3. Reproducerea *ex-situ* a speciei *Triturus dobrogicus*

Toate experimentele de laborator au fost efectuate în primăvara anului 2020. După experimente, adulții și juvenilii au fost eliberați înapoi la locul de capturare. Atunci când masculii și-au diferențiat clar crestele dorsale, trei femele și trei masculi au fost repartizați aleatoriu într-o cutie pentru reproducere. După eclozarea larvelor, am mutat larvele proaspăt eclozate în cutiile experimentale. Aceste acvarii au fost umplute cu 3L de apă de robinet stătută, 1/3 din apa din acvarii a fost reîmprospătată la fiecare 4 zile.

### 6.4. Mecanismul de hranire

#### 6.4.1. Materiale și metode

Înregistrările comportamentului de hrănire au început de la stadiul de dezvoltare 42 până la stadiul de dezvoltare 50 (stadiul pre-metamorfic) (după Bernabò și Brunelli, 2019). În stadiul pre-metamorfic, comportamentul de hrănire al larvelor s-a schimbat și acestea încep să caute în mod activ hrană la suprafața apei. Larvele au fost hrănite cu 24h înainte de înregistrările comportamentale. Au fost observați următorii parametri: **A**, unghiul dintre centrul de masă al particulei de hrană și axa longitudinală a capului larvei (în grade); **D**, distanța față de pradă (cm); **S**, viteza larvelor față de pradă în timpul etapei de apropiere (cm/s); **TL**, lungimea larvei (cm); **TT**, lungimea traiectoriei vârfului cozii (cm); **ST**, viteza maximă de deplasare a vârfului cozii în timpul etapei de apropiere (cm/s); **SDi**, distanța parcursă de vârful botului în timpul aspirației inerțiale (cm); **SS**, viteza de deplasare a vârfului botului în timpul aspirației inerțiale (cm/s).

#### 6.4.2. Rezultate

Larvele s-au hrănit cu succes odată cu scăderea distanței până la hrană. În cazul unei hrăniri reușite, un ST mai mare reprezintă o probabilitate mai mică de hrănire. Celelalte variabile analizate nu prezintă diferențe semnificative în ceea ce privește probabilitatea de hrănire (fig. 2). Distanța inițială dintre individ și pradă a avut un efect semnificativ asupra comportamentului de hrănire al larvelor de *T. dobrogicus*. Atunci când particula de hrană a aterizat pe fundul acvariului la o distanță relativ mare, larvele au înotat în mod activ. În cazul în care particula de hrană s-a scufundat la o distanță mai mică de 6 % din lungimea corpului larvelor, acesta a fost imediat atacat de către larve fără nicio implicare a sistemului locomotor. În cazul în care particulele au aterizat la o

distanță mai mare de 74 % din lungimea corpului, larvele au reacționat în două moduri diferite. În majoritatea cazurilor, animalele nu au reacționat deloc la stimul.

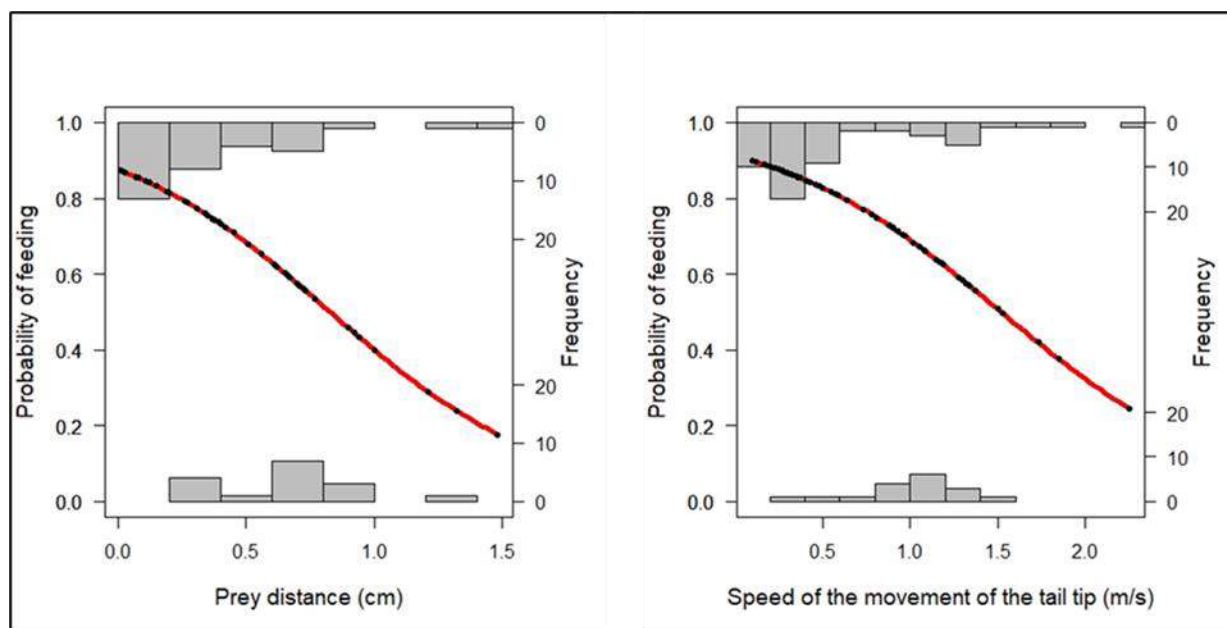


Figura 2. Stânga: Efectele distanței pradei asupra probabilității de hrănire; Dreapta: Efectul vitezei asupra probabilității

### 6.4.3. Discuții

Larvele tinere de *T. dobrogicus* își petrec timpul predominant pe fundul apei și au un teritoriu de vânătoare mai mult sau mai puțin bidimensional. Abia după dezvoltarea membrilor în fazele târzii de pre-metamorfoză, larvele încep să exploateze întregul volum al bazinului de apă și sunt capabile să atace prada din mai multe direcții. Această schimbare ar putea permite larvelor să vâneze prada mai mare și mai agilă, ceea ce, la rândul său, ar putea contribui la eficiența hrănirii și ar putea duce la îmbunătățirea condiției fizice generale a indivizilor

## 6.5. Efectul densității asupra dimensiunii corporale și agresivității

### 6.5.1. Materiale și metode

Larvele au fost mutate în cutii experimentale de 3L după eclozare. Cutiile experimentale sunt constituite din 3L de apă de la robinet stătută. Experimentul a constatat în trei densități diferite: 1 ind/L (densitate scăzută); 2 ind/L (densitate medie) și 3 ind/L (densitate ridicată) cu câte 3 replicate fiecare.

### Rata de creștere, rata de supraviețuire, agresivitatea și canibalismul

Larvele au fost fotografiate în ziua eclozării și la fiecare 8 zile de experiment, până în ziua 88 a experimentului și la metamorfoză. Larvele au fost măsurate și au fost notate următoarele variabile: lungimea totală (TL); lungimea de la vârful botului până la cloacă (SVL) - începând cu ziua 48 a experimentului, când cloaca era vizibilă.

#### 6.5.2. Rezultate

##### Rata de creștere și dimensiunea la metamorfoză

Am constatat diferențe semnificative între densități în ceea ce privește dimensiunea la metamorfoză. Indivizii din densitățile mai mici au dimensiuni mai mari la metamorfoză în comparație cu indivizii din densitățile mai mari. SVL mediu nu a prezentat diferențe semnificative între densități în timpul stadiului larvar. Cele mai tinere larve s-au metamorfozat la 84 de zile de la eclozare (în densitate scăzută), în timp ce cele mai bătrâne larve s-au metamorfozat la 159 de zile de la eclozare (în densitate ridicată) (tabelul 1).

Tabelul 1. Valorile minime, maxime și medii ale SVL la metamorfoză și durata stadiului larvar.

|                              | <b>Densitate scăzută<br/>(n=5)</b>               | <b>Densitate medie<br/>(n=11)</b>                | <b>Densitate mare<br/>(n=18)</b>                 |
|------------------------------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
|                              | <b>medie <math>\pm</math> SD<br/>(min - max)</b> | <b>medie <math>\pm</math> SD<br/>(min - max)</b> | <b>medie <math>\pm</math> SD<br/>(min - max)</b> |
| <b>Metamorfoză SVL (mm)</b>  | 37.76 $\pm$ 1.48<br>(35.26 - 38.91)              | 34.96 $\pm$ 3.30<br>(29.86 - 39.28)              | 33.31 $\pm$ 3.47<br>(28.6 - 42.14)               |
| <b>Stadiul larvar (zile)</b> | 105 $\pm$ 20.32<br>(84 - 138)                    | 113.82 $\pm$ 17.04<br>(89 - 158)                 | 108.06 $\pm$ 16.05<br>(92 - 159)                 |

##### Rata de supraviețuire, agresivitatea și canibalismul

Rata de supraviețuire a fost mai mare la o densitate scăzută (0,67) și s-au observat rate de supraviețuire similare la densități medii și mari (0,56) (fig. 3). Nivelul de agresivitate a prezentat diferențe semnificative între densități. Cel mai ridicat nivel de agresivitate a fost observat la densitatea mare (1,25), urmat de densitatea medie (1,17) și de densitatea mică (1,15). Canibalismul a fost observat de două ori la densitatea mică și medie, în timp ce la densitatea mare am observat 5 cazuri de canibalism.

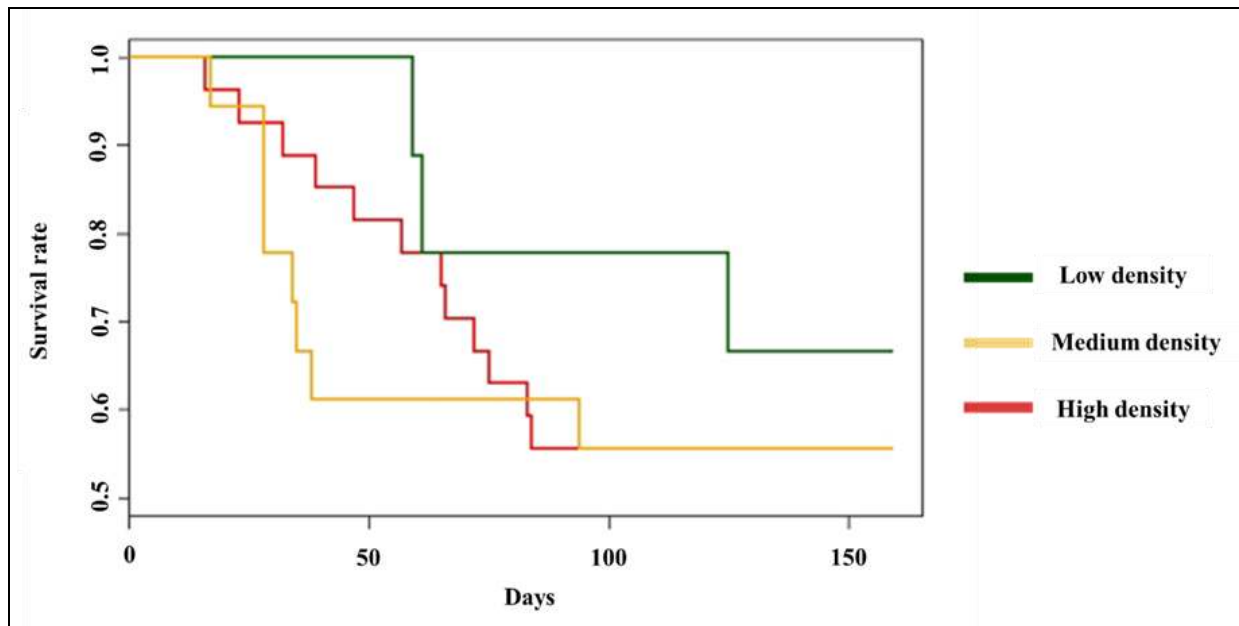


Figura 3. Dinamica ratei de supraviețuire a larvelor de *T. dobrogicus* în condiții de densitate scăzută, medie și ridicată.

### 6.5.3. Discuții

Rezultatele acestui studiu au arătat că indivizii metamorfozați din densitatea mai mare au dimensiuni mai mici la metamorfoză, perioade acvatice mai lungi și prezintă niveluri mai agresivitate mai mare. Timpul la metamorfoză în acest studiu este considerabil mai rapid (84 - 159 de zile). Aceste rezultate sugerează că o competiție în timpul stadiului larvar accelerează dezvoltarea larvelor pentru a părăsi mediul acvatic ca să evite competiția intraspecifică a larvelor. S-a constatat o rată de supraviețuire mai mare în cazul densității scăzute, deși rata de supraviețuire nu a prezentat diferențe semnificative între densități. Mai mult, nivelul de agresivitate și chiar canibalismul a crescut la densități individuale mai mari. În general, studiul de față a arătat modul în care densitatea crescută a larvelor afectează succesul reproductiv al populației de tritoni prin creșterea densității.



## 7. VARIAȚIA TRĂSĂTURILOR DE VIAȚĂ A AMFIBIENILOR

Capitolul 7.3. a fost publicat cu titlul: **"Age, size and body condition do not equally reflect population response to habitat change in the common spadefoot toad *Pelobates fuscus*"** în PeerJ (2021) (a se vedea citarea completă în secțiunea de referință). Contribuția mea la această lucrare a inclus efectuarea experimentelor, analiza datelor, redactarea și revizuirea manuscriselor și aprobarea manuscrisului final. Articolul poate fi găsit aici: <https://peerj.com/articles/11678/>

Capitolul 7.4. face obiectul unei colaborări internaționale cu cercetătorii de la Universitatea din Belgrad, Institutul de Cercetare Biologică "Siniša Stanković" - Institutul Național al Republicii Serbia, Departamentul de Biologie Evolutivă, Belgrad, Serbia și Universitatea din Niș, Facultatea de Științe și Matematică, Departamentul de Biologie și Ecologie, Serbia. Acest capitol a fost redactat și, în prezent, autorii efectuează revizuirea finală înainte de a fi trimis spre publicare. Contribuția mea la acest manuscris a inclus munca de teren în 2019, lucrul în laborator, edactarea și revizuirea manuscriselor și aprobarea manuscrisului final.

Capitolul 7.5. constă într-o analiză a literaturii de specialitate, inclusiv a datelor din cele două manuscrise menționate mai sus.

Acest capitol constă în trei direcții de lucru. Astfel, obiectivele capitolelor au fost evaluate după cum urmează: Evaluarea schimbărilor în parametrii de vârstă și de creștere induse de modificarea habitatului la *Pelobates fuscus* (capitolul 7.3). Evaluarea modificărilor în parametrii de vârstă și a dimensiunii corporale în timp la două populații de *Bufo bufo* (capitolul 7.4). Revizuirea literaturii privind modificările parametrilor de vârstă și de creștere la *Bufo bufo*, *Rana temporaria* și *Pelobates fuscus* (capitolul 7.5). În ultimul capitol am testat două ipoteze: (1) dacă longevitatea crește odată cu altitudinea și (2) dacă dimensiunea corporală (SVL și BM) crește odată cu altitudinea.

## 7.1. Speciile studiate

### 7.1.1. *Pelobates fuscus*

Broasca de pământ brună (*Pelobates fuscus*) se găsește mai ales în zonele joase din Europa continentală. Este răspândită din partea de vest a Belgiei și a Țărilor de Jos până în partea de est a Rusiei și este absentă în Peninsula Iberică și în cea mai mare parte a Scandinaviei. În România, specia atinge partea sudică a arealului său (Székely și colab., 2013) și este răspândită de la 0 până la 800 m altitudine.

### 7.1.2. *Bufo bufo*

Broasca râioasa brună (*Bufo bufo*) este o specie foarte răspândită în Europa, fiind răspândită pe întreg continentul, cu excepția Islandei, Irlandei și a nordului extrem al Scandinaviei și a Peninsulei Iberice (AmphibiaWeb, 2023). În România, specia utilizează diferite tipuri de habitate (inclusiv păduri, pajiști și zone umede) în întreaga țară și este răspândită de la 0 m altitudine până la 2000 m altitudine (Cogălniceanu și colab., 2013).

### 7.1.3. *Rana temporaria*

Broasca roșie de munte (*Rana temporaria*) este răspândită în toată Europa și într-o mică parte din vestul Asiei. În Europa, este observată în toate țările, cu excepția Portugaliei și a Islandei. Această specie utilizează multe tipuri de habitate forestiere și acvatice din Europa, fiind înregistrată de la nivelul mării până la 2700 m în Pirinei (IUCN, 2023). În România, specia este prezentă în Munții Carpați, în Transilvania și în partea de nord-vest a Moldovei, de la 100m până în regiunile alpine de peste 2000m altitudine (Cogălniceanu și colab., 2013).

## 7.2. Scheletocronologia

Am adaptat protocolul clasic de scheletocronologie propus de Castanet și Smirina (1990). Falangele folosite pentru analiza de laborator au fost introduse în diferite etape pentru a transforma materialul biologic brut în model adecvat pentru secționarea în timpul scheletocronologiei.

### **7.3. RĂSPUNSUL SPECIEI *PELOBATES FUSCUS* LA MODIFICAREA HABITATULUI**

#### **7.3.1 Materiale și metode**

##### **Zona de studiu**

Zona de studiu este situată în nord-vestul României, într-o regiune deluroasă din județul Cluj, România (46.6829° N; 23.5441° E; 720 m deasupra nivelului mării). Zona de studiu a fost compusă dintr-o baltă permanentă care a fost inițial mărginită de pășuni de stepă și păduri. Aceasta este situată în apropierea unui drum județean cu trafic mediu.

##### **Colectarea datelor**

Eșantionarea indivizilor adulți a fost efectuată în fiecare an în luna aprilie, în timpul sezonului de reproducere, în două momente: între 2000 și 2004 (eșantionul A, momentul A) și între 2012 și 2014 (eșantionul B, momentul B). Toate animalele au fost capturate în timpul nopții. Sexul a fost determinat pe baza prezenței glandelor umerale prezente doar la masculii maturi din punct de vedere sexual, iar lungimea de la vârful botului până la cloacă (SVL) și masa corporală (BM) au fost măsurate pentru fiecare individ.

##### **Parametrii de vârstă și dimensiunile corporale**

Au fost calculați următorii parametri legați de vârstă: 1. durata medie de viață 2. longevitatea (adică vârsta maximă observată), 3. vârsta la maturitatea sexuală, 4. durata potențială de viață reproductivă. Datele privind SVL și BM au fost logaritmizate, iar indicele condiției corporale (BCI) a fost calculat pe baza regresiei liniare între SVL și BM (Denoël și colab., 2002; Băncilă și colab. 2010). Valorile pozitive ale BCI au indicat o condiție bună, în timp ce valorile negative au indicat o condiție slabă a indivizilor eșantionați (Jakob și colab. 1996, Schulte-Hostedde și colab., 2005; Blackwell, 2002).

#### **7.3.2. Rezultate**

Nu au existat diferențe semnificative în distribuția vârstei între cele două momente de eșantionare, A și B. Mediana duratei de viață a fost mai mică în eșantionul B, în timp ce ceilalți parametri legați de vârstă au fost similari în ambele eșantioane (fig. 4).



În eşantionul B, ambele sexe au avut o durată de viață medie de 3 ani și s-au maturizat sexual la vârsta de 2 sau 3 ani. Longevitatea și durata potențială de reproducere au fost, de asemenea, similare, de 6 și, respectiv, 4 ani. Rezultatele nu au arătat diferențe semnificative în distribuția vârstei între masculi și femele (fig. 4).

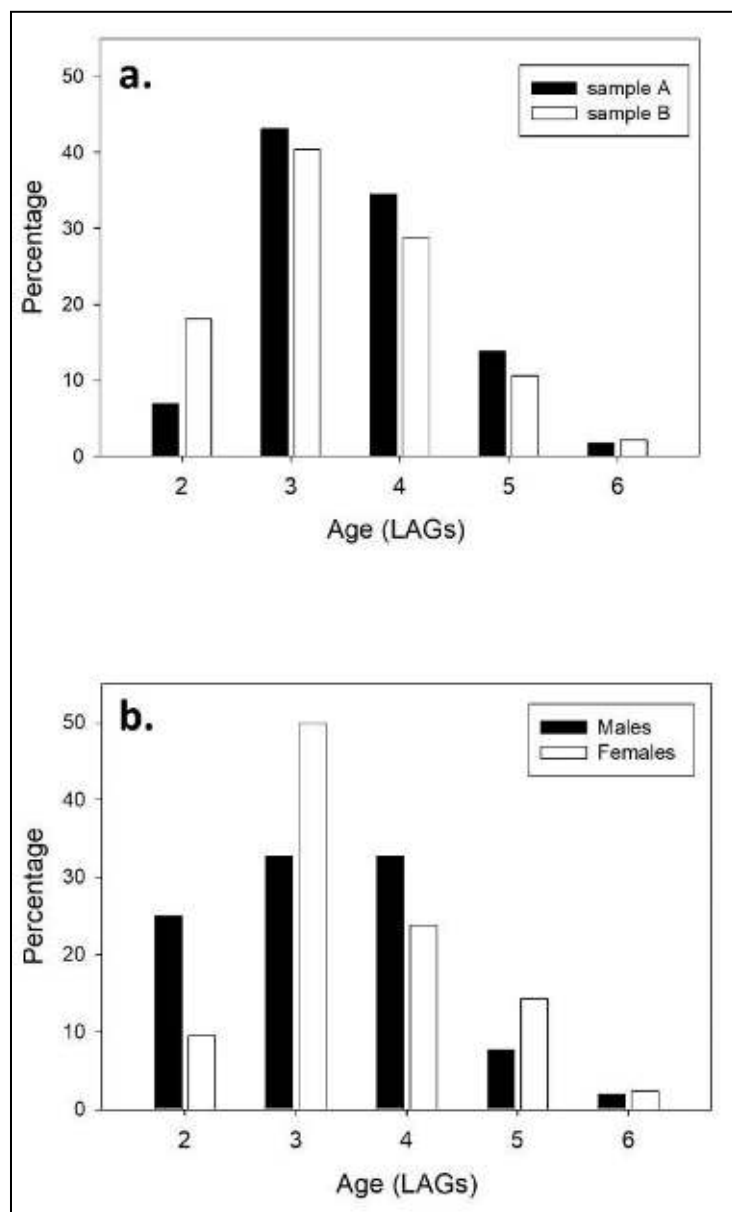


Figura 4. (a) Distribuția pe clase de vârstă a populațiilor de *P. fuscus*, în două momente - 2000 - 2004 (eșantionul A, negru) și 2012 - 2014 (eșantionul B, alb); (b) Distribuția pe clase de vârstă a masculilor (negru) și a femelelor (alb) din populația de *P. fuscus* din cadrul eșantionului B (2012 - 2014).

S-a constatat o scădere semnificativă a SVL și BM la ambele sexe între momentele (fig. 5). Starea corporală a scăzut semnificativ între cele două momente atât la masculi, cât și la femele (fig. 5).

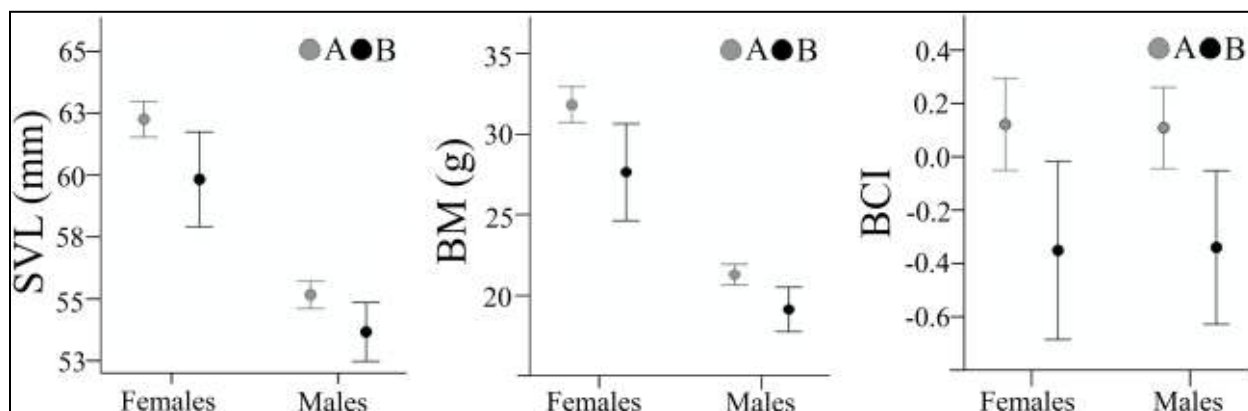


Figura 5. SVL, BM și BCI al masculilor și femelelor de *P. fuscus*, la cele două momente de eșantionare.

### 7.3.3. Discuții

Populația studiată de *P. fuscus* a răspuns la degradarea habitatului printr-o scădere a mărimii și a masei corporale, ceea ce indică faptul că schimbările în ceea ce privește mărimea și starea corpului, reflectă mai bine decât structura pe vârste răspunsul rapid al populației la scăderea calității habitatului și poate fi utilizat ca instrument de avertizare timpurie pentru declinul populației de amfibieni.

## 7.4. MODIFICĂRILE ÎN TIMP ALE PARAMETRILOR DE VÂRSTĂ ȘI A DIMENSIUNII CORPORALE LA DOUĂ POPULAȚII DE *BUFO BUFO*

### 7.4.1. Materiale și metode

#### Zona de studiu

Am studiat două populații, una din România și una din Serbia. Prima populație este situată în jurul unui iaz permanent din Parcul Național Munții Măcin din nordul regiunii Dobrogea, România (N: 45,232118°; E: 28,307371°; 69 m altitudine). A doua populație de *B. bufo* este situată

în Serbia Centrală, în apropierea orașelor Zuce și Belgrad (N: 44,682167°; E: 20,552000°, 240 m altitudine).

#### **7.4.2. Rezultate**

##### **Parametrii de vârstă**

Populația de *B. bufo* din România nu a prezentat nicio diferență în ceea ce privește vârsta medie pe parcursul perioadei de studiu de 10 ani. Vârsta medie a masculilor a variat între 4,07 ani în 2012 și 4,77 ani în 2016. Vârsta medie a femelelor a variat între 4,11 ani în 2012 și 4,67 ani în 2009. În schimb, populația de *B. bufo* din Serbia a prezentat diferențe semnificative în ceea ce privește vârsta medie în timp. Vârsta medie a masculilor a variat între 4,54 ani în 2021 și 5,7 ani în 2015, în timp ce cea mai mică vârstă medie a femelelor a fost de 3,92 ani în 2018, iar cea mai mare vârstă medie a fost de 5,43 ani în 2015.

##### **Dimensiunile corporale**

Atât SVL, cât și BM au variat semnificativ în ambele populații studiate, pentru ambele sexe (fig. 6; fig. 7).

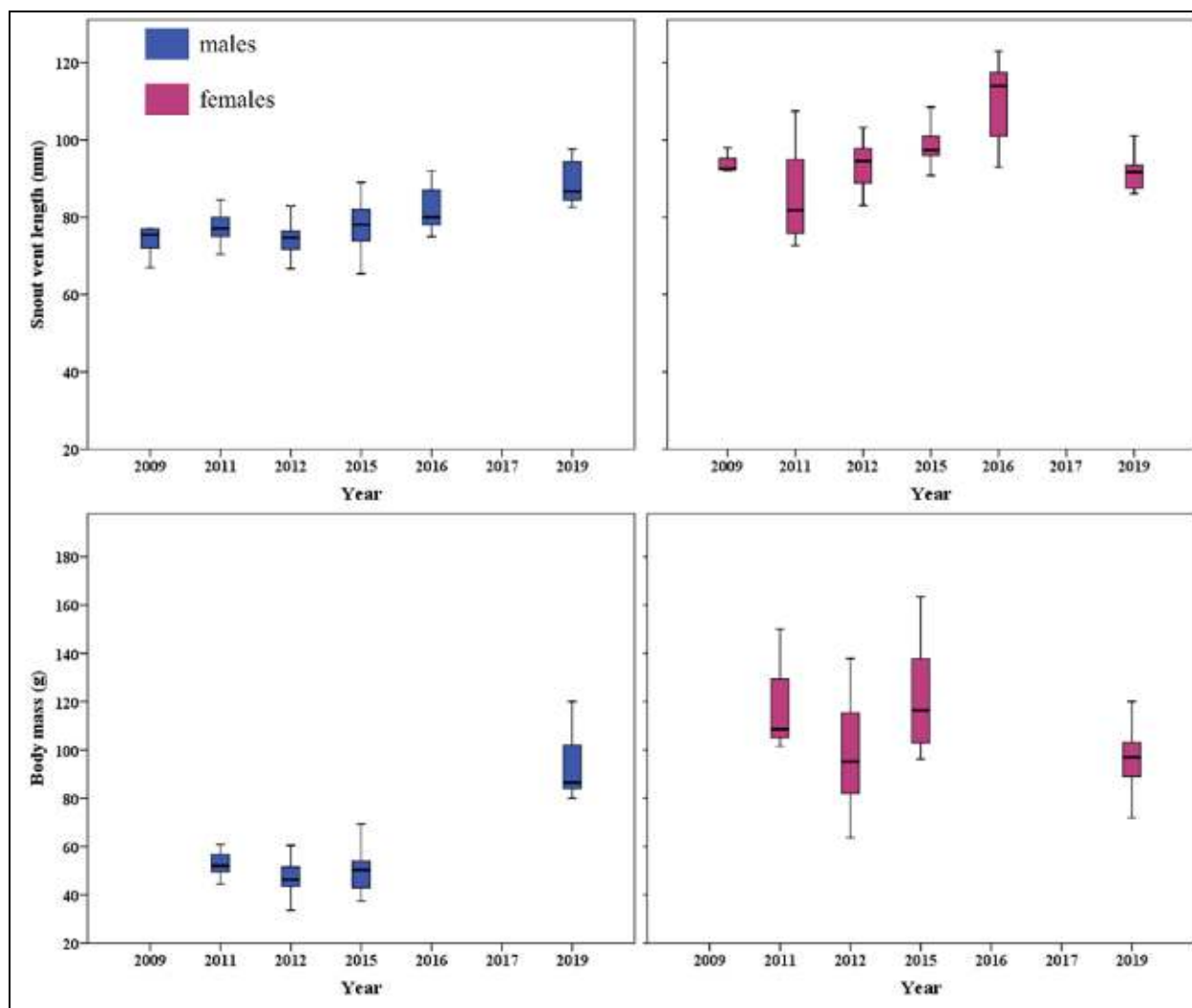


Figura 6. SVL și BM la masculii și femele de-a lungul timpului în populația din România

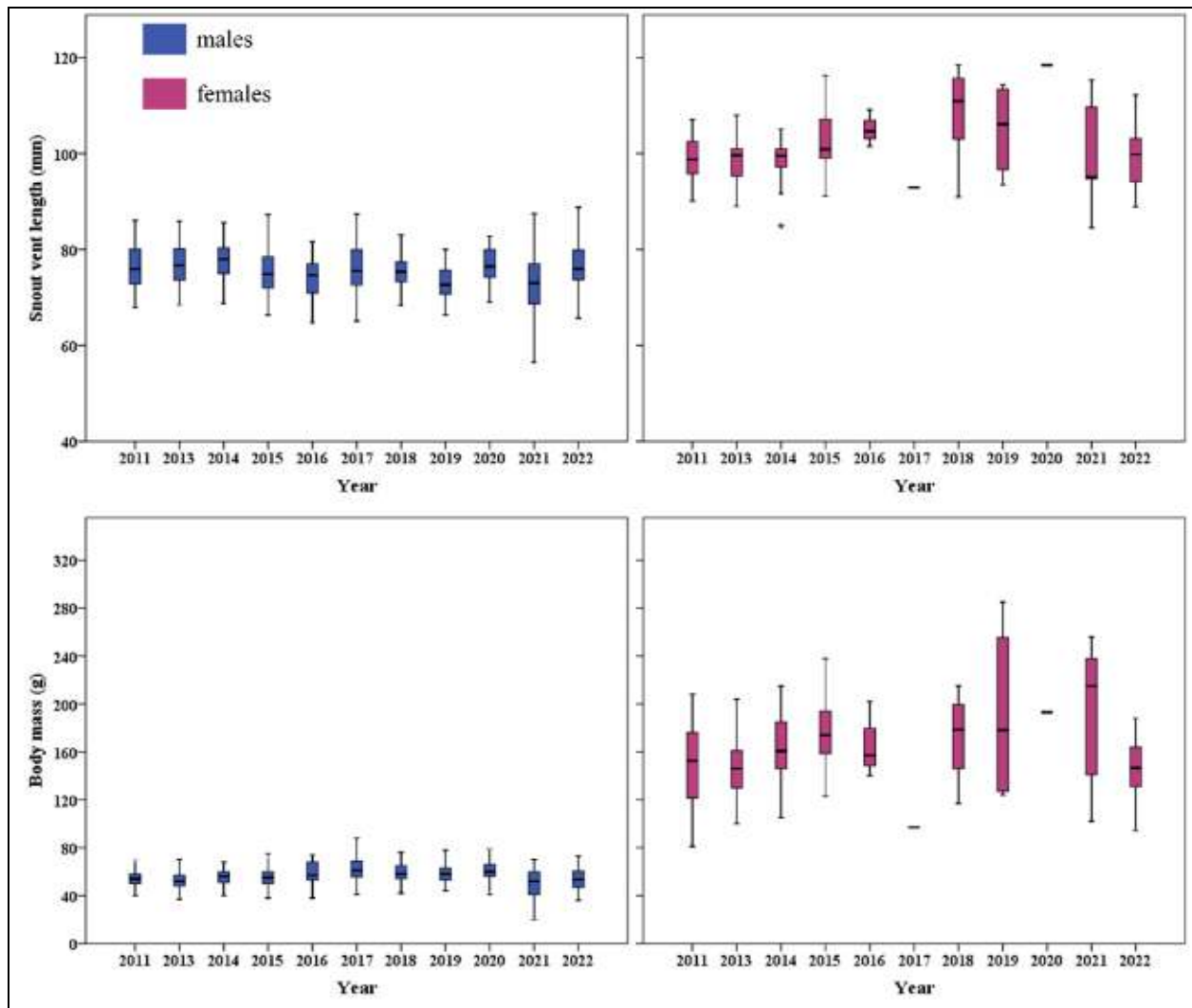


Figura 7. SVL și BM la masculi și femele de-a lungul timpului în populația din Serbia

### Indicele stării corporale (BCI)

Am găsit diferențe semnificative în BCI în toți anii de studiu între masculii și femelele din populația de *B. bufo* din România. BCI a fost mai mare pentru femele având valori pozitive (0,348), comparativ cu valorile negative observate pentru masculi (-0,132). Diferențe semnificative au fost observate, de asemenea, la populația de *B. bufo* din Serbia. BCI a fost mai mare pentru femele și a prezentat valori pozitive (0,49), în comparație cu valorile negative calculate pentru masculi (-0,14).

### 7.4.3. Discuții

În timp ce populația din România a prezentat o vârstă medie constantă, populația din Serbia a înregistrat o variație semnificativă în timp. Vârsta, rata de creștere și dimensiunea corporală a indivizilor sunt influențate de o varietate de factori de mediu (Tomašević și colab., 2008). Variația anuală a temperaturii și a precipitațiilor au un impact asupra succesului reproductiv și asupra disponibilității și calității resurselor trofice. Acest lucru necesită compromisuri în alocarea resurselor energetice între supraviețuire, creștere și reproducere (Cogălniceanu și Miaud, 2003; Amat și Meiri, 2018). Pe parcursul perioadei de studiu, BCI la femele din ambele populații a fost pozitiv în aproape toți anii de studiu. Contrar, BCI la masculi a fost în cea mai mare parte negativ în ambele populații de *B. bufo* studiate. Valorile BCI ale indivizilor pot fi diminuate din cauza disponibilității limitate de hrană sau a secetei și a temperaturilor nefavorabile în timpul hibernării sau migrației (Reading și Clarke, 1995). Un BCI mai mic conduce la o investiție redusă în reproducere, rezultând o pontă mai mică și o scădere a dimensiunii populației (Cogălniceanu și colab., 2021).

## 7.5. ANALIZA LITERATURII PRIVIND VARIAȚIA VÂRSTEI ȘI A DIMENSIUNII CORPORALE LA TREI SPECII DE AMFIBIENI DE-A LUNGUL GRADIENTULUI ALTITUDINAL

### 7.5.1. Materiale și metode

#### Analiza literaturii

Datele privind parametrii legați de vârstă și de mărime la *Bufo bufo*, *Rana temporaria* și *Pelobates fuscus* au fost extrase din literatura de specialitate disponibilă în baza de date online (Web of Science, Google Scholar). Am efectuat o căutare avansată cu următoarele cuvinte cheie: "skeletochronology", "age structure", "amphibian", "amphibian population structure", "body size" și combinația acestora. Toate informațiile disponibile cu privire la parametrii legați de vârstă și mărimea corpului au fost extrase și unificate într-o bază de date.

### 7.5.2. Rezultate

#### Analiza literaturii

Am găsit 43 de referințe diferite care se axau pe parametrii legați de vârstă și dimensiunea corpului: 22 pentru *B. bufo*, 16 pentru *R. temporaria* și 5 pentru *P. fuscus*. La *B. bufo* au fost studiate 33 de populații diferite din 11 țări din Europa. Cea mai veche populație studiată a fost din 1975, iar cea mai nouă populație studiată a fost în 2017. La *R. temporaria*, am identificat 37 de populații diferite din 11 țări din Europa. Cea mai veche populație studiată a fost din 1958, iar cea mai nouă populație studiată a fost în 2013. La *P. fuscus*, am identificat 6 populații diferite din 3 țări (România, Italia și Franța).

Prima ipoteză testată a arătat că altitudinea are un efect semnificativ asupra longevității. Indivizii de *B. bufo* din populațiile situate la altitudini mai mari au o longevitate mai mare pentru ambele sexe în comparație cu indivizii de la altitudini mai mici (fig. 8), în timp ce la *R. temporaria* și *P. fuscus* altitudinea nu are niciun efect asupra longevității.

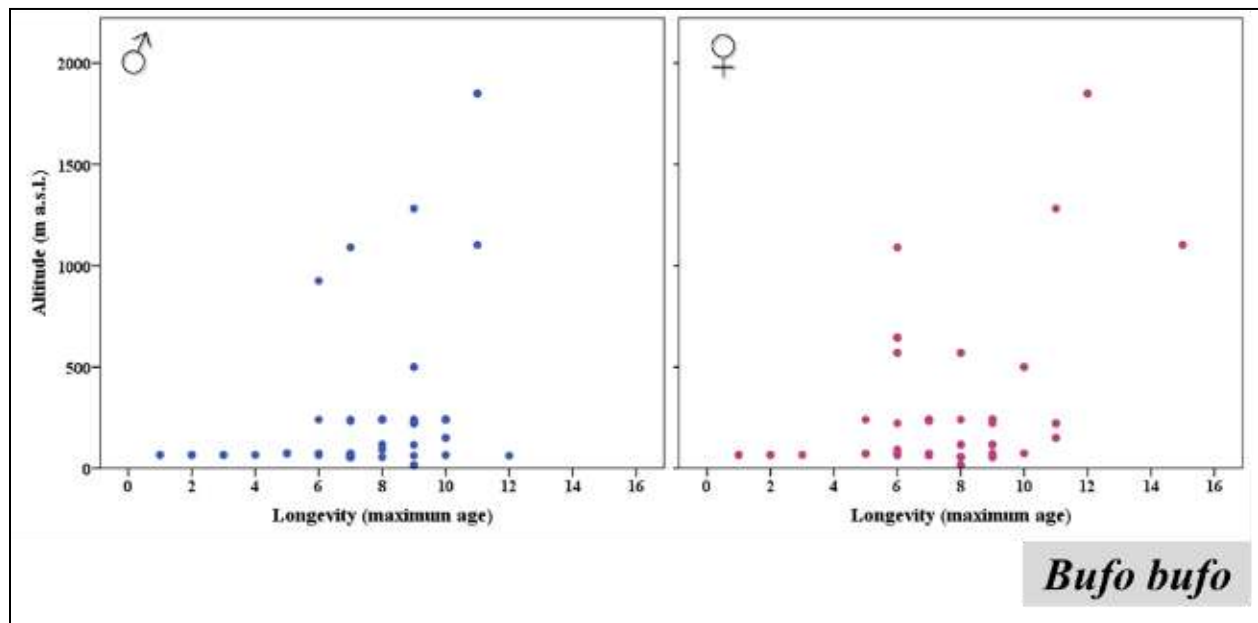


Figura 8. Regresia liniară între altitudine și longevitate la *B. bufo*

A doua ipoteză testată a arătat că altitudinea are un efect semnificativ asupra dimensiunii corporale a indivizilor și a masei corporale la *B. bufo* și *R. temporaria* (fig. 9). Astfel, indivizii de la altitudini mai mari au o dimensiune corporală și o masă corporală mai mari. Dimpotrivă, altitudinea nu are un efect semnificativ nici asupra dimensiunii corporale, nici asupra masei corporale la indivizii de *P. fuscus*.

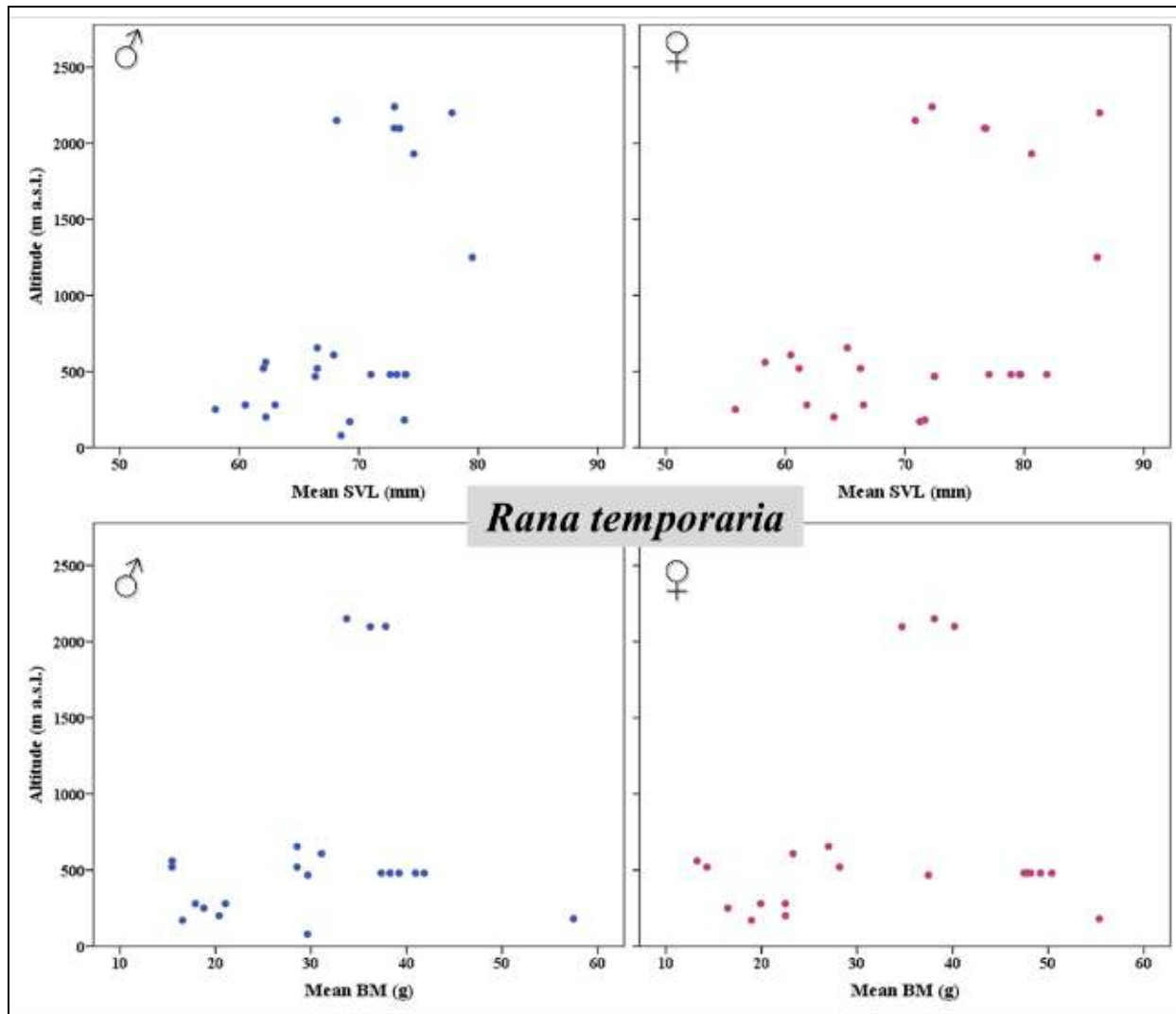


Figura 9. Regresia liniară între altitudine, SVL și BM la *R. temporaria*

### 7.5.3. Discuții

Analiza efectuată în acest capitol a arătat că diferite specii de amfibieni au strategii diferite pentru a face față variațiilor de mediu, în principal legate de altitudine. Multe specii de amfibieni



au tendința de a fi mai mari la altitudini mari în comparație cu speciile de la altitudini joase și medii, ca răspuns la clima rece (Ryser, 1996; Miaud și colab., 1999), dar nu toate speciile respectă această regulă. Există excepții în care speciile de altitudine joasă și medie sunt mai mari decât cele de altitudine mare (Howard și Wallace, 1985), sau specii în care clima nu are nicio influență asupra dimensiunii corporale (Ryser, 1996; Morrison și Hero, 2002).

## REFERINȚE SELECTIVE

- AmphibiaWeb. (2017). <<http://amphibiaweb.org>> University of California, Berkeley, CA, USA. Accessed 18 April 2023.
- Arntzen, J. W., Recuero, E., Canestrelli, D., & Martínez-Solano, I. (2013). How complex is the *Bufo bufo* species group?. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 69(3), 1203-1208.
- Baillie, J., Collen, B., Griffiths, J., Loh, J., & Turvey, S. (2010). Evolution lost: status and trends of the world's vertebrates.
- Beebee, T. J., & Griffiths, R. A. (2005). The amphibian decline crisis: a watershed for conservation biology?. *Biological conservation*, 125(3), 271-285.
- Berger, L., Speare, R., Daszak, P., Green, D. E., Cunningham, A. A., Goggin, C. L., Slocombe, R., Ragan, M. A., Hyatt, A. D., McDonald, K. R., Hines, H. B., Lips, K. R., Marantelli, G., Parkes, H., (1998). Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95: 9031-9036.
- Bernabò, I., & Brunelli, E. (2019). Comparative morphological analysis during larval development of three syntopic newt species (Urodela: Salamandridae). *The European Zoological Journal*, 86(1), 38-53.
- Blackwell, G. L. (2002). A potential multivariate index of condition for small mammals. *New Zealand Journal of Zoology*, 29(3), 195-203.
- Blaustein, A. R. (1990). Declining amphibian populations: a global phenomenon?. *Trends in ecology and evolution*, 5, 203-204.

- Blaustein, A.R., Wake, D.B., Sousa, W.P., (1994). Amphibian declines: judging stability, persistence, and susceptibility of populations to local and global extinctions. *Conservation Biology*, 8(1), 60-71.
- Blaustein, A. R., Romansic, J. M., Kiesecker, J. M., & Hatch, A. C. (2003). Ultraviolet radiation, toxic chemicals and amphibian population declines. *Diversity and distributions*, 9(2), 123-140.
- Carey, C., Corn, P. S., Jones, M. S., Livo, L. J., Muths, E., & Loeffler, C. W. (2005). Factors limiting the recovery of boreal toads (*Bufo b. boreas*). *Amphibian declines: the conservation status of United States species*, 222-236.
- Castanet, J., Smirina, E., (1990). Introduction to the skeletochronological method in amphibians and reptiles. *Annales des sciences naturelles. Zoologie et biologie animale*. Elsevier, pp. 191-196.
- Caughley, G. (1994). Directions in conservation biology. *Journal of animal ecology*, 215-244.
- Chapman, A. D. (2005). Principles of data quality. GBIF.
- Cogălniceanu, D., Aioanei, F., & Bogdan, M. (2000). Amfibienii din România. Determinator. Ed. Ars Docendi, Bucharest. [in Romanian].
- Cogălniceanu, D., & Miaud, C. (2003). Population age structure and growth in four syntopic amphibian species inhabiting a large river floodplain. *Canadian Journal of Zoology*, 81(6), 1096-1106.
- Cogălniceanu, D., Székely, P., Székely, D., Roşioru, D., Băncilă, R.I., Miaud, C., (2013a). When males are larger than females in ectotherms: reproductive investment in the Eastern spadefoot toad *Pelobates syriacus*. *Copeia*. 4:699-706.
- Cogălniceanu, D., Székely, P., Samoilă, C., Ruben, I., Tudor, M., Plăiaşu, R., Stănescu, F. & Rozyłowicz, L. (2013b). Diversity and distribution of amphibians in Romania. *ZooKeys*, (296), 35.

- Cogălniceanu, D., Băncilă, R. I., Plăiașu, R., Roșioru, D., & Merilä, J. (2017). Small-scale spatial and temporal variation of life-history traits of common frogs (*Rana temporaria*) in sub-Arctic Finland. *Polar Biology*, 40, 1581-1592.
- Cogălniceanu, D., Stănescu, F., Székely, D., Topliceanu, T. S., Iosif, R., & Székely, P. (2021). Age, size and body condition do not equally reflect population response to habitat change in the common spadefoot toad *Pelobates fuscus*. *PeerJ*, 9, e11678.
- Daszak, P., Cunningham, A. A., Hyatt, A. D., (2000). Emerging infectious diseases of wildlife: threats to biodiversity and human health. *Science* 287: 443-449.
- Davidson, C., & Knapp, R. A. (2007). Multiple Stressors and Amphibian Declines: Dual Impacts of Pesticides and Fish on Yellow-Legged Frogs. *Ecological Applications*, 17(2), 587–597. <http://www.jstor.org/stable/40061880>
- Denoël, M., Bichot, M., Ficetola, G. F., Delcourt, J., Yliff, M., Kestemont, P., & Poncin, P. (2010). Cumulative effects of road de-icing salt on amphibian behavior. *Aquatic Toxicology*, 99(2), 275-280.
- Duellman, W. E., & Trueb, L. (1994). *Biology of amphibians*. JHU press.
- Fahrbach, M., & Gerlach, U. (2018). *The genus Triturus*. Frankfurt am Main: Chimaira.
- Ficetola, G. F., Thuiller, W., & Miaud, C. (2007). Prediction and validation of the potential global distribution of a problematic alien invasive species—the American bullfrog. *Diversity and distributions*, 13(4), 476-485.
- Furtula, M., Todorović, B., Simić, V., & Ivanović, A. (2009). Interspecific differences in early life-history traits in crested newts (*Triturus cristatus* superspecies, Caudata, Salamandridae) from the Balkan Peninsula. *Journal of Natural History*, 43, 469-477.
- Hjernquist, M.B., Söderman, F., Jönsson, K.I., Herczeg, G., Laurila, A., Merilä, J., (2012). Seasonality determines patterns of growth and age structure over a geographic gradient in an ectothermic vertebrate. *Oecologia*. 170:641-649.

- IUCN. (2022). The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2022-2. <https://www.iucnredlist.org>. Accessed on 21 May 2023.
- Jakob, E. M., Marshall, S. D., & Uetz, G. W. (1996). Estimating fitness: a comparison of body condition indices. *Oikos*, 61-67.
- Janin, A, Lena, J.P., Joly, P., (2011). Beyond occurrence: body condition and stress hormone as integrative indicators of habitat availability and fragmentation in the common toad. *Biological Conservation*. 144:1008-1016.
- Jensen, J. B., Camp, C. D., (2003). Human exploitation of amphibians: direct and indirect impacts. *Amphibian Conservation*, 199-213.
- Kiesecker, J. M., Blaustein, A. R., & Belden, L. K. (2001). Complex causes of amphibian population declines. *Nature*, 410(6829), 681-684.
- Knoepffler, L. P. (1978). *Triops cancriformis* (Bosc), Crustacé phyllopoide prédateur de Têtards et de jeunes Amphibiens. *Vie et Milieu*, 117-121.
- Kohli, A. K., Lindauer, A. L., Brannelly, L. A., Ohmer, M. E., Richards-Zawacki, C., Rollins-Smith, L., & Voyles, J. (2019). Disease and the drying pond: examining possible links among drought, immune function, and disease development in amphibians. *Physiological and Biochemical Zoology*, 92(3), 339-348.
- Laurance, W. F., McDonald, K. R., Speare, R., (1996). Epidemic disease and the catastrophic decline of Australian rain forest frogs. *Conservation Biology*. 10(2): 406-413.
- Lewis, S. L., & Maslin, M. A. (2015). Defining the anthropocene. *Nature*, 519(7542), 171-180.
- Lovich, J. E., & Gibbons, J. W. (1992). A review of techniques for quantifying sexual size dimorphism. *Growth Development and Aging*, 56, 269-269.
- Merilä, J., & Sterner, M. (2002). Medicinal leeches (*Hirudo medicinalis*) attacking and killing adult amphibians. In *Annales Zoologici Fennici* (Vol. 39, No. 4, pp. 343-346). Finnish Zoological and Botanical Publishing Board.

- Natchev, N., Yordanova, K., Topliceanu, S., Koynova, T., Doichev, D., & Cogălniceanu, D. (2021). Ontogenetic Changes of the Aquatic Food Uptake Mode in the Danube Crested Newt (*Triturus dobrogicus* Kiritzescu 1903). *Frontiers in Ecology and Evolution*, 9, 641657.
- Nyström, P., Axelsson, E., Sidenmark, J., & Brönmark, C. (1997). Crayfish predation on amphibian eggs and larvae. *Amphibia-Reptilia*, 18(3), 217-228.
- OECD, 2009. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. Test No. 231: Amphibian Metamorphosis Assay. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. OECD, Paris, France <https://doi.org/10.1787/20745761>.
- Pfennig, D. W., Sherman, P. W., & Collins, J. P. (1994). Kin recognition and cannibalism in polyphenic salamanders. *Behavioral Ecology*, 5(2), 225-232.
- Rafferty, K. A. (1969). Mass Culture of Amphibian Cells: Methods and Observations Concerning Stability of Cell Type. 30. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-85791-1\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-642-85791-1_5)
- Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J., & Minor, L. (2016). Cell viability assays. *Assay Guidance Manual* [Internet].
- Rowe, C. L., & Dunson, W. A. (1995). Impacts of hydroperiod on growth and survival of larval amphibians in temporary ponds of central Pennsylvania, USA. *Oecologia*, 102, 397-403.
- Sibly, R. M., & Hone, J. (2002). Population growth rate and its determinants: an overview. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 357(1425), 1153-1170.
- Silla, A. J., Calatayud, N. E., & Trudeau, V. L. (2021). Amphibian reproductive technologies: approaches and welfare considerations. *Conservation Physiology*, 9(1), coab011.
- Sinsch, U. (2015). Skeletochronological assessment of demographic life-history traits in amphibians. *The Herpetological Journal*, 25(1), 5-13.

- Sinsch, U., Pelster, B., & Ludwig, G. (2015). Large-scale variation of size-and age-related life-history traits in the common frog: a sensitive test case for macroecological rules. *Journal of Zoology*, 297(1), 32-43.
- Smirina, E. M. (1994). Age determination and longevity in amphibians. *Gerontology*. 40:133-146.
- Stewart, M. M. (1995). Climate driven population fluctuations in rain forest frogs. *Journal of Herpetology*, 437-446.
- Székely, D., Denoël, M., Székely, P., & Cogălniceanu, D. (2017). Pond drying cues and their effects on growth and metamorphosis in a fast developing amphibian. *Journal of Zoology*, 303(2), 129-135.
- Tarsi, K., & Tuff, T. (2012). Introduction to population demographics. *Nature Education Knowledge* 3: 3.
- Tuttle, M. D., & Ryan, M. J. (1981). Bat predation and the evolution of frog vocalizations in the Neotropics. *Science*, 214(4521), 677-678.
- Vaissi, S., & Sharifi, M. (2016). Variation in food availability mediate the impact of density on cannibalism, growth, and survival in larval yellow spotted mountain newts (*Neurergus microspilotus*): Implications for captive breeding programs. *Zoo Biology*, 35(6), 513-521.
- Vaissi, S., Farasat, H., Mortezaazadeh, A., & Sharifi, M. (2019). Incorporating habitat suitability and demographic data for developing a reintroduction plan for the critically endangered yellow spotted mountain newt, *Neurergus derjugini*. *Herpetological Journal*, 29(4).
- Vignoli, L., Velletrani, F., Venditti, C., Luiselli, L., Yadid, Y., & Macale, D. (2018). Short, medium and long-term effects of density on the demographic traits of a threatened newt. *Ecological research*, 33, 1039-1048.
- Vitt, L. J., Caldwell, J. P., Wilbur, H. M., & Smith, D. C. (1990). Amphibians as harbingers of decay. *BioScience*, 40(6), 418-418.
- Vitt, L. J., & Caldwell, J. P. (2013). *Herpetology: an introductory biology of amphibians and reptiles*. Academic press.

- Wells, K. D. (2019). The ecology and behavior of amphibians. University of Chicago press.
- Wilbur, H. M. (1980). Complex life cycles. Annual review of Ecology and Systematics, 11(1), 67-93.
- World Economic Forum (2023). The Global Risks Report. 18<sup>th</sup> edition.
- Zimmerman, J. B., Anastas, P. T., Erythropel, H. C., & Leitner, W. (2020). Designing for a green chemistry future. Science, 367(6476), 397-400.

## PUBLICAȚII ȘI COMUNICĂRI ȘTIINȚIFICE

### Publicație științifică cu factor de impact (ISI).

1. Cogălniceanu, D., Stănescu, F., Székely, D., **Topliceanu, T. S.**, Iosif, R., & Székely, P. (2021). Age, size and body condition do not equally reflect population response to habitat change in the common spadefoot toad *Pelobates fuscus*. PeerJ, 9, e11678.
2. Natchev, N., Yordanova, K., **Topliceanu, T. S.**, Koynova, T., Doichev, D., & Cogălniceanu, D. (2021). Ontogenetic Changes of the Aquatic Food Uptake Mode in the Danube Crested Newt (*Triturus dobrogicus* Kiritzescu 1903). Frontiers in Ecology and Evolution, 9, 641657.

### Publicație științifică fără factor de impact (BDI).

1. **Topliceanu, T. S.**, Natchev, N., Koynova, T., & Cogălniceanu, D. (2023). Short-term effects of larval density on the body size and behaviour in *Triturus dobrogicus* (Kiritzescu 1903). Annals of the Academy of Romanian Scientists, series of Biological Sciences. 12(1), 21-28. <https://doi.org/10.56082/annalsarscibio.2023.1.21>

### Manuscrise trimise și în pregătire

**Topliceanu, T. S.**, Almeida, M., Oliveira, M., Cogălniceanu, D., & Lopes, I., (submis).  
The number of ethylene oxide groups of sulphate-based surfactants influence the

cytotoxicity of mixed micelles to an amphibian cell line. Archives of Environmental Contamination and Toxicology.

Jovanović B., **Topliceanu, T. S.**, Stănescu, F., Telea, A., Vlad, S., Cogălniceanu, D., Crnobrnja–Isailović, J. (în pregătire). Life history changes in a Common Toad population: implications of deforestation event

Stănescu, F., Băncila, R. I., Plăiașu, R., **Topliceanu, T. S.**, Vlad, S., Cogălniceanu, D. (în pregătire). Variation in age and body size in *Rana temporaria* across altitudinal and latitudinal gradient

### Comunicări științifice

1. **Topliceanu, T. S.**, Jovanović, B., Stănescu, F., Ćorović, J., Aleksić, I., Vlad, S., ... & Crnobrnja-Isailović, J. (2022). Life history changes observed over 17 years in a Common Toad population from Serbia. In Program and Book of Abstracts: the 21st European Congress of Herpetology; 2022 Sep 5-9; Belgrade, Serbia (p. 264). Belgrade: Institute for Biological Research" Siniša Stanković"—National Institute of Republic of Serbia, University of Belgrade.
2. Vizireanu, M., Telea, A., **Topliceanu, T. S.**, Cogălniceanu, D., (2021). Behavioral changes induced by predators in spadefoot toad juveniles (genus *Pelobates*). DELTAS AND WETLANDS, the 28th Scientific Symposium.
3. Stănescu, F., Vlad, S. E., Telea, A., Szekely, D., Marangoni, F., **Topliceanu, T. S.**, Cogălniceanu, D. (2021) Skeletochronology, an underrated tool for amphibian conservation in the Neotropics. SCDS-UDJG 2021, 9 th Edition, Galați, 10th-11th Of June 2021
4. **Topliceanu, T. S.**, Băncilă, R.I., Buhaciuc, E., Plăiașu, R., Roșioru, D., Stănescu, F., Balázs, V., Kovács, T., Cogălniceanu, D. (2015). Influența factorilor de mediu asupra parametrilor structurali populaționali la *Rana temporaria* (Amphibia, Anura). BIOTA Symposium. Biodiversitate: Tradiții și Actualitate, Cluj-Napoca, România.



5. **Topliceanu, T. S.**, Stănescu, F., Székely D., Székely P., Cogălniceanu, D. (2014). Age-related parameters in a *Pelobates fuscus* (Laurenti, 1768) (Anura: Pelobatidae) population from NW Romania over a decade. Abstracts, 6th Annual Zoological Congress of “Grigore Antipa” Museum (CZGA), Bucharest, Romania.