

O ABORDARE METODOLOGICĂ
INTEGRATIVĂ PENTRU
MONITORIZAREA ȚESTOASEI
DOBROGENE (*TESTUDO GRAECA*)

RAPORT FINAL PROIECT AOSR TEAMS 2023-2024



ÎNTOCMIT:
DR. STĂNESCU FLORINA
DR. VLAD SABINA ELENA



DECEMBRIE 2024
CONSTANȚA

RAPORT FINAL

1. Titlul proiectului: O abordare metodologică integrativă pentru monitorizarea țestoasei dobrogene (*Testudo graeca*)

1.1. Domeniul științific: Științe biologice

1.2. Echipa:

Director de proiect: Dr. Stănescu Florina

Membru: Dr. Iosif Ruben

Membru: Dr. Vlad Sabina Elena

Colaboratori: Prof. Dr. Christensen-Dalsgaard Jakob, Prof. Dr. Cogălniceanu Dan, Dr. Székely Diana, Dr. Chergui Brahim, Drd. Drăgan Ana Maria, MSc. Tănase Teodora.

2. Scop și obiective

Proiectul de față și-a propus integrarea metodelor clasice și moderne cu **scopul** de a îmbunătăți programele de monitorizare pe termen lung și conservarea țestoasei dobrogene (*Testudo graeca*) (**Figura 1**).

Ne-am propus următoarele două obiective:

O.1. Calibrarea metodelor moderne (capturare-marcare-recapturare prin foto-identificare) cu cele clasice (sclerocronologia) folosite în monitorizarea dinamicii parametrilor populaționali.

O.2. Evaluarea potențialului metodelor acustice pasive și a algoritmilor de detecție automată pentru monitorizarea populațiilor de țestoasă dobrogeană.

Am ales ca organism-model țestoasa dobrogeană atât datorită importanței sale pentru conservare (specie prioritară în UE, Anexa II a Directivei Habitats; OUG 57/2007), dar și datorită disponibilității unor seturi de date și de probe biologice complete, extrem de valoroase pentru analizele comparative propuse. Astfel, probele biologice și setul de date asociate pentru țestoasa dobrogeană provin dintr-un studiu de monitorizare pe termen lung, inițiat în 2010, în cadrul sitului arheologic Histria, Rezervația Biosferei Delta Dunării (Buică și colab. 2013; Iosif și colab. 2019).

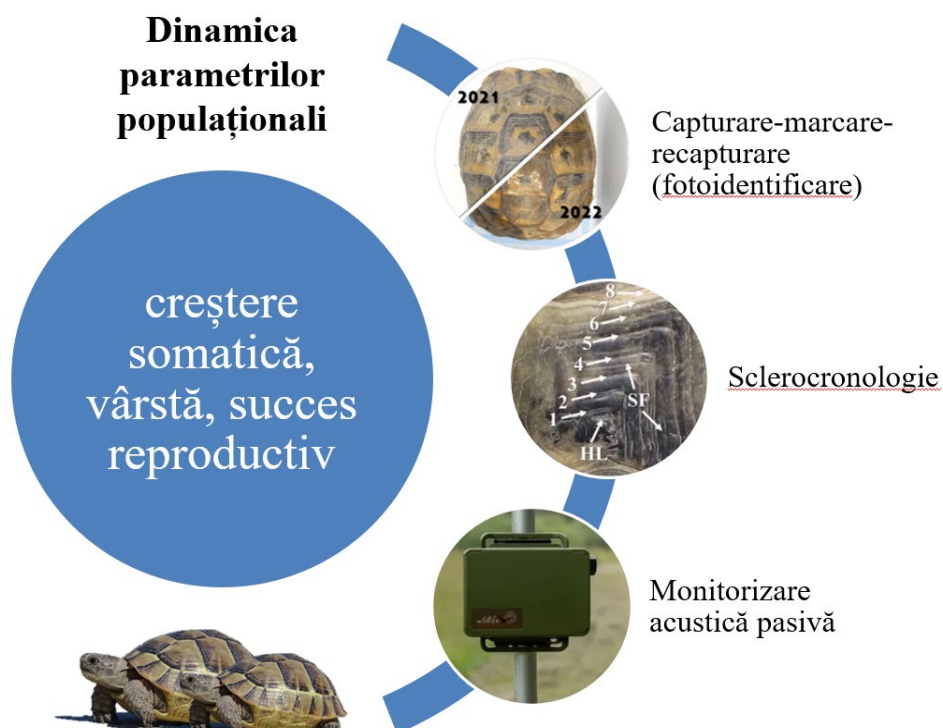


Figura 1. Abordarea metodologică propusă în cadrul proiectului.

3. Prezentarea rezultatelor

Monitorizarea parametrilor populaționali. Parametrii ce descriu vârsta și creșterea somatică contribuie la o mai bună înțelegere a adaptărilor biologice ale organismelor la mediul de viață. La vertebrate, aceștia pot fi studiați în natură prin capturare-marcare-recapturare (CMR) sau sclerocronologie (i.e., scheletocronologie și numărarea zonelor de creștere pe structuri dure). La țestoase, scheletocronologia este limitată la carcase/specimene din colecții muzeale, în timp ce CMR este limitată de posibilitățile financiare și de timp. În comparație, estimarea vârstei prin identificarea și numărarea zonelor de creștere pe carapace (SGA, „shell growth annuli”) reprezintă o alternativă convenabilă și rapidă.



Figura 2. Carcase de țestoasă dobrogeană (*Testudo graeca*) colectate din zona de studiu, utilizate pentru sclerocronologie.

Am analizat structurile osoase și carapacele provenind de la carcasse colectate în intervalul 2018-2021 din zona de studiu (**Figura 2**, Vlad și colab. 2020), conservate în colecția Departamentului de Științe ale Naturii al Universității „Ovidius” Constanța. Am utilizat aplicația Wild-ID pentru a identifica indivizii marcați și recapturați, pe baza colecției de fotografii rezultate din studiul CMR. Am comparat vârsta estimată prin cele două metode sclerocronologice (**Figura 3**) și am calibrat rezultatele cu datele obținute de la țestoasele recapturate prin CMR (**Figura 4**). Am estimat supraviețuirea și mărimea populațională cu ajutorul pachetului RMark (Laake, 2013), în software-ul R (R Core Team, 2023).

Am utilizat parametrizarea POPAN (Schwarz și Arnason, 1996), și modelul Cormack-Jolly-Seber (Pledger și colab., 2013) în baza ipotezei unei superpopulații deschise, din care țestoasele pot migra între arealul populațional și zonele adiacente (Wagner și colab., 2011). Momentele de captură au fost anii, nu momentele de colectare în teren, care au variat de la un an la altul ca frecvență și ca interval de timp.

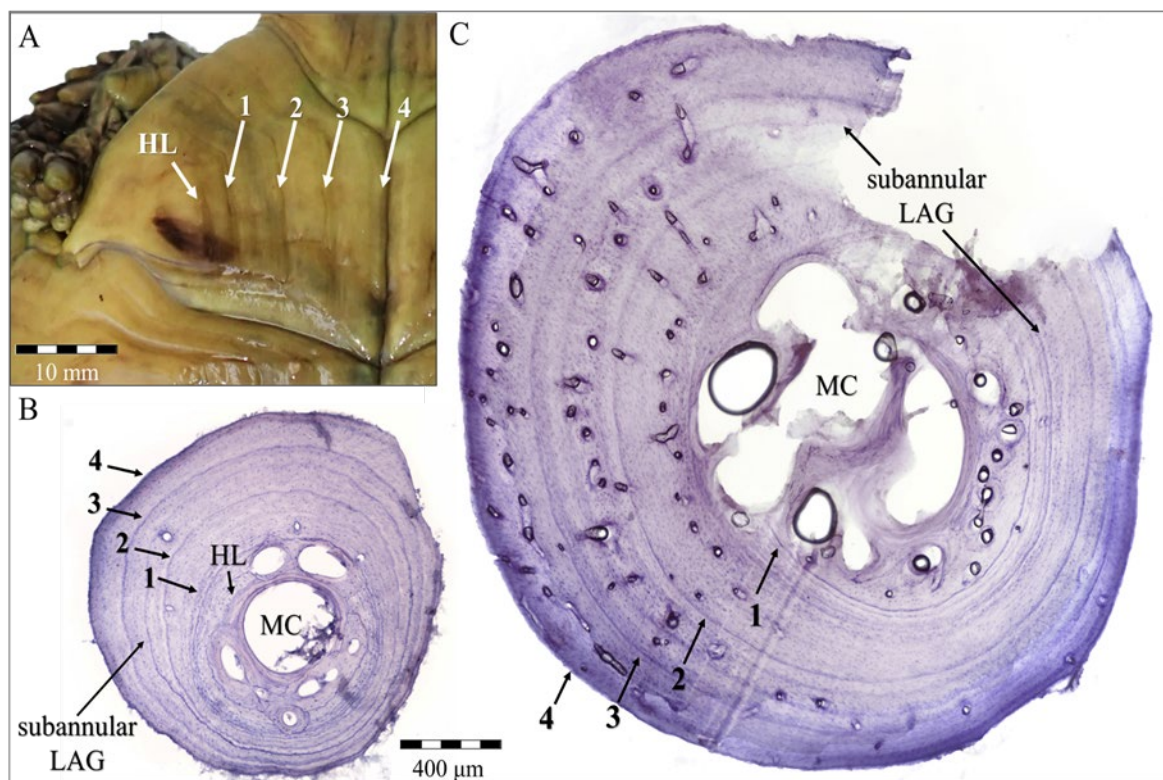


Figura 3. Estimarea vârstei la *T. graeca* – individ în vârstă de patru ani (Vlad și colab., 2024). Săgețile albe indică inelele de creștere de pe plastron, iar cele negre indică inelele din țesutul osos. **A.** plastron: detalii ale scutului humeral. **B.** secțiune transversală prin femur. **C.** secțiune transversală prin radius. **HL** – inel de creștere format la eclozare („hatching line”), **MC** - cavitatea medulară, subannular LAG – inele formate între două hibernări consecutive (i.e., întreruperi intra-anuale ale creșterii somatice).

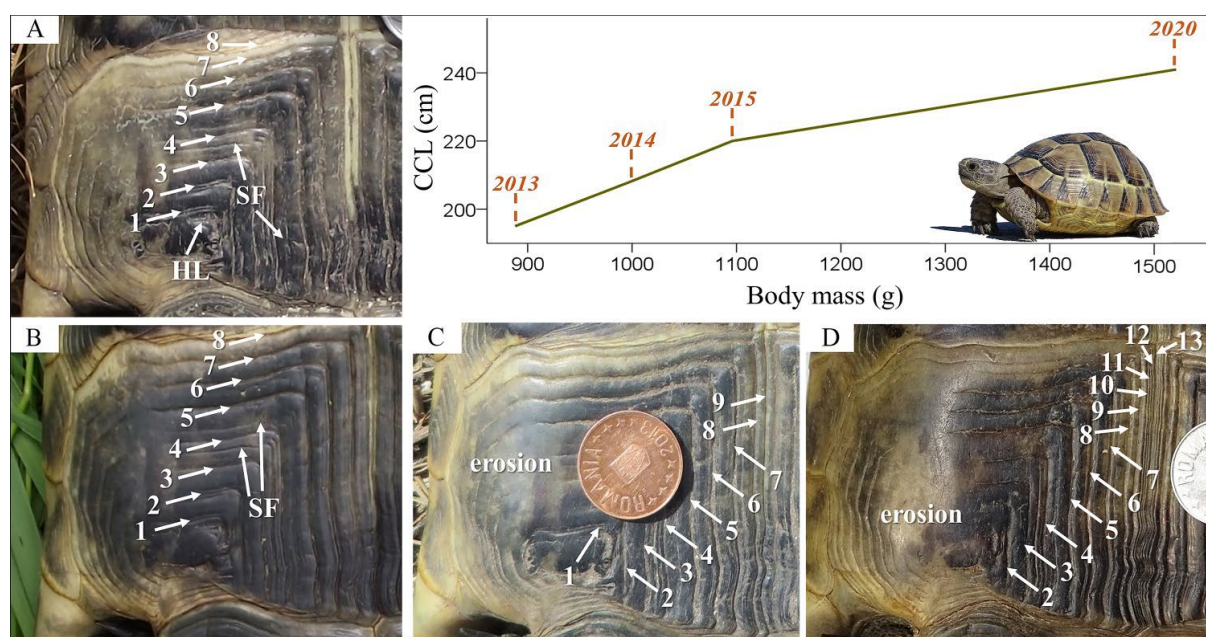


Figura 4. Mascul de *T. graeca* fotografiat, cântărit și măsurat (lungimea curbă a carapacei, CCL) repetat pe parcursul studiului CMR. Marcajul format la eclozare (HL) și formațiuni sub-anulare (SF) pot fi observate pe scuturile abdominale ale plastronului. Fiecare fotografie corespunde unui an diferit în care țestoasă a fost (re)capturată: A - 2013, B - 2014, C - 2015 și D - 2020.

Am constatat că acuratețea SGA scade semnificativ cu timpul scurs între capturi. Scheletochronologia a demonstrat cele mai bune rezultate în cazul oaselor lungi (ulna, radius, femur), dar a subestimat vârsta în comparație cu SGA; am obținut rezultate comparabile prin aceste două metode la țestoasele cu vârsta de până la 17 ani.

Cea mai înaintată vârstă estimată prin scheletochronologie a fost de 28 de ani, prin SGA 30 de ani, iar prin SGA calibrat cu CMR, 40 de ani. Modelele de creștere estimate pe baza ecuației de creștere von Bertalanffy au arătat ca ambele metode sclerocronologice conduc la rezultate similare (**Figura 5**), evidențiind utilitatea acestora în monitorizarea traiectoriilor de creștere. Astfel studiul nostru a arătat că, deși estimarea vârstei la țestoase reprezintă o provocare, o combinație de metode poate îmbunătăți precizia acesteia.

Pe baza datelor de CMR, am estimat că populația din zona de studiu cuprinde 814 adulți (± 23), iar supraviețuirea acestora este în scădere (i.e., $\Phi_{2020} = 0.62 \pm 0.08$, $\Phi_{2022} = 0.26 \pm 0.02$).

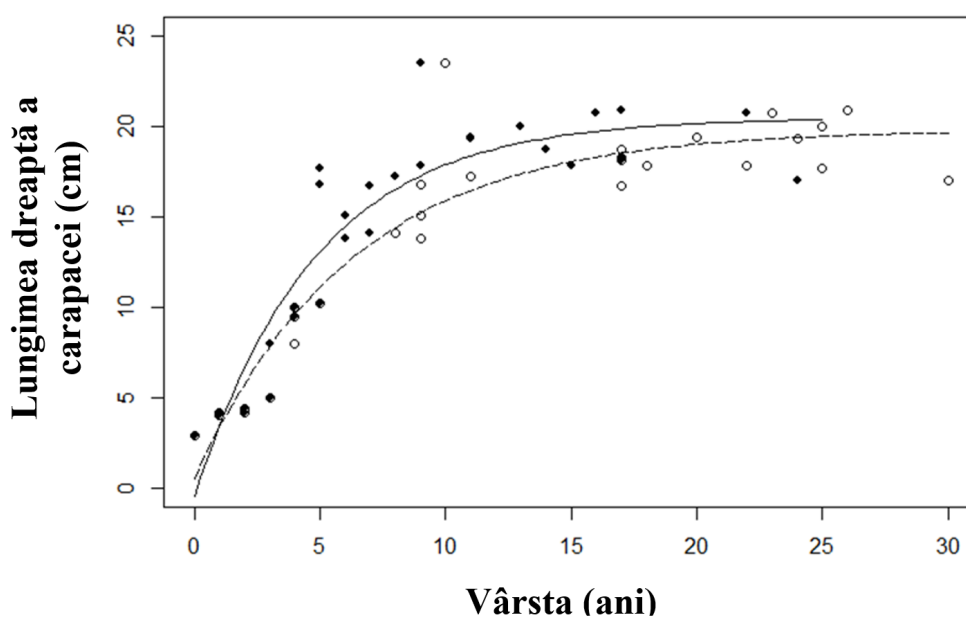


Figura 5. Modelele de creștere von Bertalanffy la *T. graeca*, estimate pe baza scheletocronologiei (cercuri negre, linie continuă) și a inelelor de creștere de pe carapace (cercuri albe, linie întreruptă) (Vlad și colab., 2024).

În urma reviziei literaturii de specialitate (Székely și colab., 2024), am arătat că sclerochronologia este frecvent utilizată ca și metodă de estimare a vârstei la reptile: 468 de studii publicate care acoperă 236 de specii de reptile din 41 de familii; țestoasele și crocodilii sunt cel mai frecvent studiate, în timp ce șerpii sunt grupul cel mai puțin examinat (**Figurile 6, 7**). Informații privind vârsta reptilelor sunt disponibile pentru mai puțin de 2% din numărul total de specii existente cunoscute. Mai mult, am constatat că au fost studiate cu predilecție specii din zona temperată nordică, ceea ce nu reflectă nevoile actuale de conservare (**Figura 8**).

Doar 23% dintre studiile analizate au verificat și validat periodicitatea depunerii inelelor de creștere, iar metoda de estimare a vârstei a fost considerată fiabilă sau adecvată în 79% dintre cazuri. În general, datele obținute prin sclerochronologie pot fi considerate robuste, în special dacă se utilizează metode de validare, deoarece obiectivul general este de a caracteriza parametrii, tendințele și dinamica populațiilor, mai degrabă decât de a determina vârsta individuală.

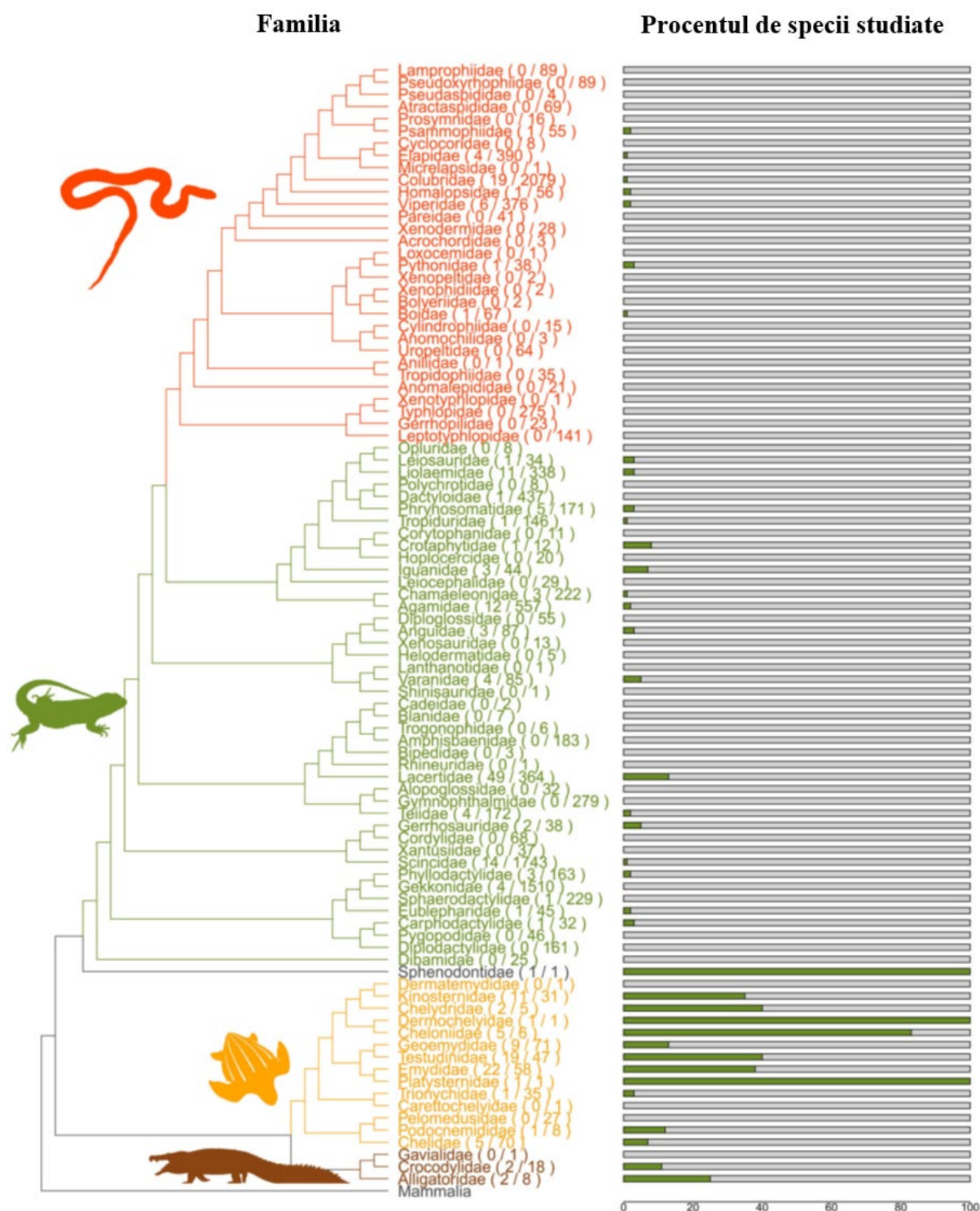


Figura 6. Procentul de specii din fiecare familie de reptile unde vârsta a fost estimată prin sclerocronologie. Între paranteze sunt menționate: numărul de specii studiate și numărul de specii din cadrul fiecărei familii (Székely și colab., 2024).

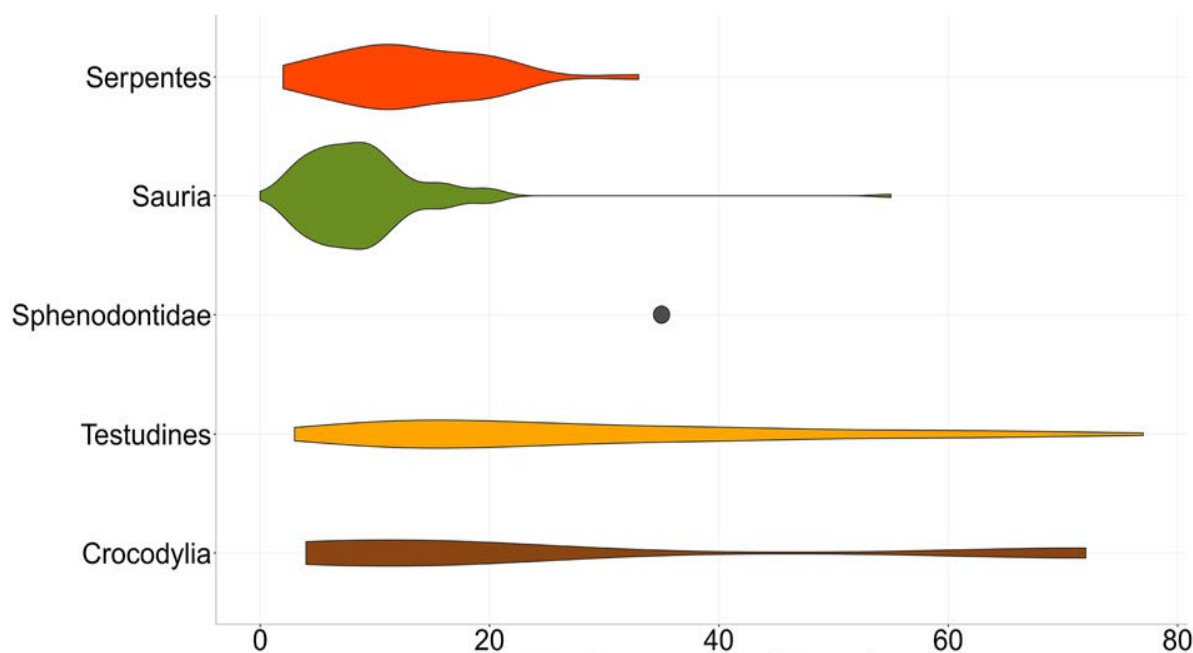


Figura 7. Longevitatea reptilelor (măsurată în ani), conform estimărilor prin sclerocronologie (date extrase din literatura de specialitate); comparație între principalele grupe: Crocodylia (4), Testudines (62), Sphenodontidae (1), Sauria (116), Serpentes (33) (Székely și colab., 2024). Cifrele dintre paranteze reprezintă numărul de specii studiate.

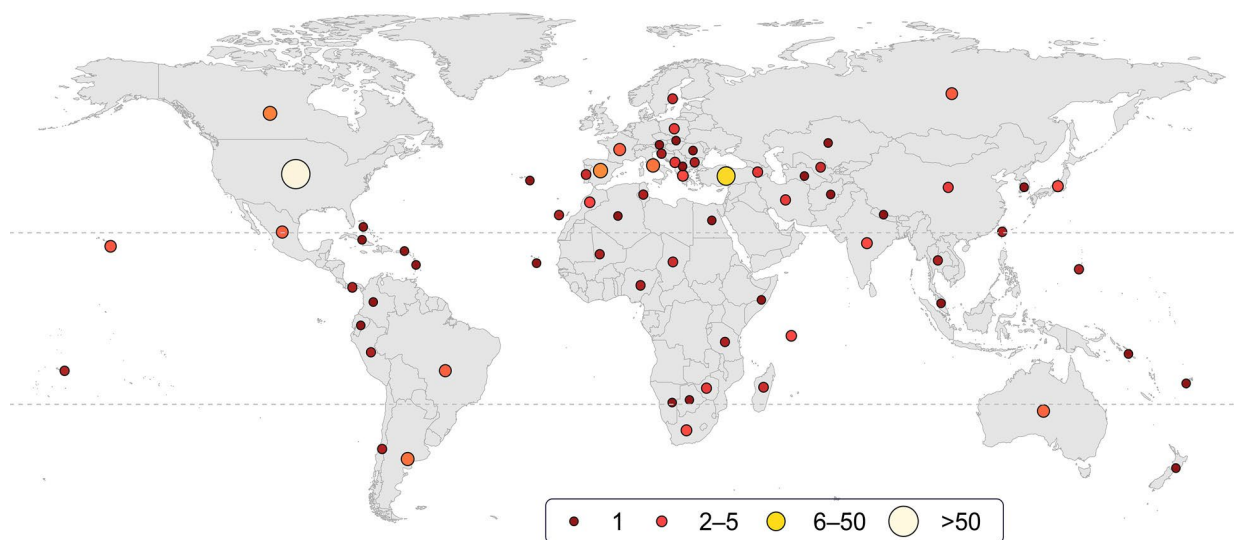


Figura 8. Locațiile unde au fost desfășurate studii care au estimat vârsta la reptile prin sclerocronologie (Székely și colab., 2024).

Monitorizarea acustică pasivă. O metodă utilizată tot mai frecvent în ultimele decenii pentru monitorizarea populațiilor sălbatice și a biodiversității în general, o reprezintă monitorizarea acustică pasivă (MAP) (Gibb și colab. 2019; Ross și colab. 2023). Deși metoda a fost inițial gândită pentru studiul speciilor/comunităților acustice, dezvoltarea galopantă a noilor instrumente de procesare și analiză a sunetelor au condus la extinderea aplicațiilor posibile. Am evaluat diversitatea bioacustică și aplicabilitatea MAP ca instrument pentru monitorizarea biodiversității pe termen lung în cadrul sitului arheologic Histria, Rezervația Biosferei Delta Dunării.

Deși țestoasele în general nu sunt cunoscute pentru activitatea lor acustică (Ferrara și colab. 2014), în decursul studiilor noastre în teren am observat că prezența speciilor din genul *Testudo* poate fi detectată și auditiv (i.e., prin sunetele emise în urma ciocnirii carapacelor, în perioada de împerechere), un aspect util având în vedere faptul că acestea sunt dificil de găsit în habitate cu vegetație deasă. Astfel, am testat ipoteza că aceste sunete pot fi utile atât pentru detecția animalelor, dar și pentru evaluarea fenologiei și succesului activității de reproducere.

Am folosit recordere autonome (Audiomoth v.1.2) pentru a înregistra 3 minute din fiecare oră (0-96 kHz), zilnic, în lunile martie și aprilie 2023 și 2024. Recorderele au fost amplasate în zonele cu cea mai mare frecvență a perechilor în acuplare, în perioada de reproducere. Concomitent, am realizat vizite în teren pentru a colecta date privind împerecherea țestoaselor de-a lungul unui transect fix (vizual/auditiv) (**Figura 9**).

Fișierele audio au fost analizate în Raven Pro v.1.6. (Cornell Lab of Ornithology, <https://ravensoundsoftware.com>). Am cuantificat manual următorii parametri: prezența zgomotului produs de ploaie sau de vânt puternic (>500 Hz), numărul de biofonii și respectiv numărul de specii care vocalizează, din fiecare înregistrare. Speciile identificate au fost încadrate într-una din grupele taxonomice majore: Aves, Insecta, Mammalia, Amphibia. Pentru fiecare înregistrare, am calculat parametrii care descriu modul în care sunetele sunt distribuite pe benzi de frecvență și intensități (i.e., entropie agregată/medie, energie acustică medie).

Am calculat o serie de indici frecvent utilizați în caracterizarea peisajelor acustice, cu ajutorul pachetelor *seewave* (Sueur și colab., 2008) și *soundecology* (Villanueva-Rivera și Pijanowski, 2016), în R v. 3.6.0 (R Core Team, 2019): indicele de complexitate acustică (Acoustic Complexity Index, ACI; Pieretti și colab., 2011), Normalized Difference Soundscape Index (NDSI; Kasten și colab., 2012), indicele bioacustic (Bioacoustic Index, BI; Boelman și colab., 2007), și entropia totală (H; Sueur și colab., 2008).



Figura 9. Schița transectului fix și amplasarea audio-recorderelor pentru colectarea datelor din teren, în cadrul sitului arheologic Histria, jud. Constanța.

Am identificat o segregare temporală a spațiului acustic pe parcursul a 24 ore, cu două perioade de maxim în activitatea acustică: (1) dimineața, între orele 2-7, și (2) după-amiaza, între orele 12-17 (**Figura 10**). Grupa taxonomică predominantă din punct de vedere a activității acustice este reprezentată de păsări (**Figura 11**).

Din punct de vedere al relevanței parametrilor acustici pentru caracterizarea peisajului acustic la Histria, numai doi dintre indici nu au putut fi validați: indicele de complexitate acustică și indicele bioacustic. Valorile obținute pentru NDSI, entropia totală, entropia agregată, entropia medie și energia acustică medie s-au corelat cu numărul de biofonii și specii identificate manual în înregistrări.

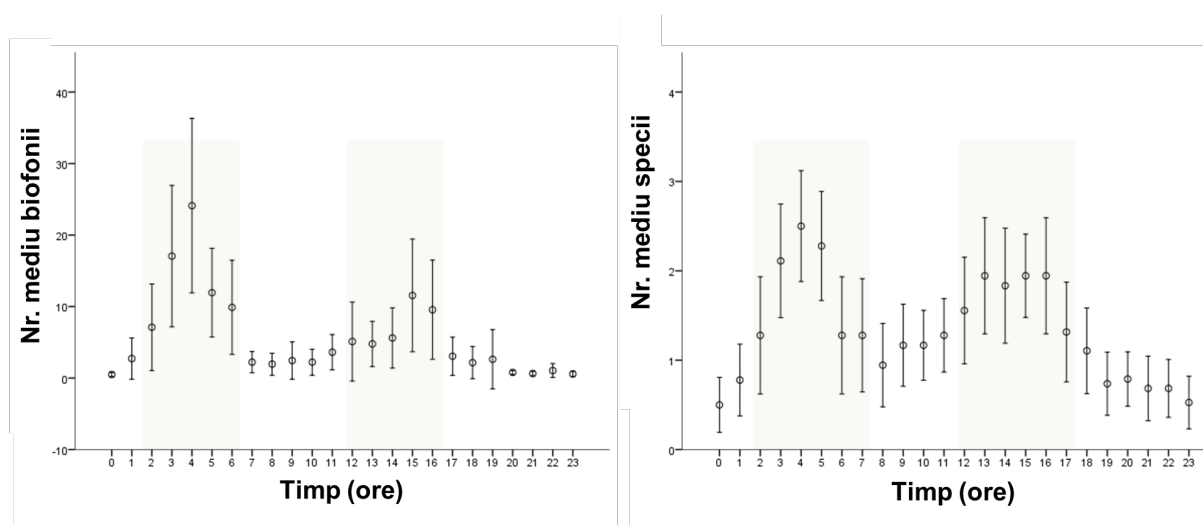


Figura 10. Variația diurnă a numărului mediu de biofonii și de specii.

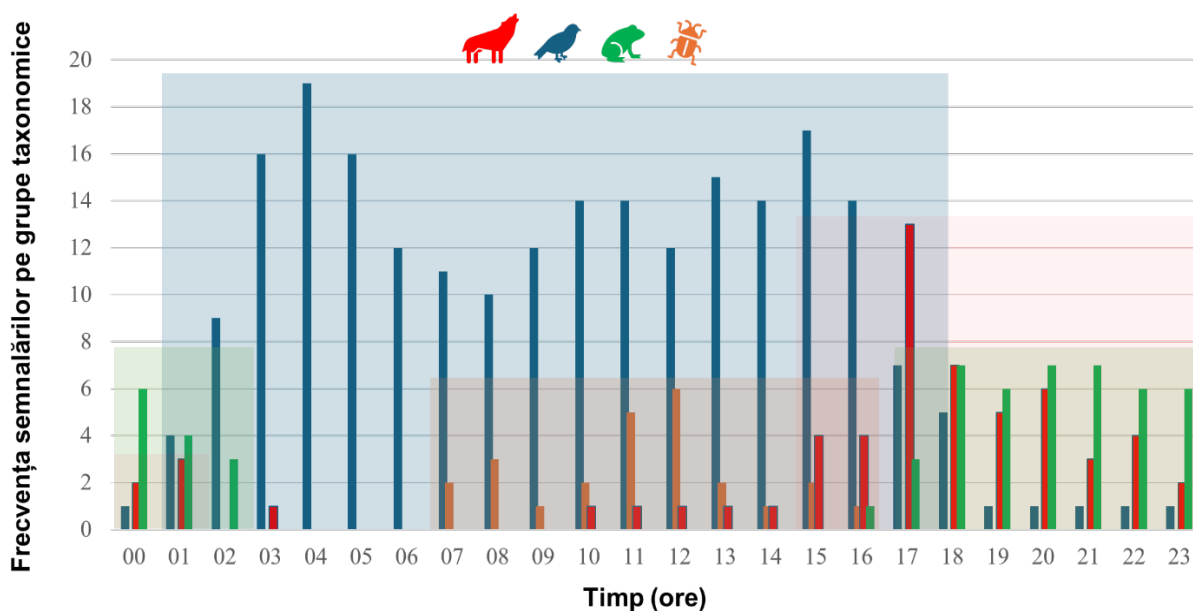


Figura 11. Frecvența medie diurnă a semnalărilor pentru principalele grupe taxonomice, în funcție de activitatea acustică.

Indicele NDSI a scos în evidență perioada din 24 de ore când peisajul acustic natural este cel mai perturbat, respectiv perioada cuprinsă între orele 5 și 14 (**Figura 13**). Acest tipar acustic se suprapune cu perioada de minim de activitate acustică dintre orele 7-11 dimineața (vezi **Figura 10**).

Studiul nostru stabilește un etalon pentru MAP pe termen lung în acest sit și deschide noi oportunități de cercetare pentru conservarea comună a patrimoniului natural și cultural.

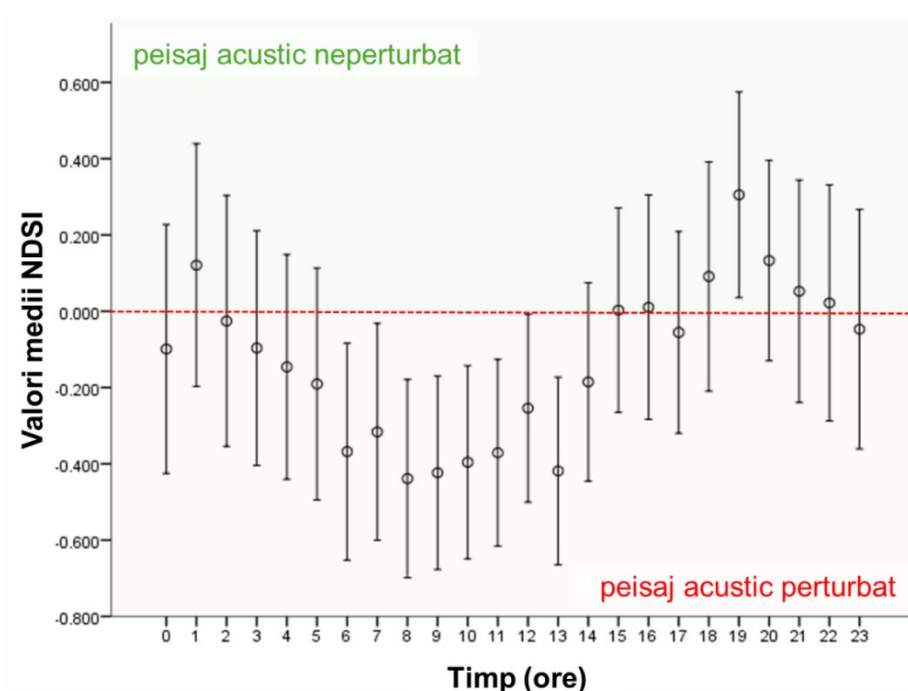


Figura 12. Variația diurnă a zgomotului de origine abiotică (valori medii). Valorile negative sugerează un peisaj acustic perturbat, în timp ce valorile pozitive, sugerează un peisaj acustic neperturbat.

În ceea ce privește monitorizarea acustică a țestoaselor, detecția auditivă pe transect pare a fi momentan cea mai bună metodă de localizare a perechilor la reproducere. În zona de studiu, sunetele produse de ciocnirea carapacelor sunt adesea mascate de vânt, care produce zgomote cu intensitate mare ce acoperă aceleași benzi de frecvență, ceea ce îngreunează detecția din înregistrările audio (**Figura 13**).

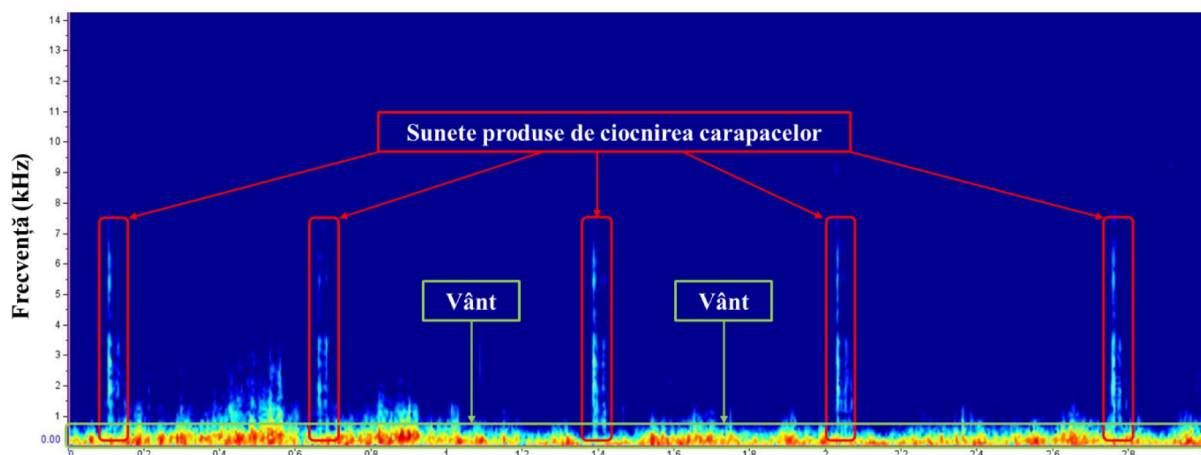


Figura 13. Detecția sunetelor produse de ciocnirea carapacelor în perioada de reproducere la țestoasa dobrogenească (*Testudo graeca*), cetatea Histria, Histria, Rezervația Biosferei Delta Dunării (Aprilie 2023).

Praguri de sensibilitate acustică - răspunsul auditiv al trunchiului cerebral. Colaborarea cu cercetători din alte centre universitare a dat naștere unei noi direcții de lucru, relevantă pentru conservarea țestoaselor. Astfel, am realizat experimente de tip playback, folosind stimuli auditivi și vibrații de diferite intensități și frecvențe.

În teren, am urmărit răspunsul comportamental față de stimuli (**Figura 14**). Echipamentele pentru emisia-recepția stimulilor ne-au fost puse la dispoziție prin bunăvoința dlui. Dr. Rafael Márquez, curatorul Fonotecii Zoologice din cadrul Muzeului Național de Științe Naturale din Madrid (Spania), care ne-a oferit training în utilizarea aparaturii și organizarea experimentelor de acest tip. În condițiile utilizării unor stimuli auditivi și vibrații din domeniul de frecvență 50-500 Hz, țestoasele nu au manifestat răspunsuri comportamentale.



Figura 14. Amenajarea spațiului pentru realizarea experimentului în cadrul sitului arheologic Histria și derularea testelor în teren.

În laborator, am inițiat testarea răspunsului auditiv al trunchiului cerebral (**Figura 15**) în colaborare cu un expert în domeniu, Prof. Dr. Jakob Christensen-Dalsgaard, de la University of Southern Denmark (Odense). Protocolul utilizat a fost adaptat după Greer și colab. (2001) și Bochmann și colab. (2018). Domeniul de frecvență a stimulilor utilizați a fost 0-1000 Hz (în incremente de 100 Hz), la intensități între 40 și 110 db (în incremente de 5 db).

Răspunsul auditiv la reptile este asociat în general cu comportamente evitante. Aceste teste ne vor ajuta să înțelegem mai bine comportamentul acestor animale față de stimulii de origine antropică, precum și la ce nivel se situează pragul de sensibilitate acustică. Aceste informații vor putea fi utilizate în programe de conservare, în scopul reducerii mortalității cauzate de traficul rutier sau de echipamentele de cosire mecanizată.

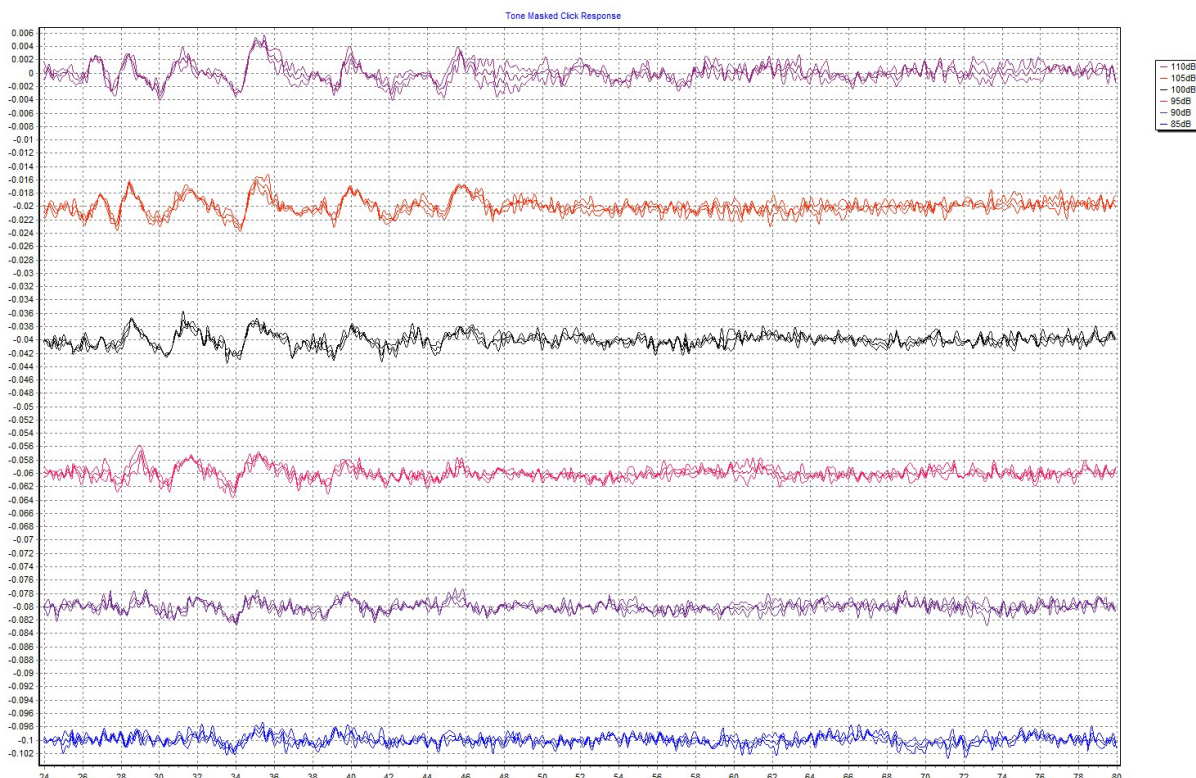


Figura 15. Răspunsul auditiv al trunchiului cerebral față de un stimul de tip click, la intensități diferite (85-110 db). Axa orizontală reprezintă timpul de răspuns, iar cea verticală intensitatea răspunsului.

Diseminarea rezultatelor

Publicații în jurnale ISI

- Vlad, S.E., Stănescu, F., & Cogălniceanu, D.** (2024). [Age assessment in tortoises: an evaluation of methods for the spur-thighed tortoise \(*Testudo graeca*\)](https://doi.org/10.1163/15685381-bja10182). *Amphibia-Reptilia*, 1(aop), 1-13. <https://doi.org/10.1163/15685381-bja10182>
- Székely, D., Stănescu, F., Szekely, P., Telea, A. E., & Cogălniceanu, D.** (2024). [A review of age estimation methods in non-avian reptiles by growth marks in hard tissues](https://doi.org/10.1111/1749-4877.12808). *Integrative Zoology*. <https://doi.org/10.1111/1749-4877.12808>

Comunicări în cadrul unor manifestări științifice

- Tănase, T., & Stănescu, F.** (2024). *Evaluarea diversității bioacustice în cadrul sitului arheologic Histria*. Conferința științifică națională de primăvară, Academia Oamenilor de Știință din România, 24 – 25 Mai 2024, București. ISSN 2601 – 5102.
- Vlad, S.E.** (2023). Age estimations: capture-mark-recapture and histological approaches. International Workshop on Age Estimations in the Wild, 17 octombrie 2023, St. George's College, Aruvithura, India (online).
- Vlad, S.E., Cogălniceanu, D., Drăgan, A.M., Iosif, R., Stănescu, F.** (2023). Monitorizarea țestoaselor dobrogene printr-o abordare metodologică integrativă. In: Book of Abstracts, ISSN 2601 - 5102, Conferința națională științifică de toamnă a AOSR 2023, Știința pentru o societate sănătoasă, 21-23 septembrie 2023, Universitatea Ovidius Constanta.

Bibliografie

- Bochmann, M., Wenger, S., & Hatt, J. M. (2018). Preliminary clinical comparison of anesthesia with ketamine/medetomidine and s-ketamine/medetomidine in *Testudo spp.* Journal of herpetological medicine and surgery, 28(1-2), 40-46.
- Boelman, N. T., Asner, G. P., Hart, P. J., & Martin, R. E. (2007). Multi-trophic invasion resistance in Hawaii: bioacoustics, field surveys, and airborne remote sensing. Ecological Applications, 17(8), 2137-2144.
- Buică, G., Iosif, R., Cogălniceanu, D. (2013). Demography and conservation of an isolated spur-thighed tortoise *Testudo graeca* population in Dobrogea (Romania). Ecol. Balk. 5: 97-106.
- Ferrara, C. R., Vogt, R. C., Giles, J. C., & Kuchling, G. (2014). Chelonian vocal communication. Biocommunication of animals, 261-274.
- Gibb, R., Browning, E., Glover-Kapfer, P., & Jones, K. E. (2019). Emerging opportunities and challenges for passive acoustics in ecological assessment and monitoring. Methods in Ecology and Evolution, 10(2), 169-185.
- Greer, L. L., Jenne, K. J., & Diggs, H. E. (2001). Medetomidine-ketamine anesthesia in red-eared slider turtles (*Trachemys scripta elegans*). Journal of the American Association for Laboratory Animal Science, 40(3), 8-11.
- Kasten, E. P., Gage, S. H., Fox, J., & Joo, W. (2012). The remote environmental assessment laboratory's acoustic library: An archive for studying soundscape ecology. Ecological Informatics, 12, 50-67.
- Laake, J.L. (2013) RMark: An R interface for analysis of capture-recapture data with MARK. Alaska Fisheries Science Center, Seattle, USA.
- Iosif, R., Vlad, S.E., Stănescu, F., Cogălniceanu, D. (2019). Perception of visitors regarding the wildlife inhabiting an archaeological site. Hum. Dimens. Wildl. 24: 301-313.
- Pieretti, N., Farina, A., & Morri, D. (2011). A new methodology to infer the singing activity of an avian community: The Acoustic Complexity Index (ACI). Ecological Indicators, 11(3), 868-873.
- Pledger, S., Pollock, K.H., Norris, J.L. (2003) Open capture-recapture models with heterogeneity: I. Cormack-Jolly-Seber model. Biometrics 59:786-794
- R Core Team (2023). R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>
- Ross, S. R. J., O'Connell, D. P., Deichmann, J. L., Desjonquères, C., Gasc, A., Phillips, J. N., ... & Burivalova, Z. (2023). Passive acoustic monitoring provides a fresh perspective on fundamental ecological questions. Functional Ecology. DOI: 10.1111/1365-2435.14275
- Schwarz, C. J., & Arnason, A. N. (1996). A general methodology for the analysis of capture-recapture experiments in open populations. Biometrics, 860-873.
- Sueur J, Aubin T, Simonis C (2008) - seewave: a free modular tool for sound analysis and synthesis. Bioacoustics, 18: 213-226.
- Villanueva-Rivera, L. J., & Pijanowski, B. C. (2016). Soundecology: soundscape ecology. R package version 1.3. 2.
- Wagner, N., Pellet, J., Lötters, S., Schmidt, B. R., & Schmitt, T. (2011). The superpopulation approach for estimating the population size of prolonged breeding amphibians: Examples from Europe. Amphibia-Reptilia, 32(3), 323-332.