

UNIVERSITATEA „OVIDIUS“ DIN CONSTANȚA

ȘCOALA DOCTORALĂ DE ȘTIINȚE APLICATE

DOMENIU FUNDAMENTAL: BIOLOGIE

REZUMAT AL TEZEI DE DOCTORAT

**CERCETĂRI PRIVIND INFLUENȚA FACTORILOR DE
MEDIU ASUPRA BIVALVEI *Mytilus galloprovincialis***

CONDUCĂTOR DE DOCTORAT:

Prof. Univ. Emerit Dr. CS I NATALIA ROȘOIU

Membru Titular Academia Oamenilor de Știință din România

DOCTORAND:

PANTEA ELENA-DANIELA

CONSTANȚA

2024

CUPRINS

SCOPUL ȘI OBIECTIVELE LUCRĂRII	Error! Bookmark not defined.
PARTEA I. STADIUL CUNOAȘTERII	Error! Bookmark not defined.
I. MOLUȘTELE BIVALVE MARINE.....	Error! Bookmark not defined.
1. 1. Anatomie și fiziologie generală.....	Error! Bookmark not defined.
1. 2. Ciclul biologic.....	Error! Bookmark not defined.
1. 3. Ecologia și distribuția bivalvei marine <i>Mytilus galloprovincialis</i>	Error! Bookmark not defined.
1. 4. Scurt istoric al cercetărilor românești privind fiziologia, biochimia și ecotoxicologia moluștelor bivalve.....	Error! Bookmark not defined.
II. FACTORII DE MEDIU ȘI ROLUL LOR ÎN FIZIOLOGIA ȘI COMPORTAMENTUL MIDILOR	Error! Bookmark not defined.
2. 1. Temperatura	Error! Bookmark not defined.
2. 2. Hipoxia și anoxia	Error! Bookmark not defined.
2. 3. Salinitatea.....	Error! Bookmark not defined.
2. 4. Disponibilitatea hranei	Error! Bookmark not defined.
III. POLUANȚII DIN MEDIUL MARIN ȘI IMPACTUL LOR ASUPRA MOLUȘTELOR BIVALVE	Error! Bookmark not defined.
3. 1. Metalele grele.....	Error! Bookmark not defined.
3. 1. 1. Sursele de poluare, speciația și biodisponibilitatea metalelor	Error! Bookmark not defined.
3. 1. 3. Mecanismele de preluare, acumulare și excreție	Error! Bookmark not defined.
3. 1. 4. Mecanismele de reglare ale concentrațiilor tisulare de metale grele	Error! Bookmark not defined.
3. 2. Hidrocarburile aromatice policiclice	Error! Bookmark not defined.
3. 2. 1. Sursele de poluare și biodisponibilitatea hidrocarburile aromatice policiclice.....	Error! Bookmark not defined.
3. 2. 2. Mecanismele de preluare, acumulare și eliminare.....	Error! Bookmark not defined.
3. 2. 3. Efectele hidrocarburilor aromatice policiclice asupra moluștelor bivalve.....	Error! Bookmark not defined.
3. 3. Compușii organoclorurați.....	Error! Bookmark not defined.
3. 3. 1. Sursele de poluare și biodisponibilitatea compușilor organoclorurați	Error! Bookmark not defined.
3. 3. 2. Mecanismele de preluare, acumulare și eliminare.....	Error! Bookmark not defined.
3. 3. 3. Efectele compușilor organoclorurați asupra moluștelor bivalve	Error! Bookmark not defined.
3. 4. Microplastice	Error! Bookmark not defined.
3. 4. 1. Originea și tipurile de plastice	Error! Bookmark not defined.
3. 4. 2. Sursele de microplastice în mediul marin.....	Error! Bookmark not defined.
3. 4. 3. Mecanismele de absorbție, translocare și eliminare a microplasticelor	Error! Bookmark not defined.
3. 4. 4. Efectele toxice ale microplasticelor asupra moluștelor bivalve....	Error! Bookmark not defined.

IV. BIOMARKERII – INDICATORI AI EFECTELOR POLUANȚILOR ASUPRA MOLUȘTELOR

BIVALVE.....Error! Bookmark not defined.

4. 1. Biomarkerii – indicatori de poluare.....**Error! Bookmark not defined.**

4. 2. Indicele de stare**Error! Bookmark not defined.**

4. 3. Stabilitatea membranei lizozomale**Error! Bookmark not defined.**

PARTEA II. CONTRIBUȚII PERSONALEError! Bookmark not defined.

INTRODUCEREError! Bookmark not defined.

V. MATERIAL ȘI METODEError! Bookmark not defined.

5. 1. Descrierea generală a zonelor de studiu**Error! Bookmark not defined.**

5. 2. Colectarea datelor de mediu, a probelor de apă, de sediment și a organismelor **Error! Bookmark not defined.**

5. 3. Determinarea oxigenului dizolvat**Error! Bookmark not defined.**

5. 4. Determinarea suspensiilor solide totale.....**Error! Bookmark not defined.**

5. 5. Analiza metalelor grele și determinarea factorilor de bioacumulare**Error! Bookmark not defined.**

5. 6. Determinarea factorilor și a indicilor de bioacumulare**Error! Bookmark not defined.**

5. 7. Analiza contaminanților organici din apă și midii**Error! Bookmark not defined.**

5. 8. Metodologia de procesare și izolare a microplasticelor din midii**Error! Bookmark not defined.**

5. 9. Analiza probelor de fitoplancton și clorofila *a***Error! Bookmark not defined.**

5. 10. Analiza compoziției biochimice a midiilor (proteine, lipide, glucide) **Error! Bookmark not defined.**

5. 11. Determinarea indicelui de stare al midiilor**Error! Bookmark not defined.**

5. 12. Evaluarea stabilității membranei lizozomale a midiilor**Error! Bookmark not defined.**

VI. INFLUENȚA FACTORILOR DE MEDIU ASUPRA INDICELUI DE STARE AL MIDIILOR.. Error! Bookmark not defined.

6. 1. Introducere**Error! Bookmark not defined.**

6. 2. Material și metode.....**Error! Bookmark not defined.**

6. 2. 1. Zona de studiu**Error! Bookmark not defined.**

6. 2. 2. Prelevarea și procesarea probelor**Error! Bookmark not defined.**

6. 2. 3. Măsurătorile biometrice și indicele de stare (IS)**Error! Bookmark not defined.**

6. 2. 4. Analiza statistică a datelor.....**Error! Bookmark not defined.**

6. 3. Rezultate.....**Error! Bookmark not defined.**

6. 3. 1. Condițiile de mediu**Error! Bookmark not defined.**

6. 3. 2. Caracteristicile biometrice ale midiilor**Error! Bookmark not defined.**

6. 3. 3. Indicele de stare.....**Error! Bookmark not defined.**

6. 3. 4. Relația dintre parametrii de mediu și indicele de stare**Error! Bookmark not defined.**

6. 3. 5. Relația dintre măsurătorile biometrice și indicele de stare**Error! Bookmark not defined.**

6. 4. Discuții**Error! Bookmark not defined.**

6. 4. 1. Calitatea apei**Error! Bookmark not defined.**

6. 4. 2. Indicele de stare în relație cu parametrii de mediu**Error! Bookmark not defined.**

6. 4. 3. Indicele de stare în relație cu parametrii biometrici	Error! Bookmark not defined.
VII. INFLUENȚA DISPONIBILITĂȚII HRANEI ASUPRA STĂRII FIZIOLOGICE ȘI BIOCHIMICE A MIDIILOR	
7. 1. Introducere	Error! Bookmark not defined.
7. 2. Material și metode.....	Error! Bookmark not defined.
7. 2. 1. Zona de studiu și colectarea probelor	Error! Bookmark not defined.
7. 2. 2. Analiza calitativă și cantitativă a fitoplanctonului.....	Error! Bookmark not defined.
7. 2. 3. Indicele de stare și analiza biochimică	Error! Bookmark not defined.
7. 2. 4. Analiza datelor	Error! Bookmark not defined.
7. 3. Rezultate.....	Error! Bookmark not defined.
7. 3. 1. Condiții de mediu	Error! Bookmark not defined.
7. 3. 2. Disponibilitatea hranei - compoziția și cantitatea fitoplanctonului	Error! Bookmark not defined.
7. 3. 3. Indicele de stare și compoziția biochimică a midiilor	Error! Bookmark not defined.
7. 3. 4. Analiza statistică.....	Error! Bookmark not defined.
7. 4. Discuții	Error! Bookmark not defined.
7. 4. 1. Dinamica comunităților fitoplanctonice	Error! Bookmark not defined.
7. 4. 2. Disponibilitatea hranei, indicele de stare și compoziția biochimică a midiilor	Error! Bookmark not defined.
VIII. BIOACUMULAREA METALELOR GRELE ȘI RĂSPUNSUL FIZIOLOGIC AL MIDIILOR: INDICELE DE STARE.....	
8. 1. Introducere	Error! Bookmark not defined.
8. 2. Material și metode.....	Error! Bookmark not defined.
8. 2. 1. Locațiile de prelevare	Error! Bookmark not defined.
8. 2. 2. Colectarea probelor	Error! Bookmark not defined.
8. 2. 3. Analiza chimică.....	Error! Bookmark not defined.
8. 2. 4. Determinarea factorilor și a indicilor de bioacumulare	Error! Bookmark not defined.
8. 2. 5. Determinarea indicelui de stare	Error! Bookmark not defined.
8. 2. 6. Analiza statistică a datelor.....	Error! Bookmark not defined.
8. 3. Rezultate.....	Error! Bookmark not defined.
8. 3. 1. Concentrația metalelor grele în apa de mare	Error! Bookmark not defined.
8. 3. 2. Concentrația metalelor grele în sedimente	Error! Bookmark not defined.
8. 3. 3. Concentrația metalelor grele în midii	Error! Bookmark not defined.
8. 3. 4. Factorii și indicii de bioacumulare	Error! Bookmark not defined.
8. 3. 5. Indicele de stare.....	Error! Bookmark not defined.
8. 4. Discuții	Error! Bookmark not defined.
8. 4. 1. Influența parametrilor fizico-chimici asupra bioacumulării metalelor grele	Error! Bookmark not defined.
8. 4. 2. Efectul bioacumulării metalelor asupra indicelui de stare	Error! Bookmark not defined.

IX. BIOACUMULAREA MICROPLASTICELOR ÎN ȚESUTURILE MIDIILOR ȘI INFLUENȚA LOR ASUPRA INDICELUI DE STARE.....Error! Bookmark not defined.

- 9. 1. IntroducereError! Bookmark not defined.
- 9. 2. Material și metode.....Error! Bookmark not defined.
 - 9. 2. 1. Zonele de studiuError! Bookmark not defined.
 - 9. 2. 2. Prelevarea probelor.....Error! Bookmark not defined.
 - 9. 2. 3. Analiza microplasticelor.....Error! Bookmark not defined.
 - 9. 2. 4. Determinarea indicelui de stareError! Bookmark not defined.
 - 9. 2. 5. Analiza statistică a datelor.....Error! Bookmark not defined.
- 9. 3. Rezultate.....Error! Bookmark not defined.
 - 9. 3. 1. Parametrii de mediu.....Error! Bookmark not defined.
 - 9. 3. 2. Parametrii biometriciError! Bookmark not defined.
 - 9. 3. 3. Microplasticele din probele martor și corecția pentru contaminare..... Error! Bookmark not defined.
 - 9. 3. 4. Analiza cantitativă a microplasticelorError! Bookmark not defined.
 - 9. 3. 5. Analiza calitativă a microplasticelorError! Bookmark not defined.
 - 9. 3. 6. Dimensiunea midiilor, abundența microplasticelor și indicele de stare al midiilorError! Bookmark not defined.
- 9. 4. DiscuțiiError! Bookmark not defined.
 - 9. 4. 1. Abundența microplasticelor în midiiError! Bookmark not defined.
 - 9. 4. 2. Tipul, culoarea și dimensiunea microplasticelor acumulate în midii..... Error! Bookmark not defined.
 - 9. 4. 3. Relația dintre dimensiunea midiilor și cantitatea de microplastice Error! Bookmark not defined.
 - 9. 4. 5. Abundența microplasticelor și indicele de stare al midiilor.....Error! Bookmark not defined.

X. BIOACUMULAREA CONTAMINANȚILOR ȘI RĂSPUNSUL CELULAR AL MIDIILOR:

STABILITATEA MEMBRANEI LIZOZOMALEError! Bookmark not defined.

- 10. 1. IntroducereError! Bookmark not defined.
- 10. 2. Material și metode.....Error! Bookmark not defined.
 - 10. 2. 1. Zona de studiu și procedura de prelevareError! Bookmark not defined.
 - 10. 2. 2. Date de mediu și analize chimiceError! Bookmark not defined.
 - 10. 2. 3. Evaluarea stabilității membranei lizozomale.....Error! Bookmark not defined.
 - 10. 2. 4. Analiza datelorError! Bookmark not defined.
- 10. 3. Rezultate.....Error! Bookmark not defined.
 - 10. 3. 1. Condițiile de mediu din zonele de studiuError! Bookmark not defined.
 - 10. 3. 2. Concentrația contaminanților organici în apa de mare și în țesuturi..... Error! Bookmark not defined.
 - 10. 3. 3. Concentrația metalelor grele în apa de mare și în țesuturi.....Error! Bookmark not defined.
 - 10. 3. 4. Stabilitatea membranei lizozomale.....Error! Bookmark not defined.
- 10. 4. DiscuțiiError! Bookmark not defined.

10. 4. 1. Concentrația contaminanților în apa de mare	Error! Bookmark not defined.
10. 4. 2. Concentrațiile din țesuturi și acumularea contaminanților	Error! Bookmark not defined.
10. 4. 3. Răspunsul lizozomal la nivelurile de contaminanți	Error! Bookmark not defined.
CONCLUZII	Error! Bookmark not defined.
BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ	Error! Bookmark not defined.

SCOPUL ȘI OBIECTIVELE LUCRĂRII

Scopul acestei teze este evaluarea impactului factorilor fizico-chimici, biologici și a contaminanților asupra stării de sănătate a speciei *Mytilus galloprovincialis* din zona costieră românească a Mării Negre.

Principalele obiective ale tezei sunt:

1. Evaluarea stării fiziologice a midiilor în relație cu parametrii fizico-chimici ai apei și parametrii biometrici ai midiilor.
2. Determinarea influenței disponibilității hranei asupra indicelui de stare și a compoziției biochimice a midiilor;
3. Investigarea gradului de contaminare cu metale grele și poluanți organici persistenti a zonelor investigate;
4. Examinarea gradului de bioacumulare al contaminanților în midii în relație cu factorii de mediu;
5. Aplicarea unor factori și indici de bioacumulare pentru evaluarea gradului de bioacumulare al metalelor grele în midii și evaluarea stării de sănătate a midiilor;
6. Investigarea gradului de contaminare cu microplastice a midiilor, determinarea relației dintre dimensiunea midiilor și cantitatea de microplastice ingerate și evaluarea impactului asupra condiției fiziologice a midiilor;
7. Evaluarea indicelui de stare ca biomarker fiziologic de stres la contaminarea cu metale grele a midiilor;
8. Aplicarea stabilității membranei lizozomale ca biomarker celular în evaluarea efectelor subletale ale contaminanților din mediu.

Cuvinte cheie: midii, *Mytilus galloprovincialis*, metale grele, poluanți organici, microplastice, efecte fiziologice și celulare, indice de stare, stabilitatea membranei lizozomale.

Teza de doctorat intitulată „Cercetări privind influența factorilor de mediu asupra bivalvei *Mytilus galloprovincialis*” este alcătuită din două părți și este structurată în zece capitole.

Partea I cuprinde stadiul actual al cunoașterii și este structurată în patru capitole în care sunt prezentate informații din literatura de specialitate privind anatomia și fiziologia moluștelor bivalve marine, factorii de mediu care influențează fiziologia și comportamentul midiilor, poluanții prezenți în mediul marin și impactul acestora asupra moluștelor bivalve, dar și biomarkerii ca bioindicatori ai efectelor contaminanților asupra bivalvelor.

Partea a II-a cuprinde contribuțiile personale și este structurată în șase capitole. În capitolul cinci sunt descrise zonele de studiu, metodologia de colectare a probelor și metodele de analiză a probelor colectate. Capitolul șase prezintă influența parametrilor de mediu asupra indicelui de stare și a parametrilor biometrici ai midiilor dar și relațiile dintre indicele de stare al midiilor și caracteristicile biometrice ale acestora. Capitolul șapte prezintă variația sezonieră în compoziția și cantitatea fitoplanctonului din zonele de studiu și evidențiază influența disponibilității hranei asupra variațiilor indicelui de stare și a compoziției biochimice a midiilor. Capitolul opt pune în evidență gradul de contaminare cu metale grele al apei de mare, al sedimentelor, gradul de bioacumulare al metalelor grele în midii și influența metalelor grele asupra indicelui de stare al midiilor. Capitolul nouă subliniază gradul de bioacumulare al microplasticelor în țesuturile midiilor analizate, caracteristicile microplasticelor identificate (tipul, culoarea și dimensiunea lor) dar și relația dintre abundența microplasticelor bioacumulate în midii și indicele de stare. Capitolul zece evidențiază gradul de contaminare al apei și midiilor cu metale grele și poluanți organici, dar și răspunsul în stabilitatea membranei lizozomale la nivelurile de contaminanți din mediu.

PARTEA I. STADIUL CUNOAȘTERII

Midiile fac parte din clasa Bivalvia și se caracterizează prin faptul că au corpul protejat de două valve calcaroase, au un mod de viață sedentar și se hrănesc prin filtrare (Skolka, 2003). Midiile din genul *Mytilus* sunt un grup de moluște bivalve marine care fac parte din familia Mytilidae și se găsesc predominant în zona intertidală a țărmurilor expuse (Dailianis, 2010). Fiziologia și comportamentului midiilor pot fi afectate de diverși factori de mediu cum: ar fi temperatura, salinitatea, expunerea la aer, disponibilitatea hranei etc.

Principalii poluanți prezenți în mediul marin sunt reprezentați de metale grele, poluanți organici și microplastice. În principal, cea mai mare cantitate a metalelor grele prezente în mediul marin provin din activitățile umane și reprezintă o sursă de îngrijorare datorită toxicității, persistenței și nebiodegradabilității lor (Wu et al., 2016) și pot avea efecte subletale și letale asupra organismelor marine (Peters et al., 1997). Metalele grele, chiar și cele esențiale pot avea un efect inhibitoriu asupra creșterii, ratei de filtrare și absorbție a hranei, respirației și metabolismului, reproducerii, dezvoltării gameților și stadiilor larvare, dar și asupra comportamentului bivalvelor (Weis, 2014).

Hidrocarburile aromatice policiclice (PAH-urile) sunt printre cei mai răspândiți și toxici poluanți organici în mediul marin (Baussant et al., 2001). Bioacumularea hidrocarburilor aromatice policiclice determină modificarea proceselor fiziologice ale midiilor, modificarea metabolismului, inhibarea creșterii și reproducerii (Weis, 2014). Bifenilii policlorurați (PCB) și pesticidele organoclorurate (OCP) sunt poluanți organici persistenți care au fost produși pe scară largă în diverse scopuri industriale (Srogi, 2008) și prezintă o importanță excepțională datorită persistenței lor, bioacumulării și toxicității pentru animale sălbatice și oameni (Georgieva et al., 2016).

Expunerea bivalvelor la pesticide determină modificări fiziologice (inhibarea creșterii, reducerea ratelor de filtrare și de absorbție a hranei, reducerea creșterea/scăderea consumului de oxigen, stimularea/inhibarea excreției de amoniac), comportamentale (reducerea activității valvelor) (Weis, 2014), dar și o varietate de efecte neurotoxice, de modulare hormonală și imunologică și tumorigene (Androutsopoulos et al., 2013).

Plasticele sunt polimeri organici sintetici rezultați din polimerizarea monomerilor extrași din petrol sau gaze (Cole et al., 2011). Microplasticele sunt prezente în coloana de apă, sedimentele și biota din toate mediile marine și dulcicole (Coyle et al., 2020). Microplasticele pot fi clasificate ca microplastice primare și secundare, în funcție de sursa de proveniență (Cole et al., 2011). Microplasticele și nanoplasticele primare sunt produse în mod deliberat la dimensiuni foarte mici pentru a fi folosite în diferite produse cosmetice iar cele secundare sunt rezultate din fragmentarea articolelor mai mari ca urmare a proceselor fizico-chimice (radiații UV, abraziune fizică, oxidare chimică etc.) (Miloloža et al., 2021). Expunerea bivalvelor la microplastice determină alterări fiziologice (rata de preluare a hranei și respirația) (Sendra et al., 2021), alterări ale ciclul de viață al bivalvelor (gametogeneza, embriogeneza, dezvoltarea larvară și metamorfoza) (Sendra et al., 2021; Sussarellu et al., 2016), alterări histopatologice (von Moos et al., 2012), genotoxicitate (Sussarellu et al., 2016).

Midiile marine sunt utilizate în mod obișnuit ca organisme indicatoare pentru a detecta poluarea mediului în apele de coastă datorită capacității lor de a acumula diverși contaminanți organici sau anorganici (Livingstone, 1991). Simpla modificare a răspunsurilor fiziologice și biochimice pot prezice impactul poluanților (Dailianis, 2010). Indicatorii biologici care utilizează răspunsurile moleculare, celulare și fiziologice sunt denumiți de obicei biomarkeri. Biomarkerii reprezintă modificări fiziologice, celulare, biochimice sau comportamentale ce pot fi

determinate în țesuturi sau în lichidele din corp sau la nivelul întregului organism și care evidențiază expunerea la și/sau efectele unuia sau mai multor contaminanți chimici (Depledge, 1993).

Indicele de stare este utilizat în două scopuri: ca indicator al calității comerciale a cărnii (Orban et al., 2002) și ca măsură ecofiziologică a sănătății animalelor. Acesta indice reflectă activitățile fiziologice ale organismelor (creșterea, reproducerea, secreția etc.) oferind o perspectivă asupra stării generale de sănătate a acestuia în condiții de mediu specifice (Lucas și Beninger, 1985). Principalii factori care influențează condiția fiziologică (implicit și cea biochimică) a bivalvelor sunt: factorii fizici (temperatură, salinitate, materia organică), chimici (concentrația metalelor grele și a compușilor organici) și biologici (disponibilitatea hranei, ciclul reproductiv și populația de bacterii) (Freites et al., 2003).

Stabilitatea membranei lizozomale (SML) este folosită ca un biomarker general de stres al poluării chimice (Martínez-Gómez et al., 2015). Lizozomii sunt organite multifuncționale prezente în aproape toate celulele eucariote, înconjurate de o membrană care conține enzime hidrolitice implicate în procese celulare precum digestia, apărarea și reproducerea (Pipe, 1993). Destabilizarea membranei lizozomale indică alterări fiziologice sau patologice induse de poluanți (Martínez-Gómez et al., 2015).

PARTEA II. CONTRIBUȚII PERSONALE

INTRODUCERE

Mediile costiere sunt supuse unei presiuni crescânde asupra mediului din cauza creșterii populației, urbanizării, industrializării și turismului (Lay și Zsolnay, 1989). Gradul ridicat de urbanizare al zonei costiere al Mării Negre reprezintă o permanentă amenințare în ceea ce privește poluarea mediului marin. Deși porturile sunt cruciale pentru activitatea economică regională sunt și surse semnificative de poluare (Catianis et al., 2016). Activitățile desfășurate în cadrul porturilor au un impact major asupra mediului și implicit asupra organismelor marine din porturi (Knott et al., 2009).

Midiile, precum specia *Mytilus galloprovincialis* și alte tipuri de bivalve marine, sunt considerate specii indicatoare ideale pentru monitorizarea poluării datorită caracteristicilor lor biologice și ecologice (Beyer et al., 2017). Midiile au capacitatea de a acumula eficient substanțele chimice poluante din apa de mare datorită comportamentului lor de filtrare a apei, oferind o imagine cuprinzătoare a concentrației și biodisponibilității poluanților din mediu acvatic (Beyer et al., 2017). Aceste organisme joacă un rol ecologic crucial, oferind hrană și habitat pentru diverse specii și, în calitate de consumatori primari, servesc ca vectori pentru transferul poluanților antropici din faza abiotică și de la nivelul producției primare la nivelurile trofice superioare din lanțul trofic marin costier (Beyer et al., 2017). În plus, consumul midiilor contaminate reprezintă o cale semnificativă pentru expunerea umană la contaminații chimice (Mititelu et al., 2022) și microplastice (Sangkham et al., 2022).

În ultimii ani, biomarkeri au fost incluși ca mijloc de evaluare a impactului biologic al poluanților în programele de monitorizarea ale poluării marine (Beyer et al., 2017). Un rol important al biomarkerilor este acela de a detecta semne timpurii ale unor schimbări biologice importante. Prezența substanțelor toxice în ecosistem poate perturba relațiile complexe dintre organisme, ceea ce evidențiază necesitatea de a adopta legi și de a pune în aplicare strategii pentru a preveni efectele negative asupra mediilor acvatice, în special asupra ecosistemelor marine (Dailianis, 2010).

VI. INFLUENȚA FACTORILOR DE MEDIU ASUPRA INDICELUI DE STARE AL MIDIILOR

6. 2. Material și metode

Zona de studiu

Studiul s-a desfășurat între luna noiembrie 2017 și noiembrie 2018, cu frecvență sezonieră, în patru locații din zona costieră a litoralului românesc: Portul Midia, Portul Constanța, Portul Mangalia și zona 2 Mai.

Prelevarea și procesarea probelor

Parametrii fizico-chimici ai apei (temperatură, salinitate, pH, oxigen dizolvat și solide dizolvate totale (SDT)) au fost măsurate *in situ* la fiecare prelevare folosind Multiparametrul HANNA HI 98194. Pentru analizele de laborator, au fost colectate câte trei probe de apă (replici) pentru determinarea concentrației de clorofilă *a* (Chl *a*) și a suspensiilor solide totale (SST).

Concentrația clorofilei *a* s-a determinat prin extracția pigmentilor cu acetonă 90% și măsurată spectrofotometric conform metodei SCOR-UNESCO (1966). Determinarea suspensiilor solide totale a fost realizată conform metodei recomandate de Grasshoff et al. (1999). Pentru determinarea parametrilor biometrici și a indicelui de stare, s-au prelevat aleatoriu un număr de 40-50 de indivizi (*Mytilus galloprovincialis*) per stație.

Măsurătorile biometrice și indicele de stare (IS)

Lungimea, lățimea și înălțimea indivizilor a fost măsurată cu un șubler digital. S-a cântărit greutatea totală, greutatea umedă a țesutului, greutatea uscată a țesuturilor moi și a valvelor după uscarea la etuvă. Indicele de stare (IS) a fost calculat folosind formula: $IS = (\text{greutatea uscată a țesutului (g)} / \text{greutatea uscată a valvelor (g)}) \times 100$ (Davenport și Chen, 1987; Rainer și Mann, 1992).

Analiza statistică a datelor

Analiza statistică a datelor a fost realizată cu ajutorul programele JASP v0.19.0 și PRIMER v7.0.21. Testul Shapiro-Wilk a fost aplicat pentru a verifica ipotezele distribuțiilor normale ale tuturor seturilor de date, iar testul Levene pentru a examina omogenitatea varianțelor. A fost aplicat testul neparametric Spearman de corelație a rangurilor și au fost utilizate diagramele tip Box plot (sau Box-Whisker). Analiza Componentelor Principale (ACP) s-a realizat pe baza datelor transformate și normalizate.

6. 3. Rezultate și discuții

O parte din rezultatele prezentate în acest capitol au fost publicate în Pantea et al. (2018).

Indicele de stare a înregistrat valoare medie maximă în Portul Mangalia ($16,67 \pm 9,04$), una minimă în stația 2 Mai ($7,17 \pm 3,50$) (Fig. 1A). În ceea ce privește variația sezonieră, cea mai mare valoare medie a fost atinsă în sezonul de primăvară și cea mai mică în sezonul de iarnă (Fig. 1B).

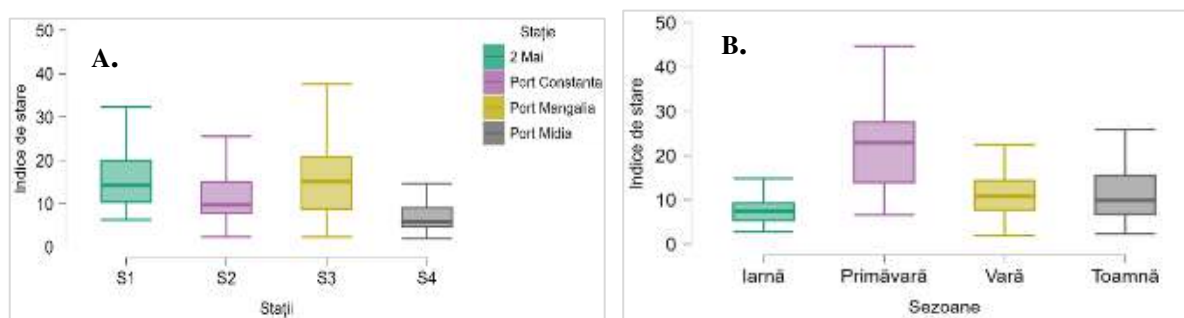


Fig. 1. Distribuția valorilor indicelui de stare al midiilor pe stații (A) și sezoane (B)

Valoarea medie cea mai ridicată a indicelui de stare ($24,80 \pm 6,33$) a fost observată la midiile din clasa de lungime 6,1–9 cm (mидii mari), în sezonul de primăvară (Fig. 2). Cea mai mică valoare medie a indicelui a fost înregistrată la midiile din clasa 4,1–6 cm (mидii de dimensiune medie).

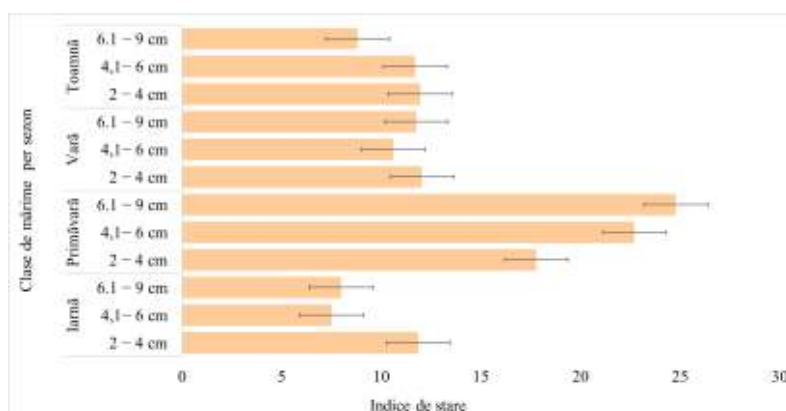


Fig. 2. Variația sezonieră a indicelui de stare pe clase de mărime (media±dev.std)

Rezultatul testului de corelare Spearman a evidențiat corelații statistic semnificative între indicele de stare, solidele dizolvate totale și clorofila *a* (Tabelul 1). Corelații statistic semnificative au fost observate și între temperatură și oxigen dizolvat, suspensii solide totale și clorofila *a*. Salinitatea s-a corelat cu solidele dizolvate totale, oxigenul dizolvat cu suspensii solide totale și suspensii solide totale cu clorofila *a*.

Tabelul 1. Matricea de corelație Spearman dintre parametrii de mediu și indicele de stare al midiilor (*Mytilus galloprovincialis*). Nivel de semnificație statistică: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. T: Temperatura apei; S: Salinitate; OD: Oxigen dizolvat; SDT: Solide dizolvate totale; SST: Suspensii solide totale; CLF a: Clorofila a; IS: Indice de stare.

Parametrii	T	S	OD	pH	SD	SST	CLF a	IS
T	Coeficientul rho	—	—	—	—	—	—	—
	p	—	—	—	—	—	—	—
S	Coeficientul rho	0,021	—	—	—	—	—	—
	p	0,940	—	—	—	—	—	—
OD	Coeficientul rho	-0,785***	0,013	—	—	—	—	—
	p	<0,001	0,961	—	—	—	—	—
pH	Coeficientul rho	-0,035	0,075	0,203	—	—	—	—
	p	0,900	0,782	0,450	—	—	—	—
SDT	Coeficientul rho	-0,297	0,570*	0,109	-0,203	—	—	—
	p	0,263	0,021	0,689	0,450	—	—	—
SST	Coeficientul rho	0,538*	0,127	-0,544*	0,259	-0,300	—	—
	p	0,034	0,640	0,032	0,332	0,258	—	—
CLF a	Coeficientul rho	0,571*	0,046	-0,388	0,185	-0,438	0,656***	—
	p	0,023	0,867	0,138	0,491	0,091	0,007	—
IS	Coeficientul rho	0,488	-0,480	-0,382	-0,003	-0,797***	0,282	0,553*
	p	0,057	0,060	0,145	0,996	<0,001	0,288	0,029

Aplicând ACP la aceste seturi de date, au fost extrase trei componente principale (PC) cu valoare proprie > 1 (eigenvalue) care au explicat împreună 80,7% din variabilitatea totală a datelor. Valoarea proprie a factorilor a fost de 3,45 (PC1), 1,61 (PC2) și 1,4 (PC3). PC1 a explicat 43,1%, PC2 20,1%, PC3 17,5% din variabilitate. Din contribuția variabilelor pe componentele principale, s-a observat că atât PC1, cât și PC2 au fost asociate cu diferiți factori de mediu. Conform ACP, indicele de stare s-a corelat pozitiv cu pH-ul și clorofila *a*, și negativ cu solidele dizolvate totale (Fig. 3). Analiza PCA a confirmat că indicele de stare a prezentat o variație sezonieră semnificativă. De asemenea, analiza multivariată a confirmat că indicele de stare al midiilor din zonele portuare s-a diferențiat complet de cel al midiilor din zona 2 Mai, punând în evidență influența parametrilor de mediu.

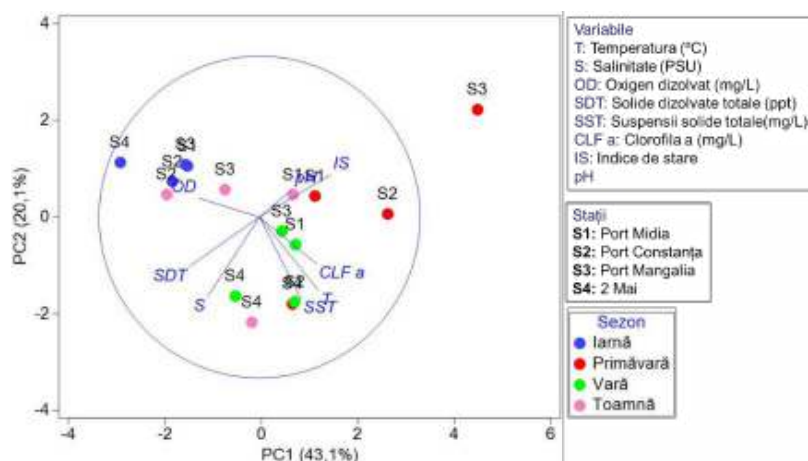


Fig. 3. Analiza componentelor principale (ACP) prezentând variația sezonieră a parametrilor de mediu și a indicelui de stare pe stații

Corelații statistic semnificative au fost înregistrate între toate variabilele biometrice investigate și indicele de stare, deși coeficientul de corelație a fost slab sau mediu. Dependența dintre variabilele biometrice (lungime, lățime, înălțime și greutate) a avut un grad de corelație ridicat și mediu. Valorile coeficienților de corelație (ρ) și valoarea p asociată sunt prezentate în Tabelul 2.

Tabelul 2. Matricea de corelație Spearman dintre măsurătorile biometrice și indicele de stare al midiilor (*Mytilus galloprovincialis*). Nivel de semnificație statistică: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. LG: Lungimea cochiliei; LT: Lățimea cochiliei; ÎN: Înălțimea cochiliei; GT: Greutatea totală; GUMT: Greutatea umedă a țesutului moale; GUST: Greutatea uscată a țesutului; GUSV: Greutatea uscată a valvelor; IS: Indice de stare.

Parametri	LG	LT	ÎN	GT	GUMT	GUST	GUSV	IS
LG	Coeficientul ρ							
LT	Coeficientul ρ	0,927***	—					
	p	<0,001	—					
ÎN	Coeficientul ρ	0,918***	0,928***					
	p	<0,001	<0,001	—				
GT	Coeficientul ρ	0,910***	0,856***	0,838***				
	p	<0,001	<0,001	<0,001	—			
GUMT	Coeficientul ρ	0,773***	0,742***	0,732***	0,857***			
	p	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	—		
GUST	Coeficientul ρ	0,565***	0,561***	0,546***	0,687***	0,923***	—	
	p	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	—	
GUSV	Coeficientul ρ	0,898***	0,849***	0,825***	0,949***	0,737***	0,558***	—
	p	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	—
IS	Coeficientul ρ	-0,217***	-0,202***	-0,199***	-0,148**	0,297***	0,541***	-0,332***
	p	<0,001	<0,001	<0,001	0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Rezultatul analizei componentelor principale (ACP) a evidențiat două componente principale (PC1 și PC2) cu o valoare proprie mai mare de > 1 și care împreună au explicat 94,4% din variabilitatea totală a datelor. Valoarea proprie a primelor două componente a fost de 5,36 (PC1) și respectiv 2,19 (PC2). PC1 a explicat 67,0% și PC2 27,4% din variabilitatea datelor. Analiza componentelor principale a arătat că indicele de stare s-a corelat pozitiv cu greutatea uscată și greutatea umedă a țesutului (Fig. 4). Corelații pozitive au fost observate și între parametrii morfologici (lungimea, lățimea și înălțimea midiilor), greutatea totală și greutatea uscată a valvelor. Distribuția datelor multivariate a confirmat că parametrii biometrici ai midiilor au fost influențați de condițiile de mediu specifice fiecărei locații, midiile din porturi diferențiindu-se complet de cele din stația 2 Mai.

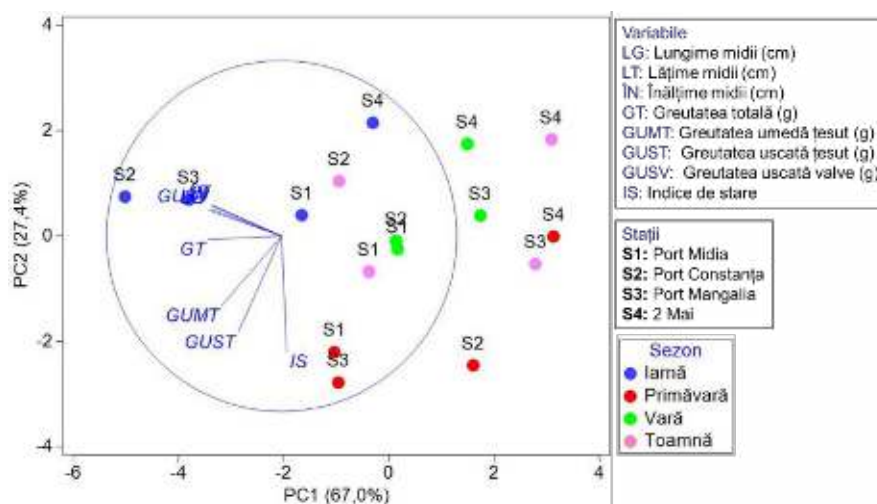


Fig. 4. Analiza componentelor principale (ACP) prezentând variația sezonieră a parametrilor biometrici și a indicelui de stare pe stații

Variația indicelui de stare este influențată de fazele ciclului de reproducere și de factorii de mediu (temperatura, salinitatea și hrana) (Çelik et al., 2012). În prezentul studiu, indicele de stare al midiilor *M. galloprovincialis* a prezentat o variație sezonieră semnificativă, urmând îndeaproape ciclurile de dezvoltare gonadală. Strohmeyer et al. (2008) au susținut că cantitatea de hrană induce o creștere a indicelui de stare al midiilor, aspect confirmat și de rezultatele prezentului studiu. Corelația pozitivă obținută între indicele de stare și clorofila *a*, a indicat că variația acestui indice este strâns legată de disponibilitatea hranei. În general, indicele de stare din stația de referință (2 Mai) a avut valori mai scăzute ca urmare a condițiilor trofice reduce și, posibil, influenței negative a solidelor dizolvate totale. În prezentul studiu, au fost observate variații semnificative între stații în ceea ce privește măsurătorile morfometrice și de greutate ale midiilor, similar cu rezultatele unui alt studiu (Mendoza et al., 2023).

VII. INFLUENȚA DISPONIBILITĂȚII HRANEI ASUPRA STĂRII FIZIOLOGICE ȘI BIOCHIMICE A MIDILOR

7. 2. Material și metode

Zona de studiu și colectarea probelor

Campaniile de prelevare au fost realizate între noiembrie 2017 și noiembrie 2018, de-a lungul coastei românești a Mării Negre, în patru locații de prelevare reprezentând diferite condiții de mediu, și anume: Portul Midia (S1), Portul Constanța (S2) și Portul Mangalia (S3) și 2 Mai (S4). Locațiile au fost selectate pe baza diferitelor lor condiții trofice.

Temperatura și salinitatea apei de mare au fost măsurate *in situ* cu ajutorul unei sonde multiparametrice. Au fost colectate probe de apă pentru a evalua disponibilitatea hranei (calitatea și cantitatea fitoplanctonului). Probele au fost conservate imediat după colectare cu 20 ml de formaldehidă 37%.

Specimenele de *M. galloprovincialis* (80–100 indivizi) au fost colectate aleatoriu de la diferite adâncimi (0,5–2 m) cu ajutorul unei greble metalice sau manual. După colectare, eșantioanele au fost transportate imediat la laborator și apoi prelucrate. Treizeci de indivizi au fost selectați aleatoriu pentru indicele de stare, iar restul midiilor au fost păstrate la –20 °C pentru analize biochimice ulterioare.

Analiza calitativă și cantitativă a fitoplanctonului

Probele au fost sedimentate în camere de sedimentare Utermöhl de 10 ml timp de 24 de ore (Edler și Elbrächter, 2010) și au fost analizate la un microscop inversat la o mărire de 200x și 400x. Speciile de fitoplancton au fost identificate până la cel mai apropiat nivel taxonomic posibil (gen, specie sau subspecie), și mai apoi celulele fiecărei specii au fost numărate. Abundența (celule/L) și biomasa (mg/m^3) fitoplanctonului au fost calculate utilizând programul Ecology Database (sursa: NIMRD).

Indicele de stare și analiza biochimică

Treizeci de midii au fost selectate aleatoriu din fiecare locație de prelevare pentru a măsura indicele de stare (IS), conținutul de umiditate al țesuturilor (U) și cenușa (C). Indicele a fost calculat conform metodei recomandate de Davenport și Chen (1987) și Rainer și Mann (1992). Greutatea cenușei (C) și greutatea uscată fără cenușă (AFDW – ash free dry weight) au fost determinate conform metodei AOAC (1990).

Pentru a determina compoziția biochimică a țesuturilor moi (de exemplu, proteine, glucide și lipide), 25–30 de midii au fost grupate într-o singură probă. Conținutul de proteine a fost determinat utilizând metoda Lowry modificată (Razet et al., 1996). O curbă de calibrare a fost realizată folosind serul de albumină bovină ca standard. Glucidele au fost determinați prin metoda Dubois modificată (Razet et al., 1996), iar conținutul de lipide prin metoda Soxhlet, care implică extracția cu eter într-un aparat Soxhlet.

Analiza datelor

Toate datele au fost testate pentru distribuție normală (testul Shapiro-Wilk) și omogenitatea varianțelor (testul Levene). Datele au fost analizate statistic folosind testul neparametric Kruskal-Wallis, Coeficienții de corelație Spearman și Analiza statistică multivariată (Analiza Componentelor Principale, ACP). De asemenea, datele au fost reprezentate folosind și grafice de tip Shade Plot. Analizele statistice ale datelor au fost efectuate cu programele XLSTAT 2023.3.1 și PRIMER v7.0.21. Nivelul de semnificație a fost stabilit la $p < 0,05$ pentru toate analizele.

7. 3. Rezultate și discuții

Rezultatele prezentate în acest capitol au fost publicate în Pantea et al. (2024).

Abundența (celule/L) și biomasa (mg/m^3) totală a fitoplanctonului au variat în funcție de anotimpuri și locație (Fig. 5). În general, abundența totală și biomasa urmează o tendință similară între sezoane, cu valori mai ridicate în siturile Portul Midia, Portul Constanța și Portul Mangalia. Abundențe și biomase mai mari au fost observate în primăvară, vară și toamnă. Cea mai mare abundență a fost înregistrată în Portul Midia (toamna), urmată de Portul Constanța (vara) și Portul Mangalia (primăvara). În ceea ce privește biomasa, Portul Constanța a avut cea mai mare valoare în timpul verii, urmată de Portul Midia în toamnă și Portul Constanța în primăvară.

Diatomeele au fost cel mai dominant grup în iarnă, primăvară, vară și toamnă (Fig. 5A). Dinoflagelatele au fost cele mai abundente vara (în Portul Mangalia). Cianobacteriile au fost cel mai abundent grup, în special în Portul Mangalia și 2 Mai. Criptofitele au dominat comunitatea fitoplanctonică în aproape toate stațiile și anotimpurile. În general, dinoflagelatele au fost cel mai dominant grup din punct de vedere al biomasei (Fig. 5B). Diatomeele au avut biomase ridicate în special primăvara, vara și toamna.

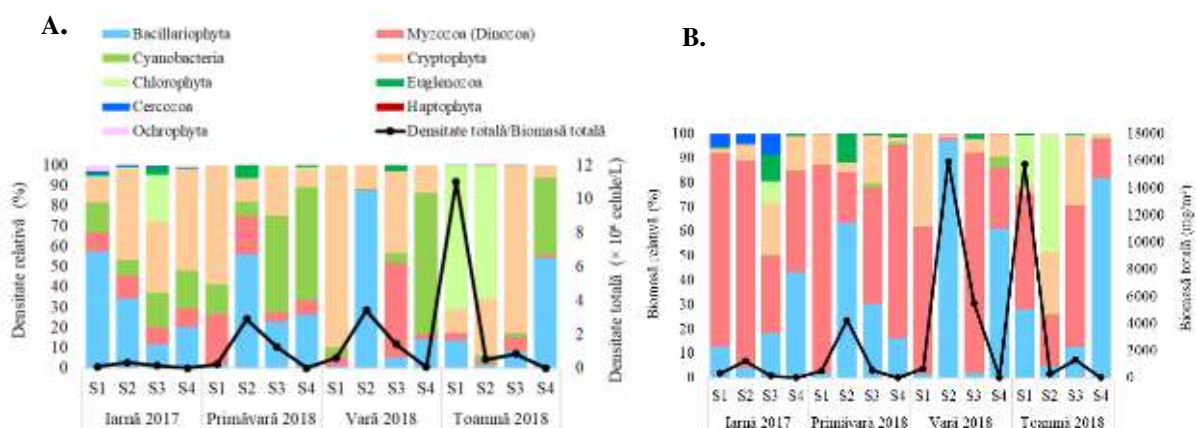


Fig. 5. Variația sezonieră a densității relative și totale (A) și a biomasei relative și totale (B) a fitoplanctonului

Conținutul de glucide a variat de la $0,66 \pm 0,03\%$ (în 2 Mai) la $20,31 \pm 0,60\%$ (Port Mangalia), iar conținutul de lipide de la $1,29 \pm 0,59\%$ (în 2 Mai) la $13,23 \pm 0,85\%$ (în Port Midia) (Fig. 6A). Conținutul mediu de glucide a fost cel mai ridicat în primăvară ($18,55 \pm 1,22\%$) și cel mai scăzut în vară ($2,35 \pm 2,02\%$). Conținutul mediu de lipide a prezentat valori mai ridicate în iarnă ($9,23 \pm 3,84\%$) și primăvară ($8,86 \pm 0,96\%$), și valori mai scăzute în vară ($3,76 \pm 2,63\%$) și toamnă ($2,57 \pm 1,21\%$) (Fig. 6B). Conținutul de proteine din midii a variat de la $31,42 \pm 7,01\%$ (Portul Constanța) la $41,57 \pm 1,95\%$ (Portul Constanța) (Fig. 6C). Cea mai mare valoare medie a conținutului de proteine a fost înregistrată în iarnă ($40,38 \pm 1,01\%$) și toamnă ($35,53 \pm 1,65\%$), iar cea mai mică în primăvară ($34,09 \pm 3,14\%$) și vară ($34,38 \pm 2,20\%$).

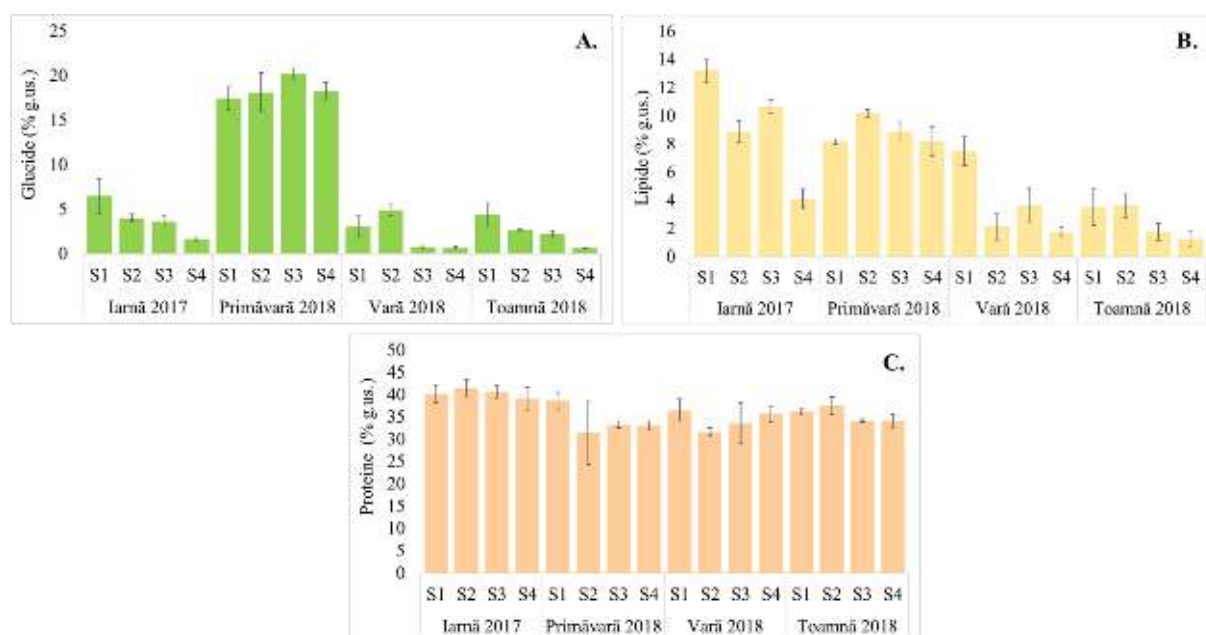


Fig. 6. Variația sezonieră a conținutului de glucide (A), lipide (B) și proteine (C) în midiile *Mytilus galloprovincialis* (medie $\pm$ dev.std., $n = 3$) în perioada 2017–2018. S1: Portul Midia, S2: Portul Constanța, S3: Portul Mangalia, S4: 2 Mai.

Indicele de stare s-a corelat pozitiv cu abundența și biomasa fitoplanctonului, cu glucidele și greutatea uscată a țesuturilor (Tabelul 3). A fost observată o relație inversă între indice și umiditate. Proteinele au prezentat o corelație semnificativă cu umiditatea, greutatea uscată a țesuturilor și temperatura apei de mare. Lipidele s-au corelat cu glucidele, AFDW și cenușa. Glucidele au prezentat o corelație pozitivă cu greutatea uscată a țesuturilor

și AFDW, și una negativă cu umiditatea și cenușa. Greutatea uscată a țesuturilor s-a corelat cu temperatura, umiditatea, cenușa și AFDW. Umiditatea s-a corelat cu AFDW și temperatura.

Tabelul 3. Coeficientul de corelație Spearman între parametrii biologici evaluați la specia *M. galloprovincialis*, abundența și biomasa fitoplanctonului și parametrii de mediu (n = 16). L: lipide; G: glucide; P: proteine; IS: indice de stare; AFDW: greutatea uscată fără cenușă; C: cenușă; U: umiditate; GUT: greutatea uscată a țesuturilor; GUV: greutatea uscată a valvelor; AF: abundența fitoplanctonului; BF: biomasa fitoplanctonului; T: temperatura apei de mare; S: salinitatea. Valorile în bold sunt semnificative statistic la $p < 0,05$.

Variable	L	G	AFDW	C	IS	U	GUT	T	P	AF	BF	S	GUV
L	1												
G	0.650	1											
AFDW	0.647	0.871	1										
C	-0.647	-0.871	-1.000	1									
IS	0.241	0.688	0.744	-0.744	1								
U	-0.003	-0.591	-0.603	0.603	-0.791	1							
GUT	0.003	0.591	0.603	-0.603	0.791	-1.000	1						
T	-0.182	0.215	0.132	-0.132	0.481	-0.739	0.739	1					
P	0.309	-0.229	-0.150	0.150	-0.447	0.641	-0.641	-0.618	1				
AF	-0.026	0.276	0.241	-0.241	0.641	-0.300	0.300	0.305	-0.394	1			
BF	-0.006	0.232	0.203	-0.203	0.591	-0.253	0.253	0.280	-0.303	0.944	1		
S	-0.124	-0.106	-0.379	0.379	-0.500	0.226	-0.226	0.001	-0.188	-0.391	-0.376	1	
GUV	-0.097	-0.041	-0.003	0.003	0.053	-0.074	0.074	0.230	0.288	0.018	-0.103	-0.141	1

Rezultatele testului Kruskal-Wallis au arătat diferențe statistic semnificative între stații în ceea ce privește abundența fitoplanctonului (KW = 9,715; $p = 0,021$), biomasa fitoplanctonului (KW = 8,735; $p = 0,033$) și indicele de stare (KW = 148,550; $p = 0,0001$). Au fost observate diferențe semnificative din punct de vedere statistic și între sezoane pentru indicele de stare (KW = 182,475; $p = 0,0001$), conținutul de proteine (KW = 9,419; $p = 0,024$), conținutul de glucide (KW = 9,287; $p = 0,026$), conținutul de lipide (KW = 11,007; $p = 0,012$), umiditate (KW = 11,228; $p = 0,011$), țesut uscat (KW = 11,228; $p = 0,011$), AFDW (KW = 9,154; $p = 0,027$) și cenușă (KW = 9,154; $p = 0,027$).

Analiza post hoc (testul Dunn) a arătat că au fost detectate diferențe statistic semnificative în ceea ce privește abundența și biomasa și diferențe semnificative în ceea ce privește indicele de stare între stația 2 Mai (cu nivel trofic scăzut) și stațiile portuare (cu nivel trofic ridicat): Portul Midia, Portul Constanța, Portul Mangalia. De asemenea, s-au constatat diferențe semnificative între valorile indicelui între iarnă, primăvară, vară și toamnă, dar nu și între vară și toamnă.

Analiza Componentelor Principale (ACP) a valorilor medii ale parametrilor biologici evaluați la *M. galloprovincialis*, abundența și biomasa fitoplanctonului, parametrii de mediu și variabilitatea asociată a distribuției stațiilor sunt prezentate în Figura 7. Primele două componente principale au valori proprii de 3,89 și, respectiv, 2,31 și explică 68,9% din variația totală a matricei de date (Fig. 7A, B). Componenta principală 1 (PC1) a explicat 43,2% din varianța totală și a arătat contribuția semnificativă a glucidelor (0,42), indicelui de stare (0,48), AFDW (0,43) și abundenței fitoplanctonului (0,32). Componenta principală 2 (PC2) a explicat 25,7% din variabilitatea datelor și a fost caracterizată în principal de contribuția proteinelor (0,46) și a lipidelor (0,50).

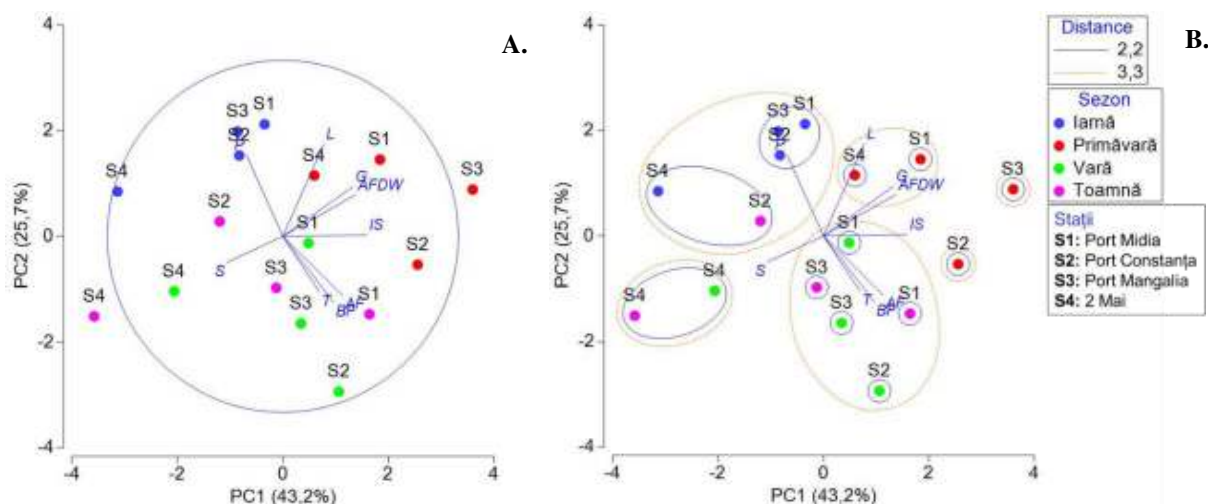


Fig. 7. Analiza Componentelor Principale (ACP) a indicelui de stare, componentelor biochimice, AFDW (greutatea uscată fără cenușă), abundenței și biomasei fitoplanctonului și a parametrilor de mediu (temperatură și salinitate) (A) și gruparea stațiilor (B), realizată pe baza matricei distanței Euclidiene a datelor transformate la rădăcina a patra și normalizate.

Dinamica fitoplanctonului influențează disponibilitatea hranei în apă (Lok et al., 2010). Apele costiere sunt supuse unor variații semnificative în ceea ce privește disponibilitatea hranei, care sunt influențate atât de cantitatea de hrană, cât și de compoziția speciilor (Lok et al., 2010). Compoziția fitoplanctonului variază spațial și temporal datorită variației diversilor factori fizici și biologici (Bayne, 1993). Prezentul studiu a arătat că porturile (Portul Midia, Portul Constanța și Portul Mangalia) au o diversitate și o abundență celulară a speciilor mai mare decât stația 2 Mai (în toate anotimpurile).

Indicele de stare și compoziția biochimică sunt strâns legate de temperatura apei de mare, disponibilitatea hranei și ciclul de gametogeneză (Beninger și Lucas, 1984; Strohmeier et al., 2008; Çelik et al., 2012). Temperatura și disponibilitatea hranei sunt principalii factori care afectează creșterea bivalvelor (Bayne și Newell, 1983). Cu toate acestea, influența acestor variabile este complexă și depinde de modul în care fiecare specie dobândește și consumă energie în mediul său natural (Bayne și Newell, 1983).

Rezervele energetice acumulate, în special glicogen și proteine, și dezvoltarea gonadelor reflectă valori bune ale indicelui de stare (Sahin et al., 2006). Activitatea metabolică a bivalvelor se caracterizează prin faze de acumulare și consum ale rezervelor corporale (Moschino et al., 2023). Acest proces este influențat de disponibilitatea fitoplanctonului, de condițiile de mediu și de ciclul de gametogeneză (Çelik et al., 2012; Orban et al., 2002). Rezultatele acestui studiu au arătat că conținutul de lipide și glucide au atins valoarea maximă în primăvară și au scăzut în vară, probabil pentru că au fost utilizate în procesul de gametogeneză. Conținutul ridicat de glucide și lipide observat în primăvară poate fi legat de creșterea disponibilității hranei.

VIII. BIOACUMULAREA METALELOR GRELE ȘI RĂSPUNSUL FIZIOLOGIC AL MIDIIILOR: INDICELE DE STARE

8. 2. Material și metode

Locațiile de prelevare

Studiul a fost efectuat între luna noiembrie 2017 și noiembrie 2018, în patru stații localizate în sectorul sudic al litoralului românesc și anume: Portul Midia, Portul Constanța, Portul Mangalia și 2 Mai (stația de referință).

Colectarea probelor

Parametrii fizico-chimici (temperatură, salinitate, pH, oxigen dizolvat și solide totale dizolvate) au fost măsurați *in situ* cu ajutorul unei sonde multiparametrice. Au fost colectate probe de apă pentru determinarea suspensiilor solide totale (SST) și a concentrației metalelor grele din apă. Pentru determinarea indicelui de stare și a concentrației de metale din țesuturile moi ale midiilor, au fost colectate aleatoriu aproximativ 50–60 de midii (*Mytilus galloprovincialis*).

Analiza chimică

Procedura de analiză a metalelor grele din apa de mare, sedimente și midii, a fost realizată conform metodelor recomandate pentru studiul poluării marine (IAEA - MEL, 1999; UNEP, 1995; UNEP, 1990; UNEP, 1993).

Determinarea factorilor și a indicilor de bioacumulare

Factorul de bioacumulare (FBA) reprezintă raportul dintre concentrația metalului în midii (C_m , $\mu\text{g/kg}$ greutate uscată) și concentrația metalului din coloana de apă (C_a , $\mu\text{g/L}$) (Gobas și Morrison, 2000). Factorul de acumulare biotă-sediment (FABS) reprezintă raportul dintre concentrația metalului în midii (C_m , $\mu\text{g/kg}$ greutate uscată) și concentrația metalului în sedimente (C_s , $\mu\text{g/kg}$ greutate uscată) (Szefer et al., 1999).

Indicii de bioacumulare, și anume, indicele de bioacumulare al mediei individuale a multimetalelor (IMBI) și indicele de poluare cu metale (IPM), au fost calculați conform Boudjema et al. (2022).

Determinarea indicelui de stare

Pentru a determina indicele de stare au fost analizate treizeci de midii. Indicele de stare (IS) a fost calculat folosind ecuația recomandată de Davenport și Chen (1987) și de Rainer și Mann (1992):

Analiza statistică a datelor

A fost aplicat testul de normalitate Shapiro-Wilk și testul Levene. Diferențele dintre seturile de date au fost testate folosind Analiza varianței (ANOVA) sau testul neparametric Kruskal-Wallis dar și teste Post Hoc (testul Tukey de comparare multiplă sau testul Dunn pentru comparațiile pe perechi). Coeficientul de corelație Spearman a fost utilizat pentru toate analizele de corelație. De asemenea, datele au fost reprezentate folosind și diagrame de tip Shade plot, Analiza Componentelor Principale (ACP), Analiza Cluster și Scalarea Non-metrică Multidimensională (nMDS). Analiza Cluster, ACP, nMDS și Shade plot-urile au fost realizate folosind programul PRIMER v7.0.21 dar și programul JASP v0.19.0.

8. 3. Rezultate și discuții

O parte din datele prezentate în acest capitol au fost publicate în Pantea et al. (2020).

Potențialul de bioacumulare al metalelor urmărește o secvență descrescătoare $\text{Cu} > \text{Ni} > \text{Cd} > \text{Cr} > \text{Pb}$ (Fig. 8). Concentrațiile metalelor grele acumulate în țesuturile moi ale midiilor au variat între: 0,65–5,44 $\mu\text{g/g}$

g.um. Cu; 0,31–0,73 $\mu\text{g/g}$ g.um. Cd; 0,01–0,33 $\mu\text{g/g}$ g.um. Pb; 0,15–3,08 $\mu\text{g/g}$ g.um. Ni; 0,08–1,31 $\mu\text{g/g}$ g.um. Cr. Cea mai mare concentrație de Cu a fost înregistrată la midiile din Portul Midia (în vară), de Cd la cele din Portul Mangalia (în iarnă), de Pb la cele din stația 2 Mai (în iarnă), de Ni la cele din stația 2 Mai (în primăvară) și de Cr la cele din Portul Midia (în vară).

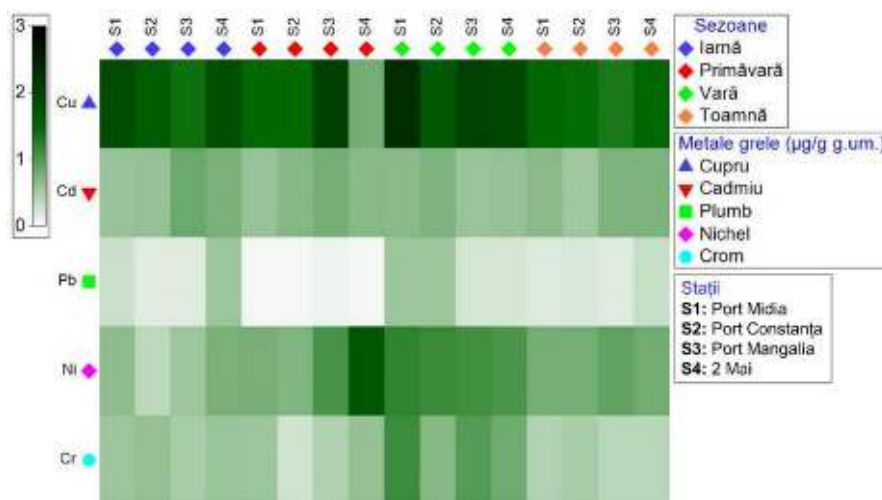


Fig. 8. Concentrația metalelor grele acumulate în țesutul speciei *Mytilus galloprovincialis* ($\mu\text{g/g}$ greutate umedă)

Testul ANOVA nu a arătat diferențe semnificativ statistice între stațiile investigate în ceea ce privește concentrația totală a metalelor din țesuturile moi ale midiilor ($F_{(3,12)} = 3,688$; $p = 0,777$), însă a evidențiat diferențe între sezoane ($F_{(3,12)} = 7,219$; $p = 0,005$). Diferențe semnificative au fost evidențiate de către analiza Post Hoc Tukey între iarnă – vară, primăvară – vară și vară – toamnă.

Analiza Componentelor Principale (ACP) a concentrațiilor metalelor grele din țesuturile moi ale midiilor *M. galloprovincialis* și a parametrilor de mediu, a arătat că cele două componente ale ACP au explicat împreună 51,5% din variabilitatea totală a datelor (Fig. 9). PC1 a reprezentat 26,8% din varianță și a avut o valoare proprie de 2,95, iar PC2 24,7% și o valoare proprie de 2,72. PC1 a fost mai bine reprezentat de contribuția temperaturii, oxigenului dizolvat, Ni și Cr, iar PC2 de solidele dizolvate totale și Pb.

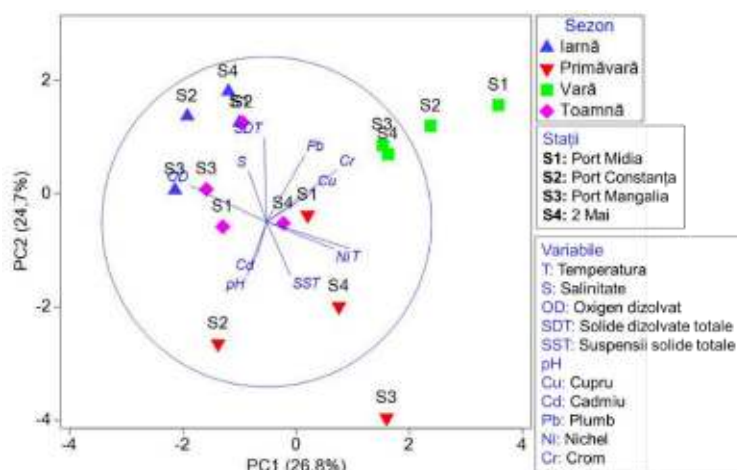


Fig. 9. Analiza componentelor principale (ACP) prezentând variația sezonieră a parametrilor de mediu și a concentrațiilor de metale grele din țesuturile moi ale midiilor

Testul Kruskal-Wallis H nu a evidențiat diferențe statistic semnificative între stații ($H_{(3)} = 0,624$; $p = 0,891$), în ceea ce privește factorul de bioacumulare ai metalelor grele (FBA). Diferențe semnificative au fost înregistrate între sezoane ($H_{(3)} = 8,843$; $p = 0,031$). Analiza Post Hoc Dunn, a arătat diferențe semnificative între iarnă – primăvară ($p = 0,011$), primăvară – vară ($p = 0,039$), primăvară – toamnă ($p = 0,011$). Nu au existat diferențe semnificative între iarnă – vară ($p = 0,624$), iarnă – toamnă ($p = 0,978$) și vară – toamnă ($p = 0,644$).

În ceea ce privește factorul de acumulare biotă-sediment (FABS), rezultatul testul Kruskal-Wallis H nu a arătat o diferență semnificativă din punct de vedere statistic între stații ($H_{(3)} = 5,738$; $p = 0,125$) sau sezoane ($H_{(3)} = 3,243$; $p = 0,356$).

Cea mai mare valoare IMBI (0,71) a fost observată în Portul Midia (S1) și a fost reprezentată de cadmiu (Cd) (Fig. 10A, B). Însă, ca și valoare medie, valoarea cea mai ridicată a fost înregistrată în Portul Mangalia (S3) și cea mai mică în Portul Midia (S1).

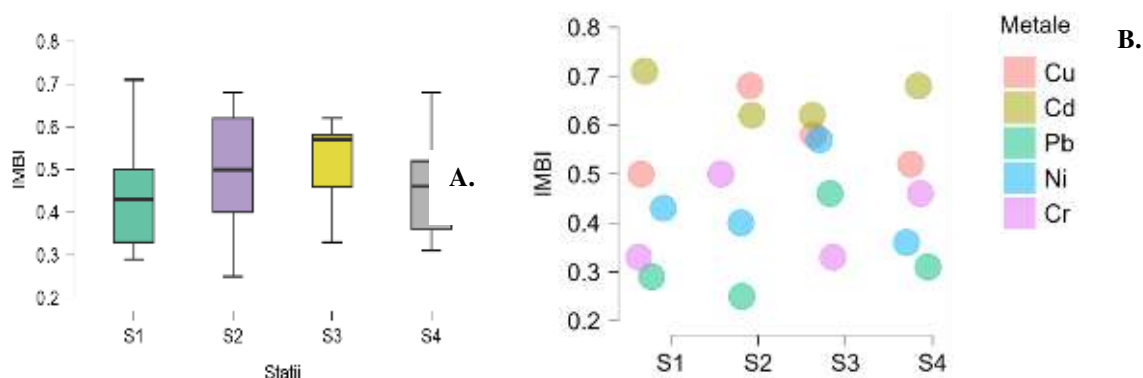


Fig. 10. Distribuția valorilor indicelui de bioacumulare al mediei individuale a multimetalelor (IMBI) în funcție de stații (A) și metale (B)

În general, tiparul de distribuție al IMBI pe stații urmează următoarea secvență: $Cd > Cu > Ni > Cr > Pb$. Cea mai mare valoare IMBI (0,73) a fost observată în toamnă și a fost reprezentată de cupru (Cu) (Fig. 11A, B). Valoarea medie cea mai ridicată a fost înregistrată tot în toamnă (0,62) și cea mai mică în primăvară (0,48). Distribuția valorilor IMBI a metalelor pe sezoane a variat larg, fără să urmeze un tipar anume.

Testul ANOVA nu a arătat diferențe semnificativ statistice între stații ($F_{(3,16)} = 0,152$; $p = 0,927$) sau sezoane ($F_{(3,16)} = 1,535$; $p = 0,244$), în ceea ce privește indicele de bioacumulare al mediei individuale a multimetalelor (IMBI).

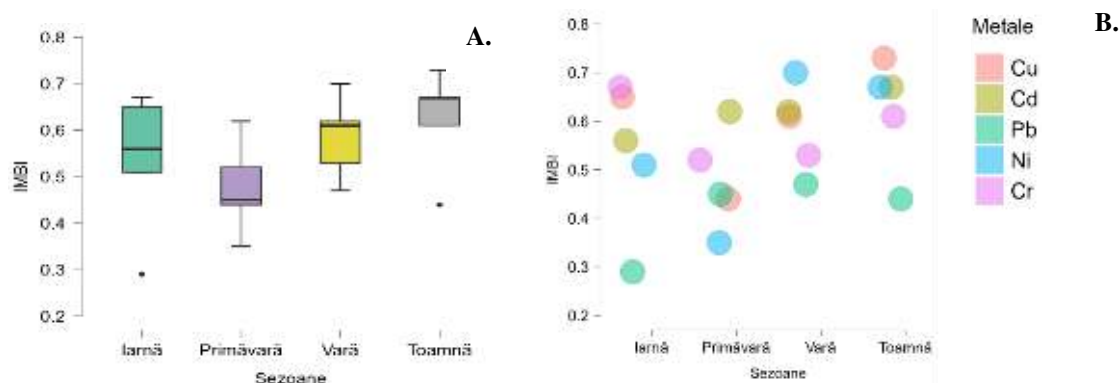


Fig. 11. Distribuția valorilor indicelui de bioacumulare al mediei individuale a multimetalelor (IMBI) în funcție de anotimp (A) și metale (B)

Valorile indicelui de poluare cu metale (IMP) a variat de la 0,05 la 319,41. Cea mai mare valoare medie a indicelui de poluare cu metale (IPM) a fost observată în S1 – Portul Midia (81,11), iar cea mai mică în S3 – Portul Mangalia (6,17) (Fig. 12A). Valoarea medie cea mai ridicată valoare a indicelui a fost înregistrată în vară (105,63), iar cea mai mică în primăvară (0,53) (Fig. 12B).

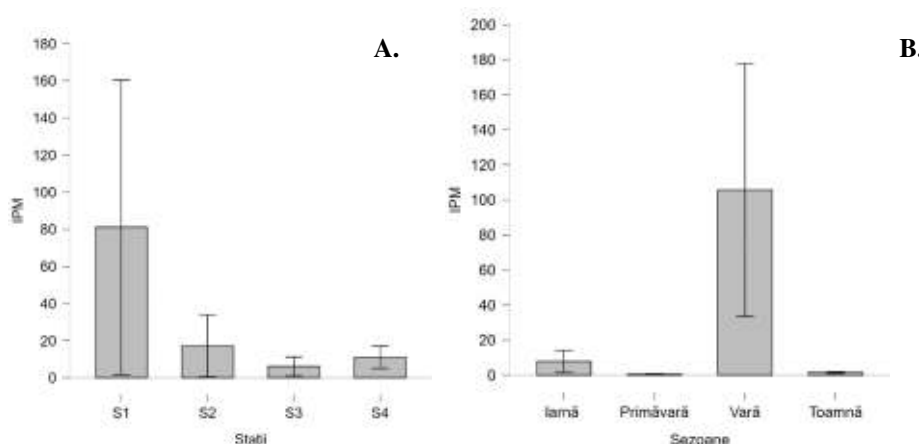
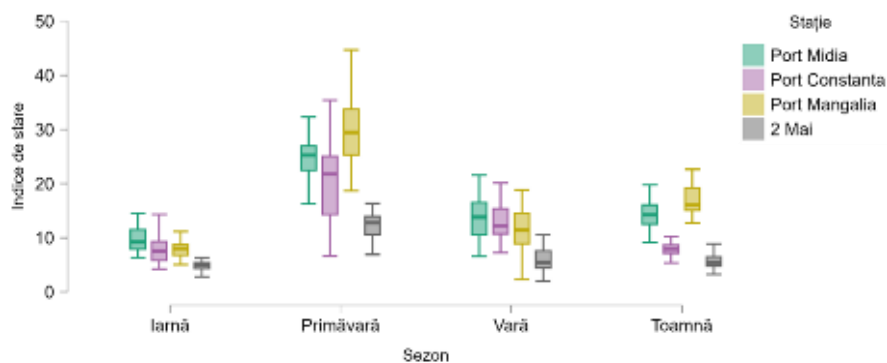


Fig. 12. Media indicelui de poluare cu metale (IPM) (medie±st.dev.) per stație (A) și per sezon (B)

Testul Kruskal-Wallis H nu a evidențiat diferențe statistic semnificative între stații ($H_{(3)} = 0,926$; $p = 0,819$), în ceea ce privește indicele de poluare cu metale (IMP). Diferențe semnificative au fost înregistrate între sezoane ($H_{(3)} = 9,419$; $p = 0,024$). Analiza Post Hoc Dunn a evidențiat diferențe semnificative doar între sezonul de primăvară și vară ($p = 0,002$). Nu au existat diferențe semnificative între iarnă – primăvară ($p = 0,158$), iarnă – vară ($p = 0,102$), iarnă – toamnă ($p = 0,824$), primăvară – toamnă ($p = 0,235$) și vară – toamnă ($p = 0,063$).

Indicele de stare al speciei *M. galloprovincialis* a variat între 2,79–18,31 (în iarnă), între 6,61–44,66 (în primăvară), între 1,94–22,46 (în vară) și între 2,33–25,86 (în toamnă) (Fig. 13). Cea mai mare valoare medie a indicelui ($29,49 \pm 6,02$) a fost atinsă în Portul Mangalia (în primăvară) și cea mai mică la stația 2 Mai ($4,96 \pm 1,60$), în iarnă.



Analiza de scalare non-metrică multidimensională (nMDS) care a fost calculată pe baza datelor privind valorile indicelui de stare între anul 2017–2018, impunând ca factor stația și sezonul, este prezentată în Figura 14. Din analiza nMDS, se poate observa că stațiile s-au grupat în patru clustere (Fig. 14), în funcție de similaritatea dintre valoarea indicelui de stare. Drept urmare, se poate observa că primul grup departajat este reprezentat de porturi (S1 – Portul Midia și S3 – Portul Mangalia), stații care au avut cel mai mare indice stare în primăvară. În

general, prin reprezentarea nMDS se poate observa că stațiile din porturi (S1 – Portul Midia, S2 – Portul Constanța și S3 – Portul Midia) au avut tendința să se grupeze, ca urmare a similitudinii dintre valori.

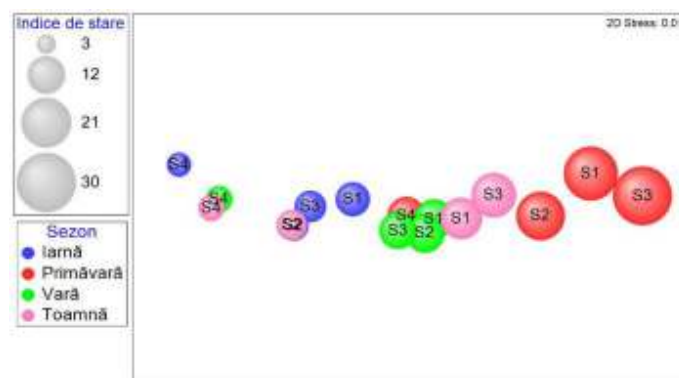


Fig. 14. Diagrama de ordonare prin Scalarea Non-metrică Multidimensională (nMDS) a disimilitudinilor Bray-Curtis dintre stații pe baza valorilor medii transformate ($\sqrt{}$) ale indicelui de stare al midiilor (valoarea stresului $2D = 0,01$).

Testul Kruskal-Wallis H a arătat o diferență semnificativă din punct de vedere statistic între diferite stații ($H_{(3)} = 165,532$; $p < 0,001$). Analiza Post Hoc Dunn, arătat diferențe semnificative între indicele de stare din Portul Midia – Portul Constanța, Portul Midia – 2 Mai, Portul Constanța – Portul Mangalia, Portul Constanța – 2 Mai și Portul Mangalia – 2 Mai. Nu au existat diferențe semnificative între Portul Midia și Portul Mangalia.

Diferențe semnificative au fost evidențiate de testul Kruskal-Wallis H și în ceea ce privește variația indicelui de stare între sezoane ($H_{(3)} = 182,391$; $p < 0,001$). Analiza Post Hoc Dunn, arătat diferențe semnificative între iarnă – primăvară, iarnă – vară, iarnă – toamnă, primăvară – vară, primăvară – toamnă. Nu au existat diferențe semnificative între sezonul de vară și cel de toamnă.

Rezultatul testului de corelație Spearman dintre indicelui de stare al midiilor, concentrația metalelor grele din apă, sedimente și țesut, factorul de bioacumulare și factorul de acumulare biotă-sediment este prezentat în Tabelul 4. Corelații statistic semnificative au fost observate doar între indicele de stare și Pb ($R = -0,564$; $p = 0,023$).

Tabelul 4. Corelația Spearman dintre indicele de stare al midiilor, concentrația metalelor grele (apă, sedimente și țesut), factorul de bioacumulare și factorul de acumulare biotă-sediment. Nivel de semnificație statistică: * $p < 0,05$. Cu: Cupru; Cd: Cadmiu; Pb: Plumb; Ni: Nichel; Cr: Crom; IS: Indice de stare; FBA: Factorul de bioacumulare; FABS: Factorul de acumulare biotă-sediment.

Parametrii	Componenta		Cu	Cd	Pb	Ni	Cr
IS	APĂ	Coeficientul rho	0.150	0.330	0.126	0.218	0.458
		p	0.579	0.211	0.641	0.417	0.075
IS	SEDIMENTE	Coeficientul rho	-0.271	-0.453	-0.206	0.432	0.224
		p	0.310	0.080	0.443	0.096	0.404
IS	ȚESUT	Coeficientul rho	-0.029	0.059	-0.564*	0.233	-0.252
		p	0.917	0.828	0.023	0.386	0.346
IS	FBA	Coeficientul rho	-0.280	-0.470	-0.299	-0.291	-0.567
		p	0.293	0.066	0.261	0.273	0.022
IS	FABS	Coeficientul rho	-0.164	0.449	-0.357	-0.293	-0.436
		p	0.543	0.081	0.174	0.270	0.091

ACP a indicelui de stare al midiilor și concentrațiilor de metale din apă, sedimente și midii, a evidențiat cinci componente principale (PC) cu valoare proprie > 1 (eigenvalue) care au explicat împreună 81,8% din variabilitatea totală a datelor (Fig. 15). PC1 a explicat 26,1%, PC2 20,6%, PC3 14,8%, PC4 12,6% și PC5 7,7%

din variabilitate. Reprezentarea grafică a ACP, a arătat că indicele de stare a fost influențat de concentrațiile metalelor grele din apă, în special Cu, Pb, Ni și Cr (Fig. 15). De asemenea, analiza multivariată a evidențiat și distribuția spațială a variabilelor prin separarea stațiilor în patru grupe (clustere), bine delimitate sezonier. Deci, se poate observa că metalele grele din sedimente au fost mai bine reprezentate în iarnă, cele din apa de mare în primăvară, iar cele din țesuturile midiilor în vară și toamnă.

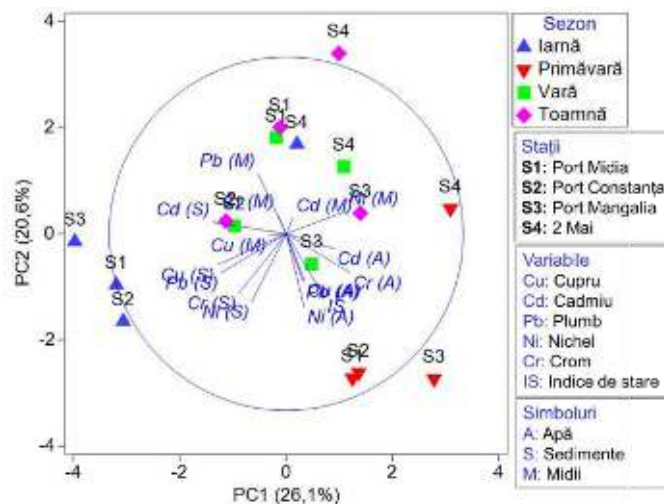


Fig. 15. Analiza componentelor principale (ACP) prezentând variația sezonieră a indicelui de stare și a concentrațiilor de metale grele din apă, sedimente și țesuturile moi ale midiilor

Proprietățile fizico-chimice ale apei prezintă o mare variabilitate în funcție de sezon și locații (Rouane-Hacene et al., 2015). Parametrii fizico-chimici ai apei afectează disponibilitatea contaminanților și, prin urmare, influențează bioacumularea și răspunsurile biologice ale organismelor la aceștia (Rouane-Hacene et al., 2015). Contaminarea apei prezintă variații sezoniere și spațiale în ceea ce privește tipul și concentrația contaminanților, putând fi considerată o posibilă cauză a variației sezoniere a biodisponibilității și bioacumulării metalelor grele în țesuturile midiilor (Rouane-Hacene et al., 2015). În general, cea mai mare concentrație de metale din apă a fost observată în special în porturi, similar și altor studii (Oros et al., 2017; Lazăr et al., 2021). În mod contrar, în zona de referință (2 Mai) au fost de asemenea înregistrate valori mari ale Cu și Pb. Depășiri ale standardelor de calitate pentru apele marine (Environmental Quality Standards, EQS) au fost observate doar în cazul Cd ($EQS_{Cd} = 1,5 \mu g/L$), în Portul Mangalia (în toamnă) (Uniunea Europeană, 2013).

În prezentul studiu, cele mai mari concentrații de metale grele au fost observate în sedimente, în toate locațiile investigate și în toate anotimpurile, aspect confirmat și de alte studii (Lazăr et al., 2021). Porturile au fost cele mai contaminate locații în ceea ce privește concentrația metalelor din sedimente, aspect evidențiat și de alte studii (Lazăr et al., 2021).

Condiția fiziologică este unul dintre principalii factori capabili să controleze distribuția internă și retenția contaminanților în midi (Windows și Donkin, 1992). Concentrația metalelor detectate în țesuturile midiilor au fost rezultatul echilibrului net dintre procesele de captare-înmagazinare și excreție, ca urmare a expunerii la metale prin apă, hrană, sedimente și aer (Abderrahmani et al., 2000). Raportându-ne la concentrația metalelor grele în midi, s-a observat o tendință mai ridicată de bioacumulare a metalelor grele în porturi ca urmare a expunerii la concentrații mai mari de metale. Principala cale de absorbție a metalelor grele fiind ingestia hranei (Abderrahmani et al., 2000). În prezentul studiu, relația dintre indicele de stare și concentrația metalelor din țesuturi a fost invers proporțională.

IX. BIOACUMULAREA MICROPLASTICELOR ÎN ȚESUTURILE MIDIILOR ȘI INFLUENȚA LOR ASUPRA INDICELUI DE STARE

9. 2. Material și metode

Zonele de studiu

Pentru a investiga nivelul de poluare cu microplastice și răspunsul fiziologic (indicele de stare) al midiilor sălbatice *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) din zona costieră românească a Mării Negre, au fost selectate patru locații de prelevare expuse la diferite niveluri de presiuni antropice și condiții de mediu variate. Studiul a fost realizat în perioada mai- noiembrie 2018, la scară sezonieră (primăvară, vară și toamnă). Locațiile de prelevare au fost selectate luând în considerare principalele surse potențiale de microplastice din zona costieră, cum ar fi: stațiile de epurare a apelor uzate menajere și industriale, traficul maritim, turismul și pescuitul.

Prelevarea probelor

Aproximativ 60 de midii (*Mytilus galloprovincialis*) au fost colectate în mod aleatoriu de la diferite adâncimi și de pe diferite substraturi (artificiale și naturale). Exemplarele colectate cu scopul determinării microplasticele acumulate în țesuturi au fost depozitate la $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ până la analiza ulterioară, iar restul indivizilor rămași au fost puși în pahare Berzelius de sticlă (3 L) și menținuți la $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ timp de aproximativ 24 de ore.

Analiza microplasticele

Midiile au fost decongelate la temperatura camerei, măsurate și grupate în trei clase de mărime ($n = 3$): mici (2,0–4 cm), medii (4,1–6 cm) și mari (6,1–9 cm). În total, 108 midii au fost analizate în cadrul studiului. De asemenea, țesutul moale a fost cântărit pentru a obține greutatea umedă a probei analizate (greutate umedă, g).

Metoda de extracție a microplasticele a implicat o digestie cu peroxid de hidrogen a țesuturilor moi, conform protocolului recomandat de Li et al. (2015). O soluție salină concentrată a fost utilizată pentru separarea prin flotatie a microplasticele. Filtrele au fost examinate cu ajutorul unui stereomicroscop pentru identificarea vizuală a microplasticele pe baza caracteristicilor lor fizice. Microplasticele au fost clasificate în cinci morfotipuri (fibre, fragmente, pelete, folii și spumă), grupate după culoare (transparente, negre, albastre, roșii și verzi) și măsurate. Microplasticele au fost identificate vizual pe baza caracteristicilor fizice ale particulelor, în conformitate cu Barrows et al. (2017). Indicele de stare a fost determinat conform metodei recomandate de Davenport și Chen (1987) și de Rainer și Mann (1992).

Analiza statistică a datelor

Analizele statistice au fost realizate folosind programul JASP v0.19.0 și programul PRIMER v7.0.21. Datele au fost evaluate pentru normalitate și omogenitatea varianțelor utilizând testele Shapiro-Wilk și, respectiv, Levene. Deoarece datele nu au avut o distribuție normală și nu au îndeplinit ipoteza omogenității varianțelor au fost evaluate utilizând testul neparametric Kruskal-Wallis, urmat de testul post hoc Dunn. Datele au fost analizate statistic folosind testul de corelație Spearman, Analiza Cluster și Analiza Componentelor Principale (ACP).

9. 3. Rezultate și discuții

Au fost identificate în total 4584 de microplastice în midiile analizate (108 indivizi). Cea mai mare valoare medie a numărului de microplastice per individ a fost observată la stația 2 Mai în timpul verii (69,89 MP/ind.) și cea mai mică în Portul Constanța în toamnă (18,89 MP/ind.) (Fig. 16A). Testul Kruskal-Wallis H nu a evidențiat diferențe statistic semnificative între stații ($H(3) = 4,744$; $p = 0,192$) sau sezoane ($H(2) = 0,346$; $p = 0,841$), în ceea ce privește abundența microplasticele (MP) din țesutul midiilor per în individ. Abundența medie

a numărului de MP per gram a variat între 4,87 MP/g (Portul Midia, primăvara) și 57,76 MP/g (Portul Mangalia, vara). Abundențe foarte ridicate de microplastice au fost observate și la stația 2 Mai în primăvară, vară și toamnă (Fig. 16B).

Testul Kruskal-Wallis H a evidențiat diferențe statistic semnificative între abundența microplasticelor (MP) per gram între stații ($H(3) = 8,641$; $p = 0,034$). Analiza Post Hoc Dunn, a arătat diferențe semnificative între Portul Midia – Portul Mangalia și între Portul Midia – 2 Mai. În ceea ce privește variația sezonieră a abundența microplasticelor (MP) per gram, rezultatul testul Kruskal-Wallis H nu a arătat o diferență semnificativă din punct de vedere statistic între sezoane ($H(2) = 0,808$; $p = 0,668$).

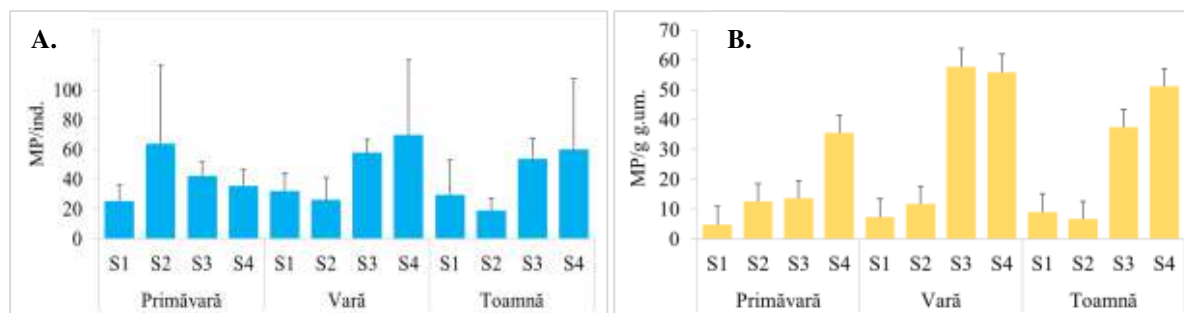


Fig. 16. Abundența microplasticelor (medie $\pm$ dev.std.) per individ (A) și per gram greutate umedă (g g.um.) din zonele investigate

Analiza nMDS realizată pe baza factorului "substrat" a evidențiat faptul că midiile cu cele mai mari abundențe de MP au fost colectate de pe frânghiile de plastic și de pe pilonii de susținere ai pontonului din proximitate lor (în stația 2 Mai – S4), de pe flotoarele de plastic ale pontoanelor plutitoare (Portul Mangalia – S3) și de pe coca unei nave ancorate de foarte mult timp (Portul Constanța – S2) (Fig. 17). Al doilea grup de stații, în care substratul a fost reprezentat în general de cheul de beton, a avut valori mai mici comparativ cu primul grup. De asemenea, se poate observa și că stația cu cea mai mică valoare medie a abundenței microplasticelor s-a delimitat vizibil de restul stațiilor (Portul Constanța – S2).

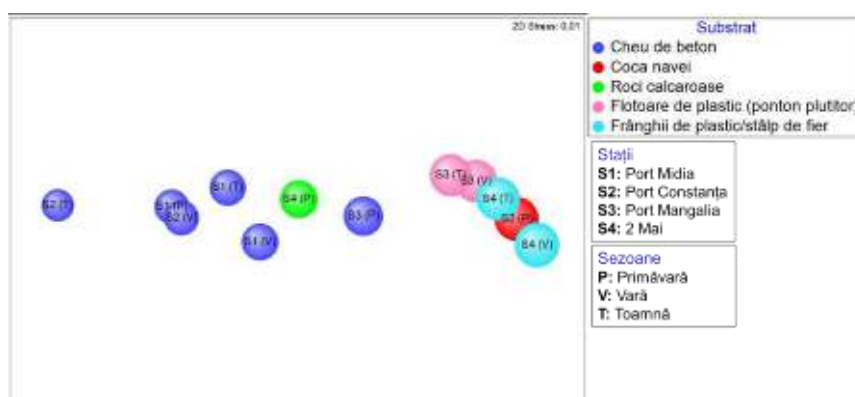


Fig. 17. Diagrama de ordonare prin Scalarea Non-metrică Multidimensională (nMDS) a disimilitudinilor Bray-Curtis dintre stații pe baza valorilor medii transformate ($\sqrt{}$) ale abundenței microplasticelor, în funcție de factorul "substrat" (valoarea stresului 2D = 0,01)

În ceea ce privește analiza nMDS realizată pe baza factorului "surse de poluare", s-a observat că abundența MP din midii a urmat aceleași tendințe ca și cea realizată pe baza factorului "substrat" (Fig. 18). Gradul de disponibilitate al MP pentru midii, ca urmare a prezenței abundente a acestora în coloana de apă, a fost mai ridicată la stația 2 Mai – S4, Portul Mangalia – S3 și Portul Constanța – S2 datorită deversărilor apelor uzate menajere și/sau industriale dar și activităților de pescui/turism. Testul Kruskal-Wallis H nu a evidențiat diferențe

statistic semnificative între stații ($H(3) = 4,744$; $p = 0,192$) sau sezoane ($H(2) = 0,346$; $p = 0,841$), în ceea ce privește abundența totală a microplasticelor (MP) în țesutul midiilor.

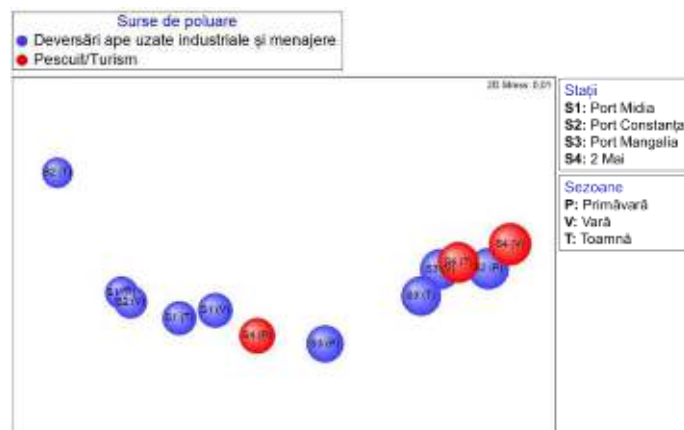


Fig. 18. Diagrama de ordonare prin Scalarea Non-metrică Multidimensională (nMDS) a disimilitudinilor Bray-Curtis dintre stații pe baza valorilor medii transformate ($\sqrt{}$) ale abundenței microplasticelor, în funcție de factorul "surse de poluare" (valoarea stresului 2D = 0,01)

Fibrele au fost cele mai observate MP în stațiile investigate (77,22–99,21%), urmate de fragmente (0,79–21,10%). Peletele și foliile au reprezentat 0,84% și respectiv 1,18% din totalul MP identificate. Spuma a fost cel mai rar MP identificat în probele analizate (0,59%) (Fig. 19).

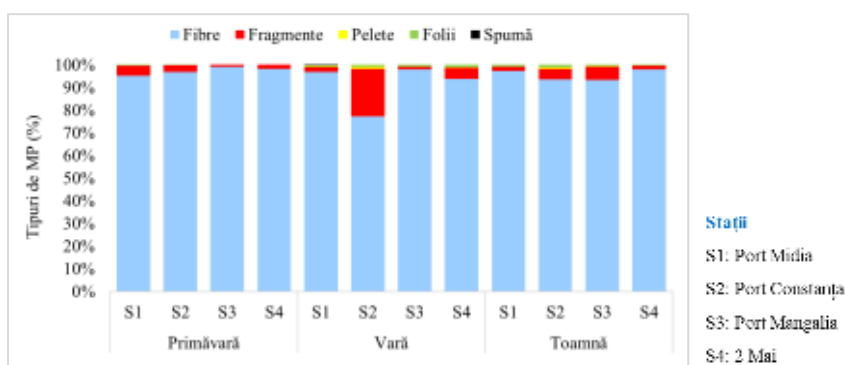


Fig. 19. Compoziția procentuală a diferitelor tipuri de microplastice identificate în midii per locație și sezon

Microplasticele observate au avut diferite culori, și anume: negru, transparent, albastru, roșu și verde (Fig. 20). Cea mai frecventă culoare a fost cea transparentă (86,29%), urmată de negru (21,52%), roșu (10,35%) și albastru (9,41%). Microplasticele de culoare verde au fost mai puțin reprezentate (1,27%). În general, cea mai frecventă culoare observată în fibre a fost cea transparentă.

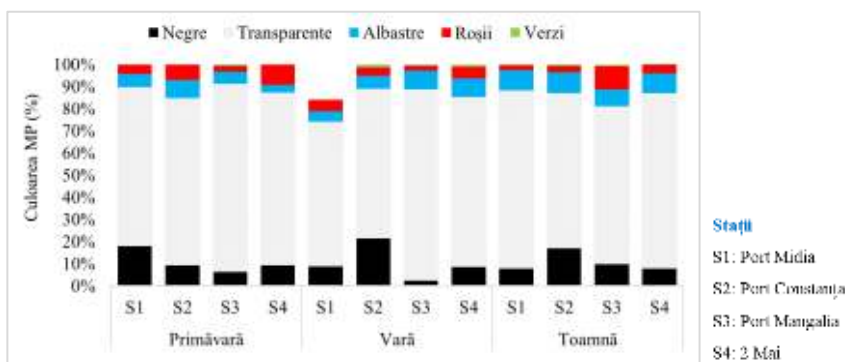
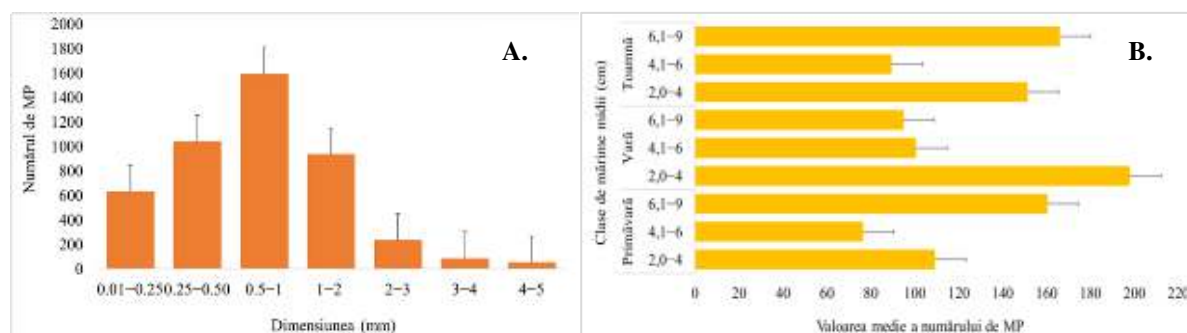


Fig. 20. Compoziția procentuală a diferitelor culori ale microplastice identificate în midii per locație și sezon

Dimensiunea microplasticelor izolate din țesutul midiilor a variat între 0,01 mm și 5 mm (Fig. 21A). În probe au fost găsite și 49 de fibre de plastic mai mari de 5 mm (5,01–13,46 mm) dar nu au fost incluse în analiză, fiind considerate mezoplastice. Microplasticele cu dimensiuni mai mici de 1 mm au fost cele mai frecvente întâlnite în probe. Cel mai mare număr de MP a fost găsit în intervalul 0,5–1 mm.

În ceea ce privește abundența MP în țesuturile midiilor pe clase de mărimi, cea mai mare abundență medie fost observată în vară la midiile din clasa de mărime 2,0–4 cm (198 MP) și cea mai mică în toamnă la midiile din clasa de 4,1–6 cm (76,50 MP) (Fig. 21B). În primăvară și toamnă, cea mai mare proporție a fost observată în clasa de mărime 6,1–9 cm (160,40 MP și, respectiv 166 MP).



Testul de corelare Spearman a evidențiat corelații statistic semnificative doar între lungimea midiilor (LM), greutatea umedă a țesutului midiilor (GM), numărul de microplastice totale (MPT), numărul de microplastice per individ (MP/ind.) și numărul de microplastice per gram greutate umedă (MP/g) (Tabelul 5). Corelații negative au fost înregistrate între LM – MPT, LM – MP/ind., LM – MP/g și GM – MP/g. Corelații pozitive au fost observate între IS – GM, MPT – MP/ind., MPT – MP/g și între MP/ind. – MP/g.

Analiza nMDS a datelor privind abundența medie a microplasticelor pe clase de mărime, suprapusă cu analiza Cluster realizată pe baza similarității Bray-Curtis dintre stații, a evidențiat faptul că stațiile s-au împărțit în două grupuri distincte, în funcție de abundența microplasticelor din midii (Fig. 22).

Tabelul 5. Matricea de corelație Spearman dintre indicii de stare al midiilor, lungimea midiilor, greutatea umedă a țesutului midiilor, numărul de microplastice totale, numărul de microplastice per individ și numărul de microplastice per gram greutate umedă. Nivelul de semnificație statistică: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. IS: Indice de stare; LM: Lungime midii; GM: Greutatea umedă a țesutului midiilor; MPT: Numărul de microplastice totale; MP/ind.: Numărul de microplastice per individ (*Mytilus galloprovincialis*); MP/g: Numărul de microplastice per gram greutate umedă (*Mytilus galloprovincialis*).

Variable		IS	LM	GM	MPT	MP/ind.	MP/g
IS	Coefficientul rho	—					
	p	—					
LM	Coefficientul rho	0,266					
	p	0,404					
GM	Coefficientul rho	0,811**	0,671*	—			
	p	0,002	0,020	—			
MPT	Coefficientul rho	0,217	-0,664*	0,434	—		
	p	0,499	0,022	0,161	—		
MP/ind.	Coefficientul rho	-0,217	-0,664*	-0,434	1,000***	—	
	p	0,499	0,022	0,161	<,001	—	
MP/g	Coefficientul rho	0,434	-0,601*	-0,664*	0,825**	0,825**	—
	p	0,161	0,043	0,022	0,002	0,002	—

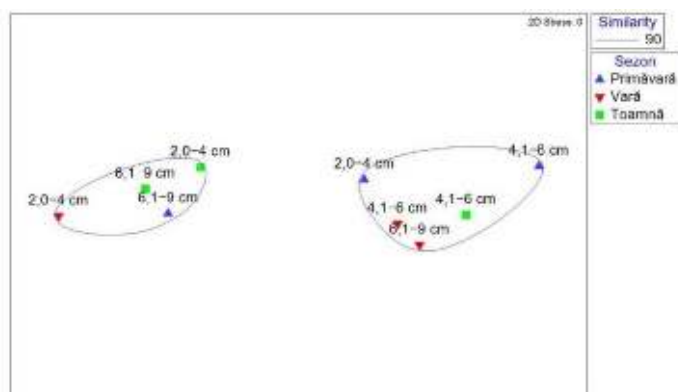


Fig. 22. Diagrama de ordonare prin Scalarea Non-metrică Multidimensională (nMDS) a disimilitudinilor Bray-Curtis dintre stații pe baza valorilor medii transformate ($\sqrt{}$) ale abundenței microplasticelor per clase de mărime, suprapusă cu analiza Cluster (valoarea stresului 2D < 0,01)

Testul Kruskal-Wallis H a evidențiat diferențe statistic semnificative între abundența microplasticelor (MP) ($H_{(2)} = 7,853$; $p = 0,041$), în ceea ce privește clasele de mărime ale midiilor. Analiza Post Hoc Dunn, a arătat diferențe semnificative între clasele de mărime 2,0–4 cm și 4,1–6 cm.

Analiza Cluster a indicat o delimitare clară a datelor în patru grupuri distincte (Fig. 23A). Abundența MP pe clase de mărime fost mai similară în sezonul de vară, comparativ cu celelalte sezoane. Analiza componentelor principale (ACP) a parametrilor de mediu (temperatură, salinitate și clorofila *a*), indicelui de stare al midiilor și al abundenței microplasticelor pe clase de mărimi, a pus în evidență două componente principale (PC) cu valoare proprie > 1 (eigenvalue) care au explicat împreună 60,1% din variabilitatea totală a datelor. PC1 a explicat 30,8% și PC2 29,3% din variabilitate matricei de date (Fig. 23B). Deoarece PC3, PC4 și PC5 au avut o valoare proprie < 1, acestea nu au fost luate în considerare în analiză.

Reprezentarea grafică a ACP, a arătat o relație pozitivă între indicele de stare și concentrația clorofilei *a* din apă, dar și între indice și temperatură. De asemenea, analiza a indicat o relație negativă între indicele de stare al midiilor și cantitatea de microplastice acumulate în țesuturi (Fig. 23B).

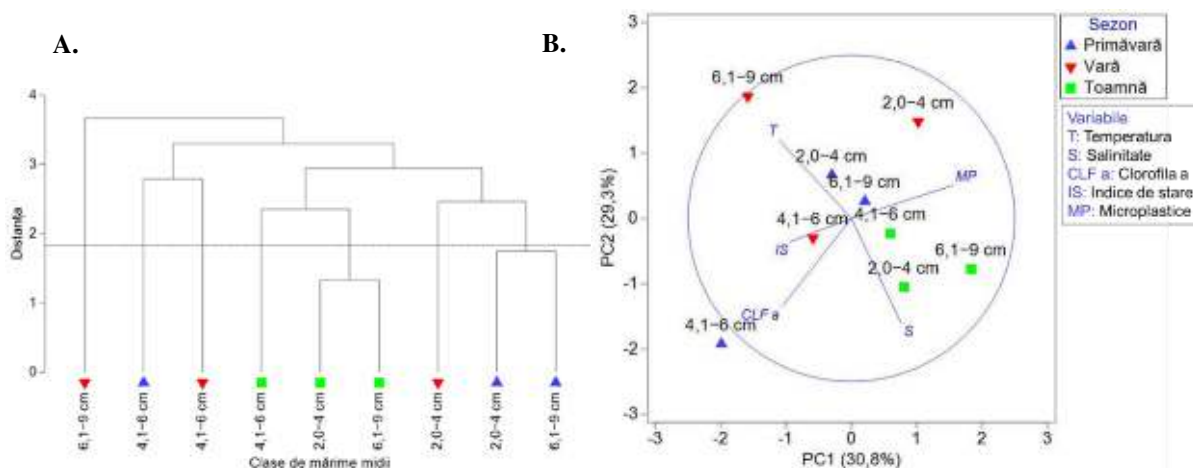


Fig. 23. Dendrograma de similitudine Bray-Curtis (A) și analiza componentelor principale (ACP) prezentând variația parametrilor de mediu, a indicelui de stare al midiilor și al abundenței microplasticelor pe clase de mărimi

Acest studiu demonstrează prezența microplasticelor în bivalvele *M. galloprovincialis* în apele din sectorul sudic al litoralului Românesc al Mării Negre. Cel mai mare număr de microplastice a fost găsit în zona 2 Mai (în vară) și cel mai mic în Portul Constanța (în toamnă). O posibilă explicație a acestor diferențe ar putea fi

legate de proximitatea diferitelor surse de poluare asociate fiecărei locații (stații de tratare a apelor uzate, deversări necontrolate a apelor menajere, pescuitul, influența Dunării) (Pojar et al., 2022). Midiile au arătat o capacitate ridicată de acumulare a microplasticelor în țesuturile moi, foarte probabil datorită prezenței în cantități mari a microplasticelor în mediul înconjurător (Mathalon și Hill, 2014). Qu et al. (2018) au arătat o puternică relație liniară pozitivă între nivel de microplastice din apă și midii, sugerând că midiile ingeră microplastice în raport cu cantitatea prezentă în apă.

În prezentul studiu, au fost identificate în total 4584 microplastice în 108 midii analizate. O trecere în revistă a literaturii referitoare la microplasticele identificate în *M. galloprovincialis* din Marea Neagră, arată că rezultatele cantitative ale prezentului studiu au fost semnificativ mai mari decât cele raportate de Gedik și Eryaşar (2020), și anume o medie de 0,69 MP/individ.

Deși în prezentul studiu nu există dovezi evidente că microplasticele au un efect direct asupra indicelui de stare al midiilor, acestea pot avea un efect asupra activităților de hrănire (Sussarellu et al., 2016), pot modifica echilibrul energetic (Shang et al., 2021) și pot produce alterări patologice la nivel celular și tisular (von Moos et al., 2012). O cantitate insuficientă de hrană poate agrava efectele negative ale microplasticelor asupra mecanismelor de apărare ale midiilor, ceea ce ar putea avea un impact asupra supraviețuirii și rezistenței midiilor în condiții de hrană limitată, cum ar fi iarna, și în habitatele costiere poluate (Shang et al., 2021). Shang et al. (2021) au arătat că expunerea la microplastice și lipsa hranei au dus la o scădere semnificativă a forței de aderență a midiilor și a numărului de fire de bisus produse.

X. BIOAUMULAREA CONTAMINANȚILOR ȘI RĂSPUNSUL CELULAR AL MIDIILOR: STABILITATEA MEMBRANEI LIZOZOMALE

10. 2. Material și metode

Zona de studiu și procedura de prelevare

Patru evaluarea stabilității membranei lizozomale a midiilor au fost realizate patru expediții de prelevare de-a lungul litoralului românesc al Mării Negre, în luna iulie 2022. Probele au fost colectate din patru locații (Port Midia, Golful Mamaia – Pescărie, Portul Constanța, Portul Mangalia), alese pe baza eligibilității lor pentru evaluarea efectelor biologice ale expunerii la diverși contaminanți antropici asociați zonelor urbane și porturilor.

Temperatura apei de mare a fost înregistrată *in situ* la fiecare prelevare cu un termometru tehnic din sticlă calibrat (Termodensirom). Au fost prelevate probe de apă de mare pentru analize de laborator ulterioare ale factorilor abiotici (salinitate, pH, oxigen dizolvat) și ale contaminanților, cum ar fi hidrocarburi petroliere totale (HPT), hidrocarburi aromatice policiclice (PAHs), pesticide organoclorurate (OCPs), bifenili policlorurați (PCBs) și metale grele (MG). Apa de mare și biota (*M. galloprovincialis*) au fost prelevate simultan din fiecare locație.

Cincisprezece midii au fost selectate pentru testul de stabilitate al membranei lizozomale a midiilor din fiecare locație (60 de exemplare în total) cu un interval de lungime de 4–6 cm și, adițional, 20–25 de midii pentru analiza chimică.

Date de mediu și analize chimice

Salinitatea și pH-ul au fost măsurate în laborator folosind sonda multiparametrică Mettler Toledo S479. Oxigenul dizolvat (OD) a fost determinat prin metoda Winkler, în conformitate cu metoda recomandată de Grasshoff et al. (1999). Șaisprezece hidrocarburi aromatice policiclice, nouă pesticide organoclorurate și șapte

bifenili policlorurați au fost investigate în apa de mare și în țesutul de midiilor. Determinarea poluanților organici din midii și apa marină s-a realizat conform unor metode standardizate (IAEA-MEL, 1995). Extracția poluanților organici și persistenți din țesutul de midii s-a realizat din 2 g de țesut uscat folosindu-se solvenți de puritate gascromatografică. Concentrațiile de metale grele din apa de mare au fost determinate prin spectrometrie cu absorbție atomică, folosind metode standard (IAEA-MEL, 1999; Grasshoff et al., 1999).

Evaluarea stabilității membranei lizozomale

Stabilitatea membranei lizozomale a fost evaluată prin testul timpului de retenție al roșului neutru (TRRN; min) în hemocitele de midiilor, conform metodei citochimice *in vivo* descrise de Martínez-Gómez et al. (2015). Principiul acestui test se bazează pe capacitatea lizozomilor sănătoși de a reține colorantul mai mult timp decât cei afectați; deteriorarea lizozomală poate cauza scurgerea colorantului NR în citosol, putând duce la moartea celulară (Viarengo et al., 2007). TRRN a fost evaluat în raport cu criteriile de evaluare de fond (Background Assessment Criteria, BAC) și criteriile de evaluare a mediului (Environmental Assessment Criteria, EAC) (Martínez-Gómez et al., 2015).

Analiza datelor

Datele au fost testate privind distribuția normală (testul Shapiro-Wilk) și omogenitate a varianțelor (testul Levene). A fost aplicat testul neparametric Kruskal-Wallis, urmat de testul post hoc Dunn. Nivelul de semnificație al rezultatelor statistice a fost stabilit la $p < 0,05$. De asemenea, a fost utilizată și Analiza statistică multivariată (Analiza Componentelor Principale, ACP).

10. 3. Rezultate și discuții

Rezultatele prezentate în acest capitol au fost publicate în Pantea et al. (2023).

Concentrațiile poluanților organici din țesuturi sunt prezentate în Figura 24. Concentrațiile de Σ PAH-uri în midii au fost scăzute și au variat între 1,57 și 2,26 $\mu\text{g/kg g.us.}$; valoarea maximă fiind înregistrată în Golful Mamaia - Pescărie. Bioacumularea Σ OCP și Σ PCB în midii a fost excepțional de ridicată în toate locațiile de prelevare. Cel mai ridicat nivel de Σ OCP (3952,39 $\mu\text{g/kg g.us.}$) și Σ PCB (8450,46 $\mu\text{g/kg g.us.}$) a fost măsurat în Portul Midia.

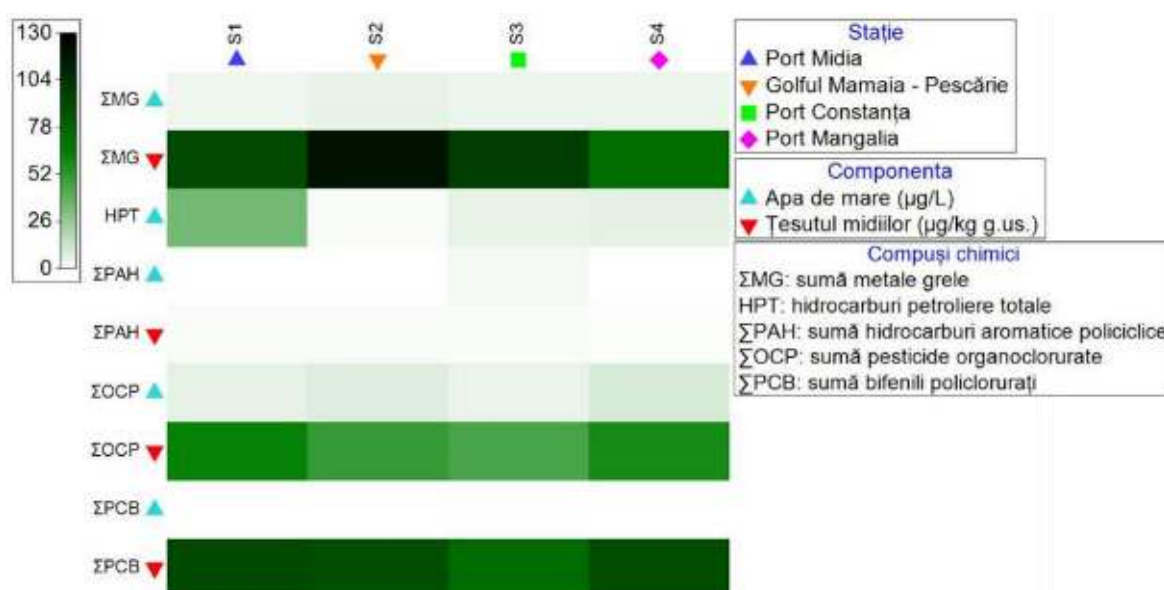


Fig. 24. Concentrațiile de contaminanți în apa de mare și în țesuturi midiilor din stațiile de prelevare. Datele sunt exprimate ca valori medii transformate la rădăcină pătrată ($\sqrt{}$)

Cea mai mare valoare medie (medie $\pm$ dev.std.) a TRRN a fost detectată în Golful Mamaia - Pescărie ($34 \pm 18,34$ min). Midiile din Portul Constanța ($11 \pm 10,56$ min), Portul Mangalia ($12 \pm 10,14$ min) și Portul Midia ($14 \pm 10,56$ min) au prezentat o capacitate extrem de redusă de a reține colorantul (Fig. 25).

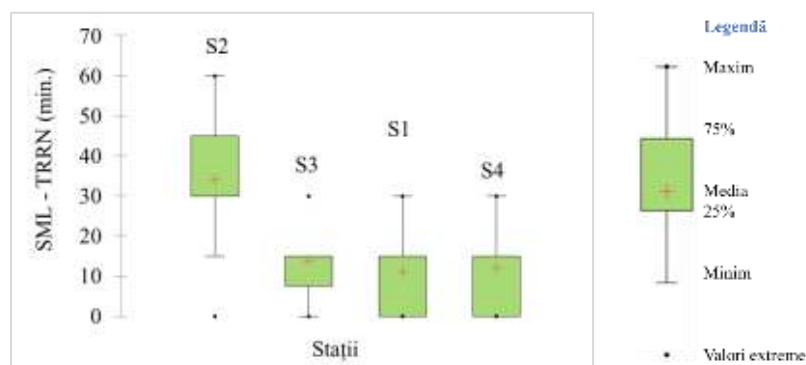


Fig. 25. Diagrama Box-whisker a stabilității membranei lizozomale (SML) în hemocitele midiilor, evaluată prin timpul de retenție al roșului neutru (TRRN). S1: Port Midia; S2: Golful Mamaia - Pescărie; S3: Port Constanța; S4: Port Mangalia

Cea mai mare valoare medie a stabilității lizozomale a midiilor ($49,16 \pm 11,13\%$) a fost observată în Golful Mamaia – Pescărie și cea mai mică ($30,67 \pm 6,96\%$) în Portul Midia. În general, un grad ridicat de deteriorare lizozomală a fost observat la toate speciile analizate (Fig. 26).

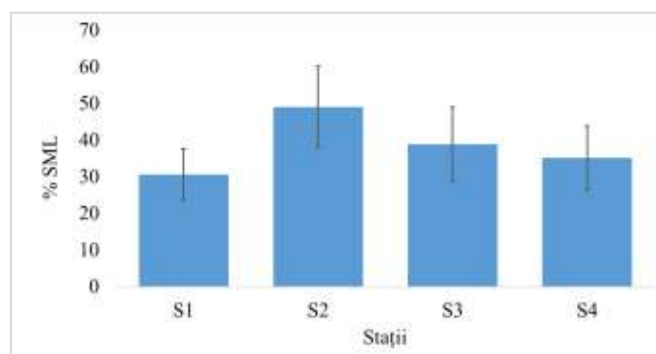


Fig. 26. Media procentului de deteriorare lizozomală (% LMS $\pm$ dev. std.) în hemocitele de midii. SML: stabilitatea membranei lizozomale. S1: Port Midia; S2: Golful Mamaia - Pescărie; S3: Port Constanța; S4: Port Mangalia

Testul Shapiro-Wilk a arătat că datele privind timpul de retenție au deviat semnificativ de la o distribuție normală ($W_{(59)} = 0,823$; $p = 0,0001$). Omogenitatea varianțelor (testul Levene) a arătat că nu există diferențe între varianțe ($F_{(3, 56)} = 2,76$; $p = 0,108$). Pe baza acestui rezultat, datele au fost testate pentru a vedea diferențele dintre locații utilizând testul neparametric Kruskal-Wallis. Rezultatele testului au arătat diferențe semnificative între TRRN al midiilor în ceea ce privește locația de prelevare ($p = 0,0003$). Testul post hoc Dunn a arătat diferențe semnificative din punct de vedere statistic între stațiile Mamaia – Pescărie și porturi: Port Midia ($p = 0,002$), Port Constanța ($p = 0,001$) și Port Mangalia ($p = 0,001$).

Pentru a examina asocierile dintre TRRN și contaminanții bioacumulați în țesutul midiilor, poluanții organici (Σ PAH, Σ OCP și Σ PCB), metalele grele (Ni, Cu, Pb, Co, Cd și Cr), dar și TRRN în lizozomi au fost incluși în analize multivariate. ACP a arătat că PC1 și PC2 au explicat 98,24% din variația totală a matricei de date (Fig. 27). PC1 a explicat 76,93% și PC2 21,31% din variabilitatea datelor. Valorile proprii ale primele două componente principale au fost 7,69 (PC1) și 2,13 (PC2). PC1 a fost caracterizat în principal de contribuția pozitivă

a variabilelor Cu (0,97), Pb (0,97), Ni (0,97), Co (0,97), Σ PAH (0,97) și NRRT (0,89) și de contribuția negativă a variabilelor Σ OCP (−0,77) și Σ PCB (−0,77). PC2 a fost reprezentată în principal de contribuții pozitive, în special încărcările variabilelor Cd (0,77), Σ OCP (0,63) și Σ PCB (0,63), și de contribuția negativă a variabilei Cr (−0,63).

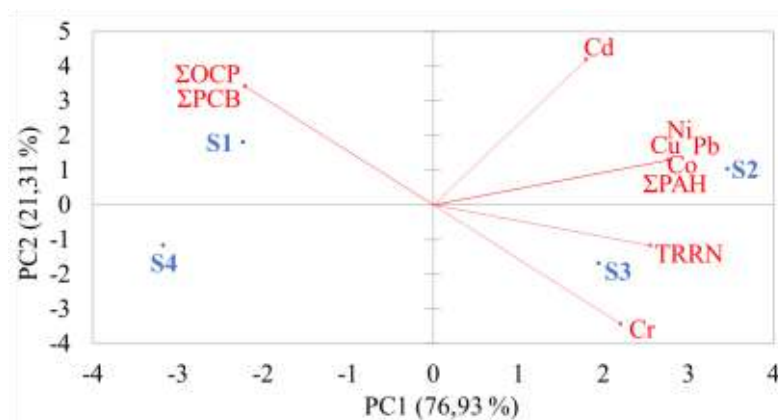


Fig. 27. Analiza componentelor principale (ACP) a contaminanților bioacumulați în țesutul midiilor și a timpului de retenție al roșului neutru (TRRN). Cu: cupru; Cd: cadmiu; Pb: plumb; Ni: nichel; Cr: crom; Co: cobalt; Σ PAH: suma hidrocarburilor aromatice policiclice; Σ OCP: suma pesticidelor organoclorurate; Σ PCB: suma bifenililor policlorurați. S1: Port Midia; S2: Golful Mamaia - Pescărie; S3: Port Constanța; S4: Port Mangalia

Conform unui studiu anterior, concentrațiile de OCP-uri și PCB-uri în apele marine au arătat o tendință de scădere în ultimii ani (Oros et al., 2016). În schimb, concentrații foarte ridicate de OCP și PCB au fost măsurate în apele costiere în studiul nostru, în principal în Portul Mangalia și Golful Mamaia - Pescărie. Concentrațiile de lindan, heptaclor, pesticide ciclodiene (aldrin, dieldrin, endrin și DDT (p,p 'DDT, p,p 'DDE, p,p 'DDD) au depășit în toate stațiile de prelevare valoarea MAC în conformitate cu legislația europeană (Uniunea Europeană, 2013),. O explicație pentru aceste rezultate ar putea fi faptul că stațiile de prelevare a probelor se aflau în apropierea unor surse de poluare, cum ar fi stațiile de tratarea a apelor uzate urbane, aportul de apă dulce potențial poluată și trafic maritim intens. Concentrațiile de metale grele au fost sub standardele de calitate a mediului (Environmental Quality Standards, EQS) pentru apele marine europene (Uniunea Europeană, 2013) în toate locațiile de prelevare.

În conformitate cu criteriile de evaluare stabilite pentru testul de retenție cu roșu neutru (Martínez-Gómez et al., 2015), niciunul dintre grupurile de midii din acest studiu nu au indicat o stare bună de sănătate (TRRN $\geq$ 120 min). Midiile din toate stațiile au putut fi evaluate ca fiind sever stresate (TRRN < 50 min) și prezentând patologii (de exemplu, mărirea lizozomilor, scurgerea lichidului intralizozomal, celule fragmentate rotunjite), așa cum au fost descrise de Viarengo et al. (2007).

Stabilitatea membranei lizozomale scăzută, observată în toate locațiile de prelevare a probelor, ar putea fi legată în principal de nivelurile mai ridicate de OCP-uri și PCB-uri. Expunerea la un amestec divers de substanțe chimice în mediu sporește efectele toxice (Moore et al., 2018). În acest studiu, efectele asupra SML au fost observate chiar și la concentrații scăzute ale unor poluanți, sugerând că complexitatea amestecurilor de contaminanți a avut un efect toxic mai mare, indiferent de concentrațiile individuale ale poluanților. Stabilitatea lizozomală scăzută observată în acest studiu a fost similară cu cea observată în alte studii efectuate la litoralul românesc al Mării Negre pe *M. galloprovincialis* (Ciocan, 1997).

CONCLUZII

Din analiza datelor obținute în prezenta teză de doctorat, se pot formula aprecieri, comentarii, concluzii și recomandări:

- ✚ Indicele de stare al speciei *Mytilus galloprovincialis* a prezentat o variație sezonieră semnificativă, fiind influențat în principal de variația temperaturii, a suspensiilor solide și a clorofilei *a*. Valoarea cea mai ridicată a indicelui s-a înregistrat în primăvară, ceea ce a coincis cu valorile maxime ale clorofilei *a*.
- ✚ Condițiile de mediu din zonele portuare au părut mai favorabile creșterii speciei *M. galloprovincialis* datorită condițiilor trofice mai ridicate, după cum demonstrează rezultatele parametrilor biometrici și ai indicelui de stare. În zona de referință, indicele de stare a fost semnificativ mai redus comparativ cu porturile ca urmare a condițiilor trofice mai reduse.
- ✚ Disponibilitatea crescută a hranei a influențat pozitiv condiția fiziologică a midiilor, ceea ce a dus la creșterea valorilor indicelui de stare și la acumularea de rezerve, în principal sub formă de proteine, glucide și lipide. Midiile din zona de referință (2 Mai), cu disponibilitate scăzută de hrană, au prezentat o condiție fiziologică suboptimală și rezerve energetice scăzute.
- ✚ Ciclul sezonier al midiilor *M. galloprovincialis* de la litoralul românesc al Mării Negre este marcat de faze de acumulare și epuizare a rezervelor, reflectând dezvoltarea gonadală și disponibilitatea hranei.
- ✚ Dinamica și distribuția metalelor grele în apele și sedimentele costiere au prezentat variații temporare și spațiale semnificative, sub influența contribuțiilor naturale și antropogene.
- ✚ Depășiri ale standardelor de calitate a apei pentru apele marine au fost observate doar în cazul cadmiului, în timp ce cuprul, cadmiul, plumbul, nichelul și cromul au prezentat concentrații sub limitele prevăzute. În general, cele mai mari concentrații de metale în apă au fost înregistrate în zona de referință (2 Mai), în special în sezonul de primăvară.
- ✚ Cele mai contaminate sedimente cu metale grele au fost identificate în incintele porturilor, înregistrându-se depășiri ale standardelor de calitate pentru sedimentele marine pentru majoritatea metalelor analizate și anume, cupru cadmiu, plumb și nichel, demonstrând influența factorilor antropogeni.
- ✚ În general, cea mai mare bioacumulare a metalelor grele în midii a fost observată în cazul midiilor colectate din incinta porturilor maritime, cele mai ridicate valori fiind înregistrate în sezonul de vară. Tendința de bioacumulare a metalelor grele a fost mai ridicată în porturi ca urmare a biodisponibilității mai mari a metalelor în aceste zone.
- ✚ Factorul de bioacumulare (FAB) apă-organism al metalelor grele, a indicat tendințe mari de bioacumulare ale cuprului, cadmiului, nichelului și cromului și mai puțin a plumbului, ca urmare a gradului ridicat de biodisponibilitate a acestora în coloana de apă.
- ✚ Factorul de acumulare biotă-sediment (FABS) al metalelor grele a fost mai ridicat pentru cupru și cadmiu, și mai puțin pentru plumb, nichel și crom, demonstrându-se o disponibilitate mai redusă a acestora pentru midii.
- ✚ Indicele de bioacumulare al mediei individuale a multimetalelor (IMBI) a indicat un grad ridicat de bioacumulare al metalelor grele în incintele portuare, în special pentru cupru, cadmiu și nichel, și unul moderat în zona de referință.
- ✚ Evaluarea indicelui de poluare cu metale (IPM) a indicat un nivel foarte ridicat de contaminare al midiilor în Portul Midia și Portul Constanța, o contaminare moderată în Portul Mangalia și o contaminare ridicată în zona de referință 2 Mai.

- ✚ Relația dintre indicii de stare și gradul de bioacumulare al metalelor grele a fost invers proporțională, situație vizibilă în special în sezonul de primăvară și vară.
- ✚ Midiile au evidențiat o capacitate ridicată de bioacumulare a microplasticelor în țesuturi, rezultatele obținute fiind mult mai ridicate în comparație cu alte zone ale Mării Negre, dar similare cu un studiu realizat la litoralul românesc în apropierea zonelor portuare.
- ✚ Cantitatea ridicată de microplastice ingerate a fost influențată de proximitatea surselor de poluare (stațiile de tratare ale apei) dar și de substratul de fixare al midiilor.
- ✚ Peste 90% din cantitatea de microplastice ingerate de midii au fost reprezentate de microfibre, urmate de fragmente, ceea ce a indicat gradul ridicat de contaminare cu microplastice microfibre ale zonelor investigate.
- ✚ Rezultatele au arătat că cea mai mare cantitate de microplastice ingerate au avut dimensiuni foarte mici (sub 1 mm), ceea ce prezintă un pericol mai ridicat pentru starea de sănătate a midiilor datorită faptului că dimensiunea acestora le permite bioacumularea mai rapidă în țesuturi.
- ✚ În general, cantitatea cea mai mare de microplastice a fost identificată la midiile de dimensiuni mici, datorită ratelor de filtrare mai ridicate, dar și în cazul midiilor foarte mari ca urmare a suprafeței branhiale mai mari care oferă o expunere mai ridicată.
- ✚ Disponibilitatea mai redusă a hranei ar putea induce o sensibilitate mai mare a midiilor la expunerea la microplastice. Pentru a putea explora posibilele efecte negative, studiile ulterioare ar trebui să se concentreze pe evaluarea efectelor subletale, manifestate la nivel celular și tisular.
- ✚ Deși prezentul studiu nu a demonstrat o dovadă evidentă că microplasticele au un efect direct asupra indicelui de stare al midiilor, conform rezultatelor numeroaselor studii realizate acestea pot avea un efect semnificativ asupra stării de sănătate a midiilor.
- ✚ Disponibilitatea mai mare de hrană și rezervele acumulate oferă midiilor suficientă energie pentru a rezista condițiilor stresante, chiar și în medii puternic afectate de activitățile umane, cum ar fi porturile.
- ✚ Acest studiu subliniază importanța monitorizării schimbărilor atât în componentele abiotice, cât și biotice, ale ecosistemului pentru a înțelege impactul potențial asupra populațiilor de midii, oferind informații valoroase pentru gestionarea resurselor.
- ✚ Midiile din toate locațiile de prelevare au prezentat condiții de stres sever, indicând prezența unor patologii. Valoarea scăzută a stabilității membranei lizozomale a midiilor a fost asociată în principal cu niveluri mai ridicate de OCP-uri și PCB-uri, sugerând efectele toxice ale amestecurilor de contaminanți.
- ✚ Acest studiu a demonstrat utilitatea stabilității membranei lizozomale (SML) ca biomarker al stresului celular al midiilor la expunerea la contaminanți.
- ✚ Acest studiu oferă informații importante cu privire la nivelurile de contaminare și răspunsurile celulare ale midiilor marine de pe coasta românească a Mării Negre. Complexitatea amestecurilor de contaminanți din mediu poate avea un impact mai mare asupra stabilității lizozomale decât concentrațiile individuale de poluanți.
- ✚ Rezultatele evidențiază necesitatea aplicării unei serii complete de biomarkeri pentru a evalua impactul ecotoxicologic al expunerii la contaminanți în mediul marin.
- ✚ Cercetările viitoare ar trebui să investigheze mecanismele care stau la baza deteriorării lizozomale și să exploreze biomarkeri suplimentari care să ofere o perspectivă mai profundă asupra stării de sănătate a organismelor marine expuse la contaminanți.

Originalitatea acestei teze de doctorat, constă în faptul că subliniază importanța monitorizării schimbărilor atât în componentele abiotice, cât și biotice, ale ecosistemului pentru a înțelege impactul potențial asupra populațiilor de midii, oferind informații valoroase pentru gestionarea resurselor. Acest studiu a demonstrat utilitatea stabilității membranei lizozomale (SML) ca biomarker al stresului celular al midiilor la expunerea la contaminanți.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Abderrahmani, K., Boulahdid, M., Bendou, N., Aissani, A. Seasonal distribution of cadmium, lead, nickel, and magnesium in several tissues of mussels from the Algerian coasts. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 27, 22547–22567 (2020).
2. Androutsopoulos, V.P., Hernandez, A.F., Liesivuori, J., Tsatsakis, A.M. A mechanistic overview of health associated effects of low levels of organochlorine and organophosphorous pesticides. *Toxicology*, 307, 89–94 (2013).
3. AOAC. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 15th. ed. Heldrich, K. (Ed.). Arlington, VA: Author, pp. 1298 (1990).
4. Barrows, A.P., Neumann, C.A., Pieper, C., Berger, M.L., Shaw, S.D. Guide to Microplastics Identification, a Comprehensive Methods Guide for Microplastics Identification and Quantification in the Laboratory. Marine & Environmental Research Institute, Blue Hill, ME, pp. 13 (2017).
5. Baussant, T., Sanni, S., Skadsheim, A., Jonsson, G., Børseth, J. F., Gaudebert, B. Bioaccumulation of polycyclic aromatic compounds: 2. Modeling bioaccumulation in marine organisms chronically exposed to dispersed oil. *Environ. Toxicol. Chem.*, 20(6), 1185–1195 (2001).
6. Bayne, B.L., Newell, R.C. Physiological energetic of marine mollusks. In: The Mollusca, Saleudin A.S.M. and Wilbur K.M (Eds), vol. IV, Academic Press, New York, pp. 407–515 (1983).
7. Bayne, B.L., Iglesias, J.I.P., Hawkins, A.J.S., Navarro, E., Heral, M., Deslous-Paoli, J.M. Feeding behaviour of the mussel, *Mytilus edulis*: responses to variations in quantity and organic content of the seston. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.*, 73(4), 813–829 (1993).
8. Beninger, P.G., Lucas, A. Seasonal variations in condition, reproductive activity, and gross biochemical composition of two species of adult clam reared in a common habitat: *Tapes decussatus* L. (Jeffreys) and *Tapes philippinarum* (Adams & Reeve). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 79, 19–37 (1984).
9. Beyer, J., Green, N.W., Brooks, S., Allan, I.J., Ruus, A., Gomes, T., Bråte, I.L.N., Schøyen, M. Blue mussels (*Mytilus edulis* spp.) as sentinel organisms in coastal pollution monitoring: A review. *Mar. Environ. Res.*, 130, 338–365 (2017).
10. Boudjema, K., Badis, A., Moulai-Mostefa, N. Study of heavy metal bioaccumulation in *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck 1819) from heavy metal mixture using the CCF design. *Environ. Technol. Innov.*, 25, 102202 (2022).
11. Çelik, M.Y., Karayücel, S., Karayücel, I., Öztürk, R., Eyüboğlu, B. Meat yield, condition index, and biochemical composition of mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819) in Sinop, South of the Black Sea. *J. Aquat. Food Prod. Technol.*, 21(3), 198–205 (2012).
12. Ciocan, C., *Mytilus galloprovincialis* Lmk. Lysosomal membrane stability; a biomarker of marine pollution. *Cercet. Mar.*, IRCM, 29–30, 191–199 (1997b).

13. Cole, M., Lindeque, P., Halsband, C., Galloway, T.S. Microplastics as contaminants in the marine environment: a review. *Mar Poll Bull*, 62(12), 2588–2597 (2011).
14. Coyle, R., Hardiman, G., O'Driscoll, K. Microplastics in the marine environment: A review of their sources, distribution processes and uptake into ecosystems. *Case Stud. Chem. Environ. Eng.*, 2, 100010 (2020).
15. Dailianis, S. Environmental impact of anthropogenic activities: the use of mussels as a reliable tool for monitoring marine pollution. In: *Mussels: Anatomy, Habitat and Environmental Impact*, Lauren E. McGevin, L.E. (Ed.), pp. 1–30 (2010).
16. Davenport, J., Chen, X. A comparison of methods for the assessment of condition in the mussel (*Mytilus galloprovincialis*). *J. Moll. Stud.*, 53, 293–297 (1987).
17. Depledge, M.H. The rational basis for the use of biomarkers as ecotoxicological tools. In: *Nondestructive Biomarkers in Vertebrates*, Fossi. M.C., Leonzio, C. (Eds.), Boca Raton: Lewis Publishers, pp. 261–285 (1993).
18. Edler, L., Elbrächter, M. The Utermöhl method for quantitative phytoplankton analysis. – In: Karlson, B. et al. (Eds.), *Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis: 13–20*. Intergovernmental Oceanographic Commission Manuals and Guides 55. UNESCO, Paris, 114 pp. (2010).
19. Freitas, L., Fernández-Reiriz, M.J., Labarta, U. Biochemical composition and energy content of the mussel *Mytilus galloprovincialis* of subtidal and rocky shore origin: Influence of environmental variables and source of mussel seed. *Cienc. Mar.*, 29, 603–619 (2003).
20. Gedik, K., Eryaşar, A.R. Microplastic pollution profile of Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*) collected along the Turkish coasts. *Chemosphere*, 260, 127570 (2020).
21. Georgieva, S., Stancheva, M., Makedonski, L. Investigation about the presence of organochlorine pollutants in mussels from the Black Sea, Bulgaria. *Ovidius University Annals of Chemistry*, 27(1), 8–12 (2016).
22. Gobas, F.A.P.A., Morrison, H.A., Bioconcentration and biomagnification in the aquatic environment. In: *Handbook of Property Estimation Methods for Chemicals*. Boethling, R.S., Macay, D. (Eds.), Lewis Publishers, Boca Raton, FL, pp. 189–231 (2000).
23. Grasshoff, K., Kremling, K., Ehrhardt, M. *Methods of Seawater Analysis*. 3rd Edition. Wiley-VCH, Weinheim, Germany, pp. 632 (1999).
24. IAEA–MEL. *Manual for the Measurement of Organochlorine and Petroleum Hydrocarbons in Environmental Samples*; International Atomic Energy Agency–Marine Environmental Laboratory: Monaco (1995).
25. IAEA–MEL. *Manual for the Measurement of Heavy Metals in Environmental Samples*; International Atomic Energy Agency–Marine Environmental Laboratory: Monaco (1999).
26. Lazăr, L., Boicenco, L., Denga, Y. (Eds.). *Anthropogenic Pressures and Impacts on the Black Sea Coastal Ecosystem*. CD Press: Bucharest, Romania, pp. 18–56 (2021).
27. Li, J., Yang, D., Li, L., Jabeen, K., Shi, H., Microplastics in commercial bivalves from China. *Environ. Pollut.*, 207, 190–195 (2015).
28. Livingstone, D.R. Organic xenobiotic metabolism in marine invertebrates. In: *Advances in Comparative and Environmental Physiology*. R. Gilles (Ed.), Berlin, Springer-Verlag, Vol. VII, pp. 45–185 (1991).

29. Lok, A., Metin, G., Acarli, S., Goulletquer, P. Harmful Algal Blooms (HABs) and Black Mussel *Mytilus galloprovincialis* (Linnaeus, 1758) Culture in Izmir Bay (Iskele-Urla)-Turkey: Preliminary Results on the Annual Feeding Cycle Using a Qualitative Approach. *Turk. J. Fish. Aquat. Sci.*, 10, 527–536 (2010).
30. Lucas, A., Beninger, P.G. The use of physiological condition indexes in marine bivalve aquaculture. *Aquaculture*, 44(3), 187–200 (1985).
31. Martínez-Gómez, C., Bignell, J., Lowe, D. (Eds.). Lysosomal Membrane Stability in Mussels; ICES Techniques in Marine Environmental Sciences; International Council for the Exploration of the Sea (ICES): Copenhagen, Denmark, Vol. 56, pp. 41 (2015).
32. Mathalon, A., Hill, P. Microplastic fibers in the intertidal ecosystem surrounding Halifax Harbor Nova Scotia. *Mar. Pollut. Bull.*, 81(1), 69–79 (2014).
33. Mendoza, D., Grace, M., Mendoza, G. Shell Dimension-Weight Relationship and Condition Index of the Invasive Mussel *Mytella strigata* in Sasmuan, Pampanga, Philippines. *Philipp. J. Fish.*, 30(1), 97–106 (2023).
34. Miloloža, M., Kučić Grgić, D., Bolanča, T., Ukić, Š., Cvetnić, M., Ocelić Bulatović, V., Dionysiou, D.D., Kušić, H. Ecotoxicological Assessment of Microplastics in Freshwater Sources – A Review. *Water*, 13(1), 56 (2021).
35. Moore, M.N., Wedderburn, R.J., Clarke, K.R., McFadzen, I.R.B., Lowe, D.M., Readman, J.W. Emergent synergistic lysosomal toxicity of chemical mixtures in molluscan blood cells (hemocytes). *Environ. Pollut.*, 235, 1006–1014 (2018).
36. Moschino V., Rizzo G., Marceta T., Cernigai F., Masiero L., Da Ros L., Marin M.G. Biochemical composition and reproductive cycle of the clam *Chamelea gallina* in the Northern Adriatic Sea: an after-10-year comparison of patterns and changes. *Front. Mar. Sci.*, 10, 1158327 (2023).
37. Orban, E., Di Lena, G., Navigato, T., Casini, I., Marzetti, A., Caproni, R. Seasonal changes in meat content, condition index and chemical composition of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) cultured in two different Italian sites. *Food Chem.*, 77 (1), 57–65. (2002).
38. Oros, A., Lazăr, L., Coatu, V., Țigănuș, D. Recent Data from Pollution Monitoring and Assessment of The Romanian Black Sea Ecosystem, Within Implementation of The European Marine Strategy Framework Directive. In: Marine and Ocean Ecosystem, Proceedings of the 16th International Multidisciplinary Scientific GeoConference (SGEM 2016), Albena, Bulgaria, 30 June–6 July 2016; Curran Associates, Inc.: New York, NY, USA; Book 3, Vol. 2, pp. 821–828 (2016).
39. **Pantea, E.-D.**, Roșioru, D.M., Roșoiu, N. Condition Index Analysis of mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) from the Romanian Black Sea Coast. *Academy of Romanian Scientists Annals, Series on Biological Sciences*, 7(2), 112–120 (2018).
40. **Pantea, E.-D.**, Andra Oros, Daniela Mariana Roșioru, Natalia Roșoiu. Condition Index of Mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) as a Physiological Indicator of Heavy Metals Contamination. *Academy of Romanian Scientists Annals, Series on Biological Sciences*, 9(1), 20–36 (2020).
41. **Pantea, E.-D.**, Coatu, V., Damir, N. A., Oros, A., Lazar, L., Rosoiu, N. Lysosomal Membrane Stability of Mussel (*Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819) as a Biomarker of Cellular Stress for Environmental Contamination. *Toxics*, 11(8), 649 (2023).

42. **Pantea, E.-D.**, Roşioru, D.M., Roşoiu, N. Food availability on influence mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) on physiological and biochemical status. *Academy of Romanian Scientists Annals, Series on Biological Sciences*, 13(1), 7–23 (2024).
43. Peters, E.C., Gassman, N.J., Firman, J.C., Richmond, R.H., Power, E.A. Ecotoxicology of tropical marine ecosystems. *Environ Toxicol Chem.*, 16, 2–40 (1997).
44. Pipe, R.K. The generation of reactive oxygen metabolites by the haemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. *Dev. Comp. Immunol.*, 16, 111–122 (1993).
45. Pojar, I., Dobre, O., Baboş, T., Lazăr, C. Quantitative Microfiber evaluation in *Mytilus galloprovincialis*, western Black Sea, Romania. *Geo-Eco-Marina*, 28, 65–71 (2022).
46. Qu, X., Su, L., Li, H., Liang, M., Shi, H. Assessing the relationship between the abundance and properties of microplastics in water and in mussels. *Sci. Total Environ.*, 621, 679–686 (2018).
47. Rainer, J.S., Mann, R. A comparison of methods for calculating condition index in eastern oysters *Crassostrea virginica* (Gmelin). *J. Shellfish Res.*, 11 (1), 55–58 (1992).
48. Razet, D., Faury, N., Geairon, P., Soletchnik, P., Goulletquer, P. Les Notes Techniques de l'URAPC–NT/URAPC/96–01–02–03, IFREMER, p. 45 (1996).
49. Rouane-Hacene, O., Boutiba, Z., Belhaouari, B., Guibbolini–Sabatier, M.E., Francour, P., Risso-de Faverney, C. Seasonal assessment of biological indices, bioaccumulation and bioavailability of heavy metals in mussels *Mytilus galloprovincialis* from Algerian west coast, applied to environmental monitoring. *Oceanologia*, 57(4), 362–374 (2015).
50. Sahin, C., Duzgunes, E., Okumus, I. Seasonal Variations in Condition Index and Gonadal Development of the Introduced Blood Cockle *Anadara inaequalis* (Bruguiere, 1789) in the Southeastern Black Sea Coast Introduction. *Turkish J Fish Aquat Sci.*, 6, 155–163 (2006).
51. Sangkham, S., Faikhaw, O., Munkong, N., Sakunkoo, P., Arunlertaree, C., Chavali, M., Mousazadeh, M., Tiwari, A. A review on microplastics and nanoplastics in the environment: Their occurrence, exposure routes, toxic studies, and potential effects on human health. *Mar. Pollut. Bull.*, 181, 113832 (2022).
52. SCOR–UNESCO. Determination of photosynthetic pigments in seawater. Monographs on oceanographic methodology, pp. 69 (1966).
53. Sendra, M., Sparaventi, E., Novoa, B., Figueras, A. An overview of the internalization and effects of microplastics and nanoplastics as pollutants of emerging concern in bivalves. *Sci. Total Environ.*, 753, 142024 (2021).
54. Shang, Y., Gu, H., Li, S., Chang, X., Sokolova, I., Fang, J. K. H., Wei, S., Chen, X., Hu, M., Huang, W., Wang, Y. Microplastics and food shortage impair the byssal attachment of thick-shelled mussel *Mytilus coruscus*. *Mar. Environ. Res.*, 171, 105455 (2021).
55. Skolka, M. Zoologia nevertebratelor. Ovidius University Press, Constanța, vol. I–II, pp. 290–299 (2003).
56. Srogi, K. Levels and congener distributions of PCDDs, PCDFs and dioxin-like PCBs in environmental and human samples: A review. *Environ. Chem. Lett.*, 6, 1–28 (2008).
57. Strohmeier, T., Duinker, A., Strand, Ø., Aure, J. Temporal and spatial variation in food availability and meat ratio in a longline mussel farm (*Mytilus edulis*). *Aquaculture*, 276, 83–90 (2008).
58. Sussarellu, R., Suquet, M., Thomas, Y., Lambert, C., Fabioux, C., Pernet, M. E., Le Goïc, N., Quillien, V., Mingant, C., Epelboin, Y., Corporeau, C., Guyomarch, J., Robbens, J., Paul–Pont, I., Soudant, P., Huvet,

- A. Oyster reproduction is affected by exposure to polystyrene microplastics. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113(9), 2430–2435 (2016).
59. UNEP. Contaminant monitoring programmes using marine organisms: quality assurance and good laboratory practice. *Reference Methods for Marine Pollution Studies*, 57, 1–23 (1990).
 60. UNEP, Guidelines for monitoring chemical contaminants in the sea using marine (1993).
 61. UNEP. Manual for the geochemical analyses of marine sediments and suspended particulate matter. *Reference Methods for Marine Pollution Studies*, 63, 1–73 (1995).
 62. Uniunea Europeană. Directiva 2013/39/UE a Parlamentului European și a Consiliului de modificare a Directivelor 2000/60/CE și 2008/105/CE în ceea ce privește substanțele prioritare în domeniul politicii apei. *Off. J. Eur. Union* 2013, L226/1, 1–17 (2013).
 63. Viarengo, A., Lowe, D., Bolognesi, C., Fabbri, E., Koehler, A. The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.*, 146, 281–300 (2007).
 64. von Moos, N., Burkhardt-Holm, P., Köhler, A. Uptake and effects of microplastics on cells and tissue of the blue mussel *Mytilus edulis* L. after an experimental exposure. *Environ. Sci. Technol.*, 46(20), 11327–11335 (2012).
 65. Weis, J.S. *Physiological, Developmental and Behavioral Effects of Marine Pollution*. Springer Science & Business Media, pp. 454 (2014).
 66. Windows, J., Donkin, P. Mussels and environmental contaminants bioaccumulation and physiological aspects. In: *The Mussel Mytilus: Ecology, Physiology, Genetics and Culture*. Gosling, E.M. (Ed.), Elsevier, Amsterdam, pp. 383–417 (1992).
 67. Wu, X., Cobbina, S.J., Mao, G., Xu, H., Zhang, Z., Yang, L. A review of toxicity and mechanisms of individual and mixtures of heavy metals in the environment. *Environ Sci Pollut Res.*, 23, 8244–8259 (2016).