



Благовеста Димитрова Димитрова



**„Влияние на пестициди върху видове земноводни
от водоеми с различна степен на антропогенно
въздействие в Централна България“**

АВТОРЕФЕРАТ

за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“

Професионално направление 4.3. Биологически науки

Научна специалност „Екология и опазване на екосистемите“

Секция „Екология на съобществата и консервационна биология“

Отдел „Екосистемни изследвания, екологичен риск и консервационна биология“

ИБЕИ – БАН

Научен ръководител:

доц. д-р Симеон Луканов

София, 2025г.

Дисертацията е разработена в рамките на редовна докторантура в Института по биоразнообразие и екосистемни изследвания на БАН. Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на разширено заседание на отдел „Екосистемни изследвания, екологичен риск и консервационна биология“, състояло се на 10 февруари 2025г.

Дисертационният труд е с общ обем 122 страници и съдържа 7 основни части, които включват 14 таблици и 20 фигури. Списъкът на цитираната литература съдържа 202 заглавия, като всички освен едно са на латиница.



Защитата на дисертационния труд ще се състои на..... от часа в, на открито заседание на петчленно Научно жури, назначено със Заповед на Директора на ИБЕИ – БАН №..., в състав:

1. - председател
2. - вътрешен член
3. - външен член
4. - външен член
5. - външен член
6. - резерва, вътрешен член
7. - резерва, външен член

Съдържание

<i>I. Увод</i>	<i>1</i>
<i>II. Литературен обзор</i>	<i>1</i>
<i>III. Цел и задачи</i>	<i>4</i>
<i>IV. Материали и методи</i>	<i>5</i>
IV.1. Значимост на земеделските територии за разпространението на видове земноводни	6
IV.2. Видово разнообразие в целевите водоеми	6
IV.3. Лабораторни експерименти	7
IV.3.1. Влияние на амониев нитрат върху ларвите на видовете горска дългокрака и кафява крастава жаба	7
IV.3.2. Влияние на фунгицида Ортива® ТОП SC върху ларвите на вида горска дългокрака жаба	8
<i>V. Резултати</i>	<i>9</i>
V.1. Значимост на земеделските територии за разпространението на видове земноводни	9
V.2. Видово разнообразие в целевите водоеми	10
V.3. Лабораторни експерименти	11
V.3.1. Влияние на амониев нитрат върху ларвите на видовете горска дългокрака и кафява крастава жаба	11
V.3.2. Влияние на фунгицида Ортива® ТОП SC върху ларвите на вида горска дългокрака жаба	13
<i>VI. Обсъждане</i>	<i>14</i>
VI.1. Значимост на земеделските територии за разпространението на видове земноводни	14
VI.2. Видово разнообразие в целевите водоеми	15
VI.3. Лабораторни експерименти	16
VI.3.1. Влияние на амониев нитрат върху ларвите на видовете горска дългокрака и кафява крастава жаба	16
VI.3.2. Влияние на фунгицида Ортива® ТОП SC върху ларвите на вида горска дългокрака жаба	18
<i>VII. Заключение</i>	<i>21</i>
VII.1. Основни изводи	22
<i>Списък с приноси</i>	<i>23</i>
<i>Списък с публикации</i>	<i>24</i>
<i>Списък с цитирания</i>	<i>25</i>
<i>Списък с участията в научни форуми</i>	<i>25</i>
<i>Impact of Pesticides on Amphibian Species from Water Bodies with Varying Degrees of Anthropogenic Influence in Central Bulgaria</i>	<i>26</i>

I. Увод

Селскостопанските дейности включват процесите за отглеждане на култури и добитък, като влиянието им върху околната среда продължава хилядолетия. С индустриализацията през последните близо сто години обработваемите площи се разширяват значително. Според Историческата база данни за глобалната среда, разработена от Нидерландската агенция за оценка на околната среда и университета в Утрехт – HYDE (2023), преди хиляда години под 4% от обитаемата земя е била заета от земеделие, докато до 2000 г. тази стойност надхвърля 50% (Ellis et al., 2010), което води до унищожаване на местообитания и спад в биологичното разнообразие.

Земеделието оказва и непряко въздействие чрез парникови емисии, обезлесяване и ерозия (Khodadadi et al., 2023). Употребата на торове нарушава природните цикли, като натрупването на фосфор и азот предизвиква еутрофикация и застрашава водните организми (Schindler & Vallentyne, 2008). Пестицидите, използвани от древността, днес предизвикват тревога поради вредното си влияние върху нецелеви видове. Проучванията сочат негативни ефекти върху поведението, смъртността и местообитанията на различни животни.

В България липсват подобни изследвания, въпреки активното земеделие. Необходима е оценка на въздействието на агрохимикалите върху земноводните, за да се разработят устойчиви решения за опазване на екосистемите.

II. Литературен обзор

Глобализацията на земеделските практики и преобразуването на природни територии в обработваема земя водят до загуба на биоразнообразие (Albero et al., 2023). Разширяването на земеделските площи за сметка на природни местообитания нарушава екосистемни функции като съхранение на въглерод, контрол на ерозията и качеството на водата (Barral et al., 2020). За България от 1800 г. земеделските площи се увеличават значително, докато пасищата почти не се разширяват (HYDE, 2023). Фрагментацията на местообитания намалява популациите и променя видовия състав (Tan et al., 2023), като регламентирането на интензивната земеделска политика в Европа не винаги е ефективно в намаляване на негативите (Batáry et al. 2015).

Използването на торове започва още през 5-то хилядолетие пр.н.е., но съвременната индустриална употреба на синтетични и органични вещества води до екологични проблеми като замърсяване на води и почви (Bashir et al., 2013). Химикалите

за контрол на вредители, като торове и пестициди, влияят негативно на биоразнообразието и могат да попаднат в околната среда, замърсявайки въздуха, водите и почвата (Miller, 2004). Пестицидите, които се разпадат бавно, е по-вероятно да имат дълготрайно влияние върху нецелесъобразни организми (Tiryaki and Temur, 2010). Проблемите с химическата безопасност започват с масовото използване на ДДТ през 20-ти век, което води до регулиране на пестицидите и на територията на ЕС (Carson, 1962; EFSA, 2021).

Земноводните са едни от най-застрашените от изчезване групи, като една от основните причини за спада в разнообразието и размера на популациите, е унищожаването и замърсяването на местообитания (Gibbons et al., 2000). Моделни изследвания върху бозайници и птици не са достатъчни за оценка на пестицидите върху земноводни, защото не могат да вземат предвид специфичните им физиологични характеристики, начин на размножаване и метаморфозата, през която преминават по време на развитието си (Ortiz-Santaliestra et al., 2018), като това може да доведе до подценяване или надценяване на ефектите върху тези видове и следователно до неподходящи методи за опазване.

Земеделските площи играят важна роля в спада на популациите на земноводните, тъй като често обхващат или са в близост до критични местообитания за херпетофауната (Arntzen et al., 2017; Băncilă et al., 2023). Основните пътища на излагане на замърсители включват миграцията към водни местообитания, отток на химикали след дъжд и въздушно разпространение при прилагане на вещества (Singh et al., 2023). Земноводните са чувствителни към замърсители не само в сухоземния си етап, но и в ембрионалните и ларвни стадии, като проучвания показват, че е много вероятно излагането на химични вещества в етапите от развитие преди и по време на метаморфоза да е най-критично за оцеляването (Adams et al., 2021).

В Европа много земноводни се размножават във временни водоеми, като тези водоеми често се намират в земеделски райони и са изложени на пестициди и торове (Zhelev et al., 2018). Земноводните могат да абсорбират токсични вещества през кожата и хрилете, а яйцата и ларвите са особено уязвими към химично замърсена вода (Acquaroni et al., 2022). Процеси като забавяне на растежа и метаморфозата, или ускоряването им, се наблюдават при попови лъжички от редица видове, изложени на пестициди (Agostini et al., 2010). Освен това, пестицидите могат да причинят поведенчески аномалии, като летаргия или хиперактивност (Curi et al., 2022). Излагането на пестициди също води до феминизация и кастрация на мъжките индивиди при някои видове (Hayes et al., 2010).

Необходими са допълнителни проучвания, за да се установи как земеделските практики влияят на популациите на земноводни в различни ландшафти (Carpio et al., 2016). Съществува и необходимост от мониторинг на популациите на земноводни и ефектите от химикалите върху тях (Moussy et al., 2022).

Модерен метод за мониторинг на популации, който набира популярност през последните години, е пасивният акустичен мониторинг (ПАМ). Той включва поставяне на записващи устройства на подходящи места за целевите видове, които записват звук на предварително зададени интервали. Събраните записи, които включват както звуци от дивата природа, така и от околната среда, се анализират, за да се извлекат важни екологични данни (Browning et al., 2017). Напредъкът в развитието на по-евтини и надеждни автономни устройства и платформи за съхранение и анализ на големи количества аудио данни значително стимулира развитието на ПАМ (Aide et al., 2013; Hill et al., 2018). Един от основните му предимства е възможността да се поставят множество устройства на различни места, което иначе би изисквало редовни посещения от обучени изследователи (Darras et al., 2019). ПАМ е особено полезен за следене на видове, активни през нощта или рано сутринта, тъй като позволява прецизно проследяване на тяхната вокална активност (Hill et al., 2018).

Основният недостатък на ПАМ е генерирането на големи обеми данни, което прави ръчната обработка на записите времеемка. Съществуват автоматизирани и полу-автоматизирани методи, които ускоряват процеса, и с напредването на технологиите са все по-ефективни в анализа на подобен тип данни (Sayuri et al., 2019). ПАМ е особено полезен за мониторинг на земноводни, които са сред най-вокалните гръбначни животни, защото позволява оценка на видовото разнообразие и размера на популациите спрямо техните обаждания (Ryan, 2001). Проблемът при изчисляването на популациите е, че само мъжките използват вокални сигнали, което не винаги е индикатор за наличието на размножаваща се популация (Crovetto et al., 2019).

Експерименталните методи остават основни за изучаване на влиянието на химикали върху земноводни, но тези проучвания често водят до висока смъртност. За водните етапи на земноводните замърсителите обикновено се добавят във водата, като се поемат чрез кожата, хрилете и храната (Aronzon et al., 2014). Сухоземните етапи на земноводните се излагат на химикали чрез контакт с обработена почва или чрез директно пръскане (Brühl et al., 2013).

Според Организацията за икономическо сътрудничество и развитие има два стандартизирани теста за токсичност върху земноводни, извършвани с африканската

ноктестта жаба като моделен организъм (*Xenopus laevis*) – тест за метаморфоза (АМА), и за растеж и развитие (LAGDA). АМА проследява метаморфозата за 21 дни, измервайки смъртност, растеж и хистологични промени в щитовидната жлеза. LAGDA трае около четири месеца и обхваща развитието от ларви до млади индивиди, като следи смъртност, растеж и полово развитие. Разработват се нови методи, но валидирането им изисква време и ресурси. Освен това, въпреки удобството при работа с *X. laevis*, тя често е по-устойчива на пестициди, което може да подцени риска за по-чувствителни видове (Yu et al. 2013).

Промени в почвата и водата настъпват не само в следствие от пестициди, но и от азотни торове, като амониев нитрат. Широкото му използване, особено поради нуждата от увеличение в производство на храна, води до оттичане, като така попада в местообитания на водни обитатели. Наблюдават се са токсични ефекти при риби и земноводни – забавен растеж, висока смъртност и физиологични аномалии. Дори ниски концентрации на амониев нитрат причиняват поведенчески промени и малформации, особено в комбинация със съпътстващи стресови фактори.

Въпреки защитения статус на всички земноводни у нас, проучвания за ефектите на използваните в България пестициди и торове липсват. Тази дисертация представя първото такова изследване за страната, което подчертава актуалността и необходимостта от подобни анализи.

III. Цел и задачи

Целта на настоящата дисертационна работа е да установи влиянието на пестициди и други химични вещества, използвани в селското стопанство, върху видовото разнообразие, физическото състояние и развитието при видове земноводни от водоеми в обработваеми земи.

За реализиране на целта беше необходимо провеждането на теренни и лабораторни изследвания, включващи решаването на следните задачи:

- I. Установяване разпространението на защитени видове земноводни в обработваеми земи в България.
- II. Определяне на целеви водоеми.
 1. Вземане на водни проби за физикохимичен анализ.
 2. Регистриране на видовото разнообразие чрез теренен обход и пасивен акустичен мониторинг.

III. Лабораторни експерименти за установяване влиянието на често употребявани пестициди и торове върху ларвните стадии при земноводните.

1. Изследване влиянието на амониев нитрат (тор) върху оцеляването, развитието, активността, избягващото поведение и разпознаването на хищници при поповите лъжички на целеви видове земноводни.
2. Изследване влиянието на фунгицида Ортива® ТОП SC върху оцеляването, развитието и активността при поповите лъжички на целеви видове земноводни.

Очаква се, че водните анализи ще покажат по-високи нива на вредни вещества в третираните изследвани водоеми, в сравнение с избрания контролен водоем. Обвързано с тези резултати, и на базата на съществуващите данни за влиянието на пестициди и торове върху развитието и оцеляването на земноводни, както и тяхното разпространяване и задържане в почвата и близките водоеми, може да се предполага, че в импактните райони ще бъде регистрирано по-ниско биологично разнообразие и численост на установените видове. От друга страна, земеделски земи като оризища, които са постоянно наводнени по време на сухия сезон, когато естествените водоеми имат склонност да пресъхват, може да предоставят влажни местообитания за видовете земноводни и следователно да привлекат популациите, въпреки високото количество химични вещества, и така да се наблюдава повишено видово богатство и численост на популациите в третираните територии. Относно експерименталните проучвания в лабораторни условия с постоянни концентрации се очаква, че с повишаването на концентрацията на химични вещества във водата ще нараснат негативните ефекти като повишена смъртност, по-слаба мобилност и забавени темпове на растеж.

IV. Материали и методи

За изпълняването на целите и задачите, установени в настоящата дисертационна работа, трудът е разделен на три основни части. Първо, за да бъде установена вероятността за откриване на видове земноводни на територията на обработваеми земи, бе проведено проучване, включващо събиране на информация относно разпространението на видове от Приложение II на ЗБР видове на територията на цялата страна и картиране на данните спрямо типовете местообитания, на които се срещат. Така бе установена значимостта на земеделските територии за разпространението на земноводните у нас. Втората задача бе обвързана с поставянето на записващи устройства, с помощта на които да се определи видовото разнообразие за целеви водоеми, както и вземането на водни проби от тях. Третата част от труда бе свързана с

изпълнението на лабораторни експерименти в изолирана среда, чрез които да се демонстрира влиянието на разпространени торове (амониев нитрат) и пестициди (фунгицидът Ортива® ТОП), използвани в земеделските практики, върху оцеляването, развитието и поведението на два вида попови лъжички – горска дългокрака жаба (*Rana dalmatina* Fitzinger, 1838) и кафява крастава жаба (*Bufo bufo*). Всички проучвания бяха проведени в периода 2022-2024г. на територията на България, а работата с животни беше извършена спрямо разрешително № 767/24.01.2019, издадено от Министерство на околната среда и водите.

IV.1. Значимост на земеделските територии за разпространението на видове земноводни

Изследването разглежда значението на земеделските територии за разпространението на пет строго защитени вида земноводни в България – два от род *Bombina* и три от род *Triturus*, включени в Анекс II на Директива 92/43 на ЕС, а именно северният гребенест тритон (*Triturus cristatus*), дунавският гребенест тритон (*T. dobrogicus*), гребенестият тритон на Буреш (*T. ivanbureschi*), червенокоремната бумка (*Bombina bombina*) и жълтокоремната бумка (*B. variegata*). Изследването обхваща цяла България (около 111 000 км²), с разнообразен релеф (0–2925 м) и 45.2% земеделска площ. Анализът е базиран на 4231 точки за разпространение, събрани за осемнадесет годишен период (2004–2022) чрез платформата SmartBirds Pro, GBIF и лични наблюдения. С помощта на ArcGIS и CORINE Land Cover 2018 точките за разпространение са картирани спрямо типовете земно покритие, а след това видовото разнообразие в земеделските площи е оценено чрез индекси на Rényi и клъстерен анализ по индекса на Мориста, използвайки програмата PAST 4.07.

IV.2. Видово разнообразие в целевите водоеми

През март-май 2022 г. бяха избрани две оризища (Op1 – 3ха до с. Царимир; Op2 – 3,5ха до с. Цалапица) и едно контролно езеро (К – 3ха до с. Царимир) с естествен воден цикъл. Оризищата се наводняват през май, след покълване се третират с пестициди и се наводняват отново до септември. Проучванията взеха това предвид и бяха извършени в периода юни–септември на 2022 и 2023г.

През първата половина на юни и септември бяха събрани 10-литрови проби от трите обекта (К и двете години беше пресъхнала през септември, затова анализи на

водата за този период липсват), разделени в стерилни контейнери. Анализите, извършени от „Софийска Вода“ АД, обхващаха 62 показателя съгласно Наредба 9 и националните стандарти. Средните стойности бяха сравнени, а концентрациите – съпоставени с LC₅₀ за земноводни (или риби, при липса на данни).

За извличане на звукови данни, по едно устройство AudioMoth бе поставено край всеки обект (юни–септември), записвайки по 1 минута на всеки 10 минути между 19:00 и 00:00 ч, осигурявайки 150 минути записи дневно. В изследването бяха включени три вида: зелена крастава жаба (*Bufo viridis*), дървесница (*Hyla orientalis*) и голяма водна жаба (*Pelophylax ridibundus*), на база на доловените обаждания.

С помощта на Arbimon и Random Forest Models (ПГМ), записите (>80 000 минути) бяха анализирани за откриване на видовете. Моделите показаха точност от 79% (зелена крастава жаба), 82% (дървесница) и 83% (голяма водна жаба). Разликите в броя на обажданията между местата бяха тествани с Kruskal–Wallis, след проведен тест за нормалност Shapiro–Wilk, $p < 0.01$.

За най-активните часове през юни и септември бяха преброени активните мъжки за пет дни. Използвани бяха три N-mixture модела с програмата R („ubms“): нулев (NULL), включващ мястото на изследването като случаен ефект (SITE), и включващ мястото и стойностите на веществата (SAMPLE). Валидирането бе извършено чрез логаритмична точкова плътност и кръстосано валидиране.

Данните за валежи и температура (юни–септември) от близките метеостанции показаха ненормално разпределение (Shapiro–Wilk $p < 0.01$). Използван бе Spearman за оценка на връзката с броя на откриванията. Статистическите анализи се извършиха в R (v4.1.3, $p < 0.05$).

IV.3. Лабораторни експерименти

IV.3.1. Влияние на амониев нитрат върху ларвите на видовете горска дългокрака и кафява крастава жаба

През пролетта на 2023г. бяха използвани два често срещани в Европа и България вида безопашати земноводни – горската дългокрака и кафявата крастава жаба. Те обитават широколистни и смесени гори, и мигрират за размножителния си период, който често съвпада с прилагането на пестициди и торове. Яйца (около 500 от всеки вид) бяха събрани от незамърсено местообитание (Витоша). След транспортиране в лабораторията се развиха при ~20°C до стадий 25 (Gosner, 1960). Експериментите за двата вида

протекоха по идентичен начин. За тази серия експерименти беше избран торът амониев нитрат (99% чистота; Chim-Spectar), поради високите нитратни нива, доловени в Ор2, и широката му употреба в началото на вегетационния сезон.

Използвани бяха осем аерирани аквариума (25 L, 40×25×25 cm) с температура на водата 17–19°C. Бяха тествани следните концентрации: 0 (контрол), 50, 100 и 200 мг N-NO₃NH₄/л, като всяка беше изпълнена с две повторения. По 30 попови лъжички бяха случайно разпределени във всеки аквариум. Излагането продължи 23 дни с хранене *ad libitum* и смяна на водата през ден, като концентрациите бяха поддържани през целия експеримент. Активността се записваше на всеки четири дни за 10 минути с помощта на видеокамера, измерена като броя попови лъжички, които преминават между трите раздела (само визуално отделени и еднакви по размер) на аквариумите, а размерът на поповите лъжички беше снет в началото и края на експеримента.

Освен хроничното излагане, беше измерена и чувствителността към химични сигнали на поповите лъжички, като два отделни аквариума помещаваха за пет дни по един хищник (*T. ivanbureschi*), хранен с попови лъжички от съответния вид, за да отделят химични сигнали. В края на хроничния експеримент, оцелелите лъжички бяха поставени в тези аквариуми, след като хищникът беше премахнат. След 10-минутна аклиматизация активността им се записваше за 10 минути с методиката, описана по-горе.

За да се установи дали поповите лъжички са способни да избягат от високи, вредни концентрации на амониев нитрат, беше създадена система с четири свързани отделения (12 L общ обем). Лъжички (етап 28–30 на Gosner) бяха изложени на градиент от 0 до 200 мг/л амониев нитрат. Местоположението им се заснемаше на всеки 20 минути в рамките на двучасов тест. За анализ беше използвана програмата Statistica v10.0 с ниво на значимост $p < 0.05$. Поради липса на нормално разпределение, бяха приложени непараметрични тестове.

IV.3.2. Влияние на фунгицида Ортива® ТОП SC върху ларвите на вида горска дългокрака жаба

През пролетта на 2024 г. бяха проведени експерименти с горската дългокрака жаба, като около 500 яйца бяха събрани от незамърсено местообитание и бяха отглеждани при 17°C. Експериментите започнаха, когато поповите лъжички достигнаха стадий на активно плуване 25 по Gosner (1960).

За тази серия експерименти бе използван фунгицидът Ортива® ТОП SC, съдържащ активните вещества азоксистробин (стробилурин) и дифеноконазол (триазол). Целта бе

да се установи влиянието му върху преживяемостта, активността и развитието на *R. dalmatina*, чрез експеримент, който продължи 28 дни.

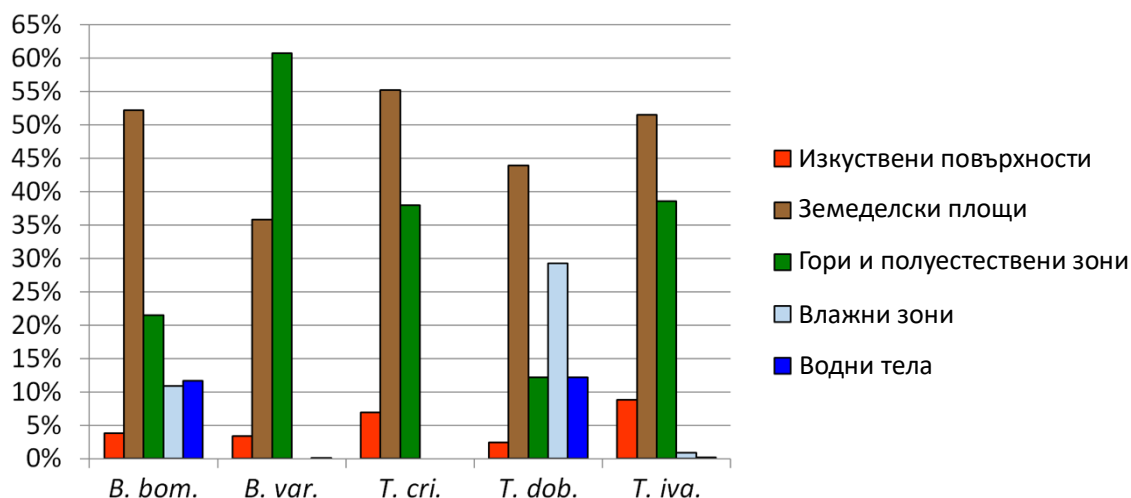
Първоначално бе проведен тест за LC_{50} с осем концентрации (0.2–20 $\mu\text{л/л}$) за 48 часа, за да се установи концентрацията, при която 50% от популацията не оцелява. По 10 попови лъжички бяха изложени на различните концентрации, като стойността на LC_{50} беше изчислена с онлайн калкулатор (Quest Graph™ LC_{50}).

Хроничното излагане на фунгицида беше проведено по идентичен начин като при амониевия нитрат, като единствените разлики бяха използваните концентрации (0, 0.2, 0.4 и 0.8 $\mu\text{л/л}$) и извличането на данни освен за размера, така и за теглото на поповите лъжички, за да се изчисли телесен индекс. Анализите бяха извършени със Statistica v10.0 с ниво на значимост $p < 0.01$. Поради ненормално разпределение, бяха използвани непараметрични тестове.

V. Резултати

V.1. Значимост на земеделските територии за разпространението на видове земноводни

След прилагане на 100 м буфер, наблюденията на петте целеви вида се сведоха до 2968 точки, разпределени между типовете CLC. Фигура 1 показва процентното разпределение на видовете спрямо типовете земно покритие (CLC ниво 1). При четири от видовете най-много регистрации има в „Земеделски площи“, като при *B. bombina*, *T. cristatus* и *T. ivanbureschi* над 50% от появите са там. Единствено *B. variegata* се среща най-често в „Гори и полуестествени зони“.



Фигура 1 – Разпределение в проценти на точките на наблюдение на петте вида, разделени спрямо типовете земно покритие от ниво 1 на CLC

На CLC ниво 3, от 28 типа земно покритие само четири съдържат всичките пет вида, като два от тях спадат в категорията „Земеделски площи“. Резултатите потвърждават тенденцията от ниво 1 – при *B. bombina*, *T. cristatus* и *T. ivanbureschi* над половината данни са в земеделски площи, докато при *B. variegata* те имат най-нисък дял. Сравнението на точките само в земеделски площи показва, че спрямо разпространението си *T. cristatus* и *B. bombina* показват най-голямо сходство, докато *T. dobrogicus* и *B. variegata* имат най-големи различия с останалите.

V.2. Видово разнообразие в целевите водоеми

По време на проучването бяха събрани 10 водни проби – шест през юни (2022 и 2023 г.) и четири през септември, когато контролният водоем беше пресъхнал. Анализирани бяха 80 124 минути аудиозаписи чрез платформата Arbimon. От 62 изследвани вещества, концентрации бяха установени за 19 (2022 г.) и 21 (2023 г.) – всички в рамките на българските стандарти, но при 12 вещества са открити значими разлики между локациите. Моделът SAMPLES дава по-слаби резултати от SITE, дори в някои случаи и NULL модела. LC₅₀ стойности бяха намерени за 13 вещества, като само при магнезий, мед и манган концентрациите се доближават до нивата на остра токсичност.

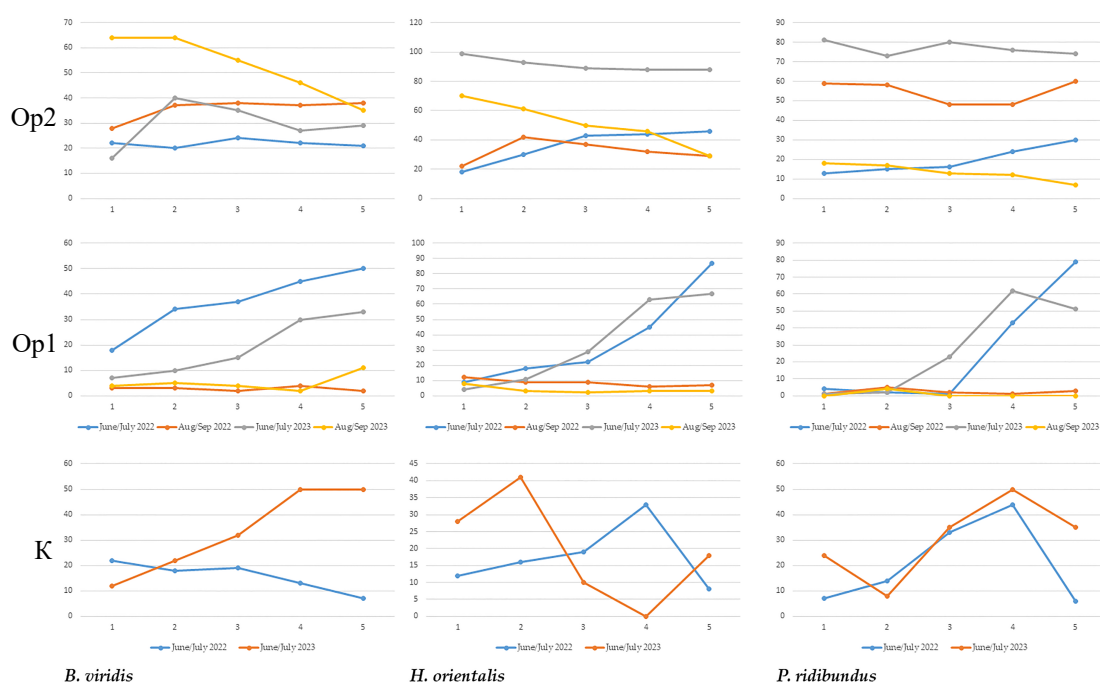
Таблица 1 – Проценти на присъствие на видовете в записите от трите обекта на изследване през двете години и прогнозираните оценки на обилието според комбинирания модел за обилие с най-високо сходство от Таблица 2. Стойностите са представени като процент присъствие (Средна стойност ± SD).

Месец		К	Op1	Op2
<i>B. viridis</i>				
2022	Юни/юли	16.93% (10.30 ± 3.31)	36.57% (31.68 ± 5.90)	22.64% (39.77 ± 6.39)
	Август/септември	-	2.63% (3.54 ± 2.02)	45.75% (32.09 ± 7.15)
2023	Юни/юли	30.73% (25.80 ± 5.80)	18.98% (37.09 ± 6.48)	29.49% (39.05 ± 6.68)
	Август/септември	-	5.00% (3.25 ± 1.98)	54.36% (30.27 ± 6.93)
<i>H. orientalis</i>				
2022	Юни/юли	18.95% (20.79 ± 4.72)	36.10% (39.20 ± 6.33)	30.18% (39.19 ± 6.51)
	Август/септември	-	8.51% (30.57 ± 7.69)	41.14% (33.14 ± 7.61)
2023	Юни/юли	21.56% (20.25 ± 4.68)	34.86% (37.55 ± 6.30)	91.46% (39.17 ± 6.35)
	Август/септември	-	3.79% (4.22 ± 2.05)	53.40% (36.87 ± 6.42)
<i>P. ridibundus</i>				
2022	Юни/юли	21.66% (30.62 ± 6.41)	25.81% (26.63 ± 5.88)	16.00% (37.78 ± 6.22)
	Август/септември	-	2.48% (6.22 ± 2.49)	72.92% (38.66 ± 6.23)
2023	Юни/юли	28.30% (24.55 ± 5.21)	27.71% (35.03 ± 6.13)	77.10% (38.94 ± 6.43)
	Август/септември	-	0.86% (4.63 ± 3.02)	13.94% (21.82 ± 9.65)

Връзката между присъствието на видовете и валежите и температурата е слаба, но значима – най-висока в контролното блато и най-ниска в Op2. Тестът на Kruskal-Wallis

показва значими разлики в присъствието на видовете – най-малко в контролата, след това в Or1 и най-много в Or2, което се потвърждава и от модела за обилие (Таблица 1).

Контролният водоем пресъхваше през август, затова сравненията за август и септември обхващат само Or1 и Or2. Ежедневната вокална активност през 2022 и 2023 г. е сходна в контролното блато и Or1, с изключение на зелената крастава жаба, докато при дървесницата и голямата водна жаба има значими разлики между годините в Or2 (Фигура 2).



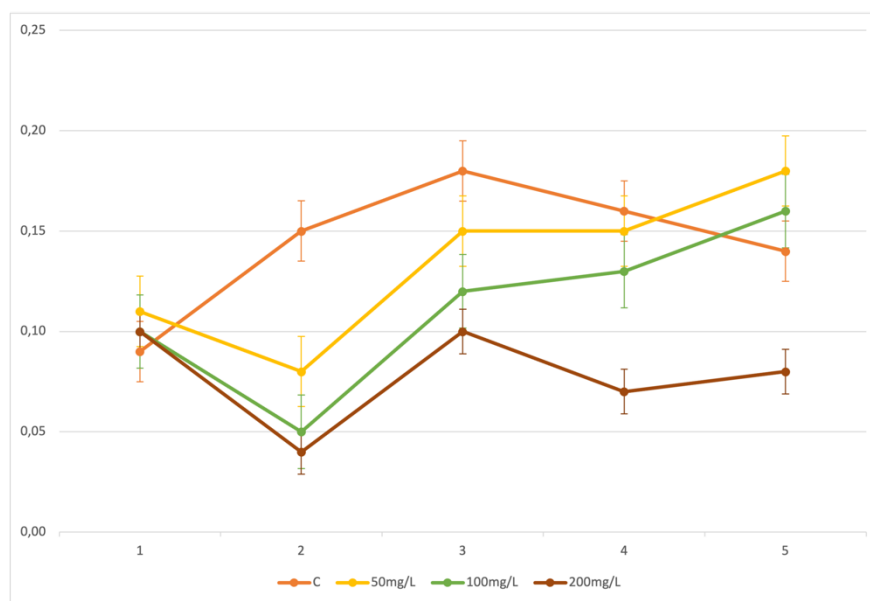
Фигура 2 – Процент на присъствие за трите целеви вида в избраните водоеми за всеки час. По хоризонталата—час на запис, от първи (19:00) до пети (00:00); по вертикалата—процент регистрирани обаждания.

V.3. Лабораторни експерименти

V.3.1. Влияние на амониев нитрат върху ларвите на видовете горска дългокрака и кафява крастава жаба

За горската дългокрака жаба не са открити значими разлики в смъртността между повторенията, затова данните са обединени. Общата смъртност (0 попови лъжички за контролната група, 12 за 50 мг/л, 20 за 100 мг/л и 47 за 200 мг/л) е значително по-ниска в контролната група спрямо всички останали концентрации. Освен това, смъртността е по-ниска при по-ниските концентрации в сравнение с най-високата.

Данните за двигателната активност също са сходни между повторенията и са обединени за анализа. Наблюдава се значително намалена активност при най-високата концентрация. При анализ на различните периоди на наблюдение се установяват значими разлики в активността, като ларвите в най-високата концентрация са значително по-малко активни спрямо контролната група и по-ниските концентрации (Фигура 3).

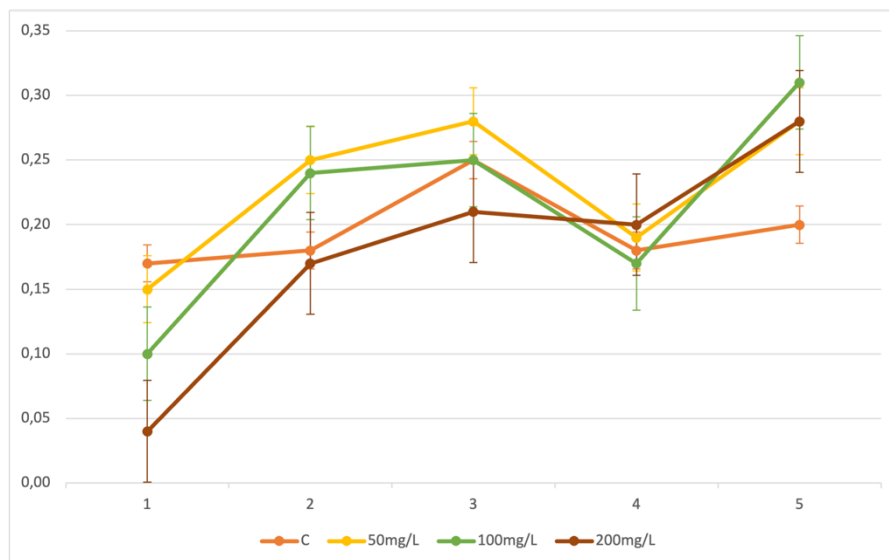


Фигура 3 - Двигателна активност при *R. dalmatina* в различните концентрации на амониев нитрат спрямо периодите на наблюдение (ПН), със стандартно отклонение. Активността е представена като пропорцията на придвижвали се попови лъжички спрямо общия брой.

Размерите на горската дългокрака жаба в края, спрямо началото, са значително различни при всички концентрации, освен най-високата, където не са открити статистически значими разлики.

При *B. bufo* смъртността не е анализирана, тъй като наблюдаваните ниски стойности се смятат за инцидентни. Двигателната активност между повторенията не показва значими разлики, и обединеният анализ показва, че в отделните периоди се установява по-ниска активност само при най-високата концентрация, спрямо контролата и най-ниската концентрация и то единствено в началния етап от експеримента (Фигура 4). Сравнението между двата вида показва, че *B. bufo* е значително по-активен от *R. dalmatina*, което се потвърждава за всяка концентрация.

Размерите на кафявата крастава жаба в края на експеримента са значително по-високи спрямо началото за всички концентрации, като в края на експеримента се наблюдава и тенденция към по-малък размер спрямо контролата във всички концентрации, като разликата е значима при най-високата концентрация.



Фигура 4 – Двигателна активност при *B. bufo* в различните концентрации на амониев нитрат спрямо периодите на наблюдение (ПН). Активността е представена като пропорцията на придвижвали се попови лъжички спрямо общия брой.

Анализът за чувствителност към химични сигнали се базира на движението на ларвите в присъствието и отсъствието на стимулиращи сигнали. При *R. dalmatina* има значителен спад в активността в присъствието на химични сигнали за всички концентрации, освен контролата, където разлика в активността не се открива. При *B. bufo* в средната концентрация се наблюдава повече движение в отсъствието на химични сигнали, спрямо присъствието, а в останалите концентрации няма значима промяна в поведението.

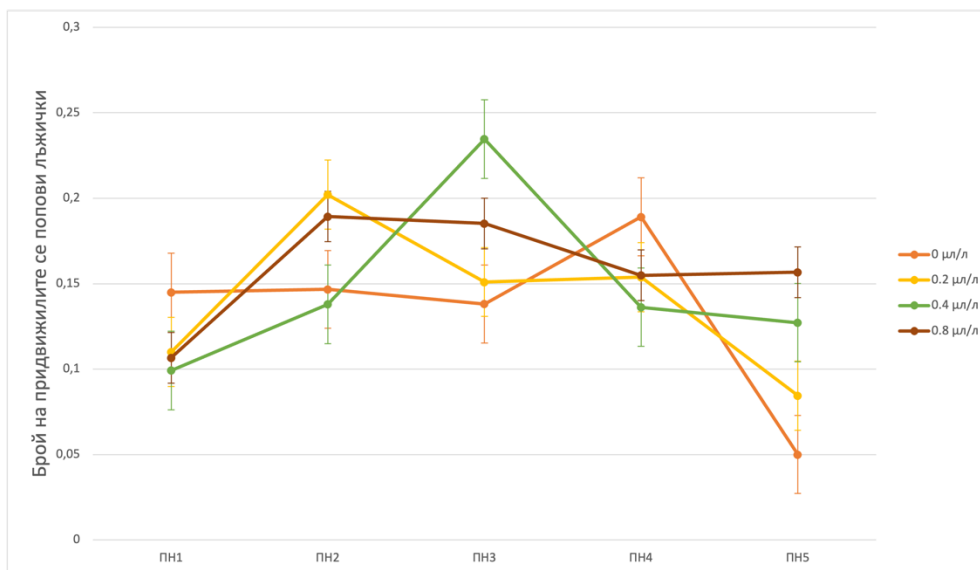
Относно избягващото поведение, при *R. dalmatina* не се наблюдава склонност към избягване към по-ниски концентрации на амониев нитрат. Подобна липса на избягващо поведение е установена и при *B. bufo*.

V.3.2. Влияние на фунгицида Ортива® ТОП SC върху ларвите на вида горска дългокрака жаба

В резултат на изчисленията, стойността на LC_{50} за фунгицида Ортива® ТОП SC е 2.2627 $\mu\text{g/L}$. След продължително излагане, се забелязва нарастване в смъртността, като статистически значимите разлики са между контролата и най-високата концентрация.

Двигателната активност не се различава между повторенията, затова данните са обединени. Няма значителна разлика между концентрациите, освен при последното измерване, когато активността в контрола е по-ниска спрямо средната и високата концентрация. Времевият анализ показва променлива активност с пикове и спадове в

зависимост от концентрацията, като най-високата не показва значителни промени (Фигура 5).



Фигура 5 – Двигателна активност при *R. dalmatina* в различните концентрации на фунгицида Ортива® ТОП SC спрямо периодите на наблюдение (ПН) със стандартно отклонение. Активността е представена като пропорцията на придвижвали се попови лъжички спрямо общия брой.

Телесният индекс не се различава между различните концентрации нито в началото, нито в края на експеримента. Сравнението между началните и крайните стойности също не показва значими разлики.

VI. Обсъждане

VI.1. Значимост на земеделските територии за разпространението на видове земноводни

Анализът на ниво 1 на CLC показва, че и петте изследвани вида земноводни обитават „Земеделски площи“, като четири от тях се срещат предимно в такива територии. Това ги излага на рискове от селскостопански практики като използване на пестициди и окрупняване на земите, което води до химическо замърсяване и фрагментация на местообитанията. Пестицидите често имат сериозни последствия върху оцеляването, размножаването и развитието на ларвите.

Основни уязвимости на земноводните са полупропускливата им кожа, която ги прави биоиндикатори за замърсяване, и сложният им жизнен цикъл, който включва както водни, така и сухоземни фази. Лабораторни изследвания показват, че контактът с пестициди води до физиологични и поведенчески аномалии. Освен това ниската им подвижност увеличава риска от излагане на замърсители.

Моментът на прилагане на пестициди е критичен – размножителният период често съвпада със сезона на пръскане, което излага възрастните, яйцата и ларвите на високи концентрации. Видове като *T. dobrogicus* и *B. bombina* са най-често срещани във водни местообитания, докато другите три предпочитат временни водоеми, които могат да останат незабелязани при по-груби мащаби на анализ, което предполага, че асоциацията им с водни местообитания също би могла да е силна, въпреки че това не се предава в анализа. Временните водоеми в земеделски земи, като оризища, осигуряват важно убежище през сухия сезон, но също така крият риск от замърсяване.

Изборът на мащаб при подобни проучвания е от съществено значение – при по-големи мащаби (напр. 50 km²) "горещите точки" на видовото разнообразие са по-ясно видими, докато при по-фини разделителни способности (напр. 10 km² или 100 m²) се отчитат по-локализирани модели на разпространение. Това обяснява защо само четири от 28 типа земно покритие показват присъствие на целевите видове в настоящото изследване.

При по-груба пространствена разделителна способност вероятността от фалшиви отсъствия намалява поради струпването на данни, докато при по-фини мащаби рискът от грешки се увеличава. Настоящото изследване се основава на данни за присъствие на видовете, което може да доведе до неточности заради липса на потвърдени отсъствия, грешки в координатите или неправилна идентификация. Също така, селскостопанските площи често са подценявани в теренните проучвания, което предполага, че земноводните могат да обитават тези райони повече от отчетеното.

Разнородността на местообитанията е важна за биологичното разнообразие – колкото повече типове земно покритие има в дадена територия, толкова повече видове я обитават. Земноводните, нуждаещи се както от водни, така и от сухоземни местообитания, се срещат по-често в хетерогенни ландшафти. Анализите при различни мащаби показват, че с увеличаването на разнообразието на културите видовото богатство нараства. В заключение, изводът от тази част на проучването е, че земеделските територии са ключови местообитания за защитени видове земноводни и трябва да се включат в стратегиите за тяхното опазване.

VI.2. Видово разнообразие в целевите водоеми

В България качеството на повърхностните води се следи от Националната система за мониторинг на околната среда (НСМОС), като измерените параметри в изследваните водоеми не надвишават допустимите стойности за напояване. Моделите за обилие

показват минимални разлики между водоемите, което предполага ниска значимост на водните параметри. Макар и повечето вещества да присъстват и в трите обекта, вредни концентрации не са открити. Въпреки това, други изследвания в района (Цалапица) съобщават за физиологични промени при жаби, вероятно свързани с хипоксия или липса на данни за замърсявания в седиментите (Zhelev et al., 2017).

Макар някои метали като манган и мед да се доближават до известни токсични стойности, остри ефекти върху земноводните са малко вероятни. Въпреки че концентрацията на манган в контролния водоем е сравнително висока, тя не показва значимо влияние върху обилието на видовете. Концентрациите на магнезий и мед също са в границите на безопасност, като твърдостта на водата може да намали тяхната токсичност (Van Dam et al., 2010).

Изследването показва, че популациите в оризищата са по-многобройни от тези в естествения водоем, което предполага, че изкуствените влажни зони могат да предоставят важни местообитания. Акустичният мониторинг (ПАМ) доказва своята полезност, въпреки че оценява единствено броя на мъжките индивиди и не е пряко показателен за размножаваща се популация (Crovetto et al. 2019). Наблюденията потвърждават по-голямото видово присъствие в оризищата, подкрепяйки идеята, че агроекосистемите могат да имат значима роля за опазването на земноводните.

Макар проучването да е ограничено по обхват, резултатите подчертават нуждата от по-широки изследвания върху дългосрочните ефекти от селскостопанските практики върху видовото обилие и биоразнообразието.

VI.3. Лабораторни експерименти

VI.3.1. Влияние на амониев нитрат върху ларвите на видовете горска дългокрака и кафява крастава жаба

Експериментите показаха, че повишените нива на амониев нитрат във водата влияят различно на поповите лъжички от двата изследвани вида, като *R. dalmatina* е значително по-чувствителен към тора вид, спрямо *B. bufo* за повечето от изследваните параметри. По време на експеримента при *B. bufo* са регистрирани само два смъртни случая – по една ларва в контролата и най-високата концентрация, което предполага, че смъртността не е свързана с амониевия нитрат, а с външни или случайни фактори. Това се различава от резултата на Xu and Oldham (1997), които установяват чувствителност при 100 мг/л. За *R. dalmatina* се наблюдава значителна смъртност през първата седмица

при всички концентрации, освен контролата, което показва висока чувствителност в ранните стадии (Gosner 25–28), съвпадаща с периода на торене (Ortiz-Santaliestra et al., 2006). Смъртността след седмия ден намалява, подкрепяйки заключенията на Burgett et al. (2007), че по-големите ларви най-вероятно са по-устойчиви.

Двигателната активност на *R. dalmatina* намалява значително при най-високата концентрация, като след първоначалния спад активността се възстановява само при по-ниските концентрации, докато при останалите остава ниска. При *B. bufo* няма съществени разлики в активността, освен в началото на експеримента при най-високата концентрация, което предполага значително по-краткотрайно влияние. Сравнението между видовете показва, че кафявата крастава жаба е по-активна при всички концентрации, с изключение на началния етап, където е значително по-чувствителна от горската дългокрака жаба.

Относно растежа, при *R. dalmatina* най-високата концентрация значително възпрепятства увеличението на размера, докато при по-ниските, индивидите нарастват. При *B. bufo* се отчита значителен растеж при всички концентрации, макар при 200 мг/л в първото повторение размерите да са по-малки. Разликите между повторенията вероятно се дължат на фактори като генетични вариации и околна среда. Резултатите сочат, че горската дългокрака жаба е по-чувствителна към амониев нитрат както по отношение на преживяемост, така и на растеж и активност.

Водните организми взаимодействат със своята среда чрез сензорни системи. Установено е, че някои замърсители във водоемите пречат на сетивните процеси и влияят на очаквания поведенчески отговор в динамиката между хищник и плячка (Gosavi et al., 2020).

При *R. dalmatina* не се наблюдават значителни разлики в активността в контролната група между наличие и отсъствие на химични сигнали, което е неочаквано, тъй като поповете лъжички обикновено намаляват движението си в присъствието на хищници (Fraker, 2008). Подобна липса на реакция е документирана при по-едри индивиди, които реагират по-слабо на заплахи (Ekloev, 2000). При ниска и средна концентрация на амониев нитрат се установява намалена активност при наличие на сигнали, което показва запазена способност за възприемане на хищници. При най-високата концентрация резултатите са противоречиви – намалена активност в повторение 1 и повишена в повторение 2, вероятно поради малкия брой оцелели в края на експеримента.

За *B. bufo* липсват значими разлики в контролната група и при ниската, и при високата концентрация, макар че се отчита склонност към по-ниска активност при

наличието на хищнически сигнали само при 100 мг/л, което е очаквано при запазена сетивна функция. Липсата на реакция при другите концентрации може да е следствие от нарушено възприятие поради амониев нитрат, подобно на ефекти, установени при излагане на атразин (Ehrsam et al., 2016). По-големият размер на ларвите в контролата може да обясни намалената чувствителност към заплахи.

Сравнението между видовете показва, че кафявата крастава жаба е по-активна от горската дългокрака при всички концентрации на амониев нитрат, с изключение на най-високата в повторение 2. Това подкрепя идеята, че при *R. dalmatina* амониевият нитрат не намалява способността за разпознаване на хищници, докато *B. bufo* запазва висока активност въпреки химическите сигнали.

Липсата на значимо избягващо поведение при двата вида предполага, че поповите лъжички не могат да открият амониевия нитрат и да се придвижат към по-безопасни зони. Това е първото изследване, разглеждащо реакцията им към този замърсител. За разлика от настоящите резултати, други проучвания показват, че някои земноводни избягват пестициди като пириметанил (Araújo et al., 2014a) и метали като мед (Araújo et al., 2014b), което може да предотврати локалното изчезване на популации. Тук обаче, неспособността за избягване може да увеличи риска от токсични ефекти и да повлияе негативно върху биологичното разнообразие.

При *R. dalmatina* се наблюдава тенденция за избягване на ниската концентрация, но без статистическа значимост. Ларвите често се придвижват както към контролната зона, така и към по-високите концентрации, което предполага объркано поведение и потенциално излагане на по-вредни нива. За *B. bufo* има подобна тенденция към избягване на 100 мг/л, но индивидите също мигрират на случаен принцип и към двете съседни отделения, излагайки се на по-висока токсичност. Макар кафявата крастава жаба да показва по-слаби негативни ефекти спрямо горската дългокрака, тази поведенческа реакция увеличава риска от излагане на вредни концентрации.

Подобни случаи на миграция към по-вредни среди са установени при риби, където някои химикали действат като атрактанти в зависимост от концентрацията (Woodman et al., 2016), но такъв ефект все още не е документиран при земноводни.

VI.3.2. Влияние на фунгицида Ортива® ТОП SC върху ларвите на вида горска дългокрака жаба

Стробилурините са сравнително нова група фунгициди, които заемат около 20% от световния пазар (Wang et al., 2020). Често използвани представители са азоксистробин,

пираклостробин, трифлуксистробин и пикоксистробин (Zhang et al., 2020), прилагани срещу гъбични заболявания по различни култури като ориз, малини и зеленчуци (Battaglin et al., 2011). Прогнозираните максимални концентрации в околната среда варират от 2.1 до 150 $\mu\text{g}/\text{l}$ (Belden et al., 2010; Deb et al., 2010), а данни от четири континента показват концентрации до 34 $\mu\text{g}/\text{l}$ (Du et al., 2019), което надвишава използваните в настоящото изследване и подчертава неговата екологична значимост.

След като тези вещества присъстват в повърхностни води, е напълно вероятно земноводните да бъдат изложени на тях. Повечето проучвания използват крайния продукт за по-реалистична оценка, но комбинацията от активни вещества, какъвто е и случаят с тестваното вещество в настоящото проучване, може да повиши токсичността – например, 48-часовата LC_{50} за чист азоксистробин при *Xenopus tropicalis* е 196.59 $\mu\text{g}/\text{l}$ (Li et al., 2016), значително по-висока от установената в настоящото проучване при Ортива® ТОП SC. Това предполага, че добавките или комбинацията от активни вещества могат да повишат токсичния ефект. При *Rana catesbeiana* са наблюдавани мутагенни ефекти при 50 $\mu\text{g}/\text{l}$ Elatus® (Assis et al., 2022), докато други видове, като *Leptodactylus latrans*, не показват подобни промени, което подчертава разликите в чувствителността на видовете.

Препоръчителната доза Ортива® ТОП SC (100 мл/акър) значително надвишава изчислената LC_{50} стойност от 2.2307 $\mu\text{g}/\text{l}$, което подсказва високата му токсичност за горската дългокрака жаба, особено ако популациите ѝ се намират в оризови полета по време на пръскане. Тъй като пестицидът често се прилага превантивно, вероятността за излагане на земноводните е висока.

Използваният етап на развитие (GS25) не е най-чувствителният към фунгициди – по-ранни етапи като GS20 показват по-висока уязвимост (Adams and Brühl, 2020). Различията в хрилната морфология и метаболитната активност между тези етапи влияят върху абсорбцията и детоксикацията на токсините (Katagi and Ose, 2014), което предполага, че Ортива® ТОП SC може да е още по-токсичен за по-млади ларви.

Въпреки статистическите разлики между двете повторения, смъртността на поповете лъжички нараства с увеличаването на концентрацията на Ортива® ТОП SC и в двата случая. Единствената забележима разлика между повторенията е достъпът до естествена светлина, който може да е повлиял върху резултатите, но редовната смяна на водата би трябвало да намали този ефект. Независимо от това, по-високите концентрации на фунгицида водят до повишена смъртност и в двете повторения, подобно на ефектите от други пестициди (Hartmann et al., 2024).

Относно активността, фунгицидът вероятно не влияе пряко на двигателната функция, но при по-високите концентрации след четири седмици се наблюдава хиперактивност, докато при контролната и най-ниската концентрация активността спада. Това поведение наподобява ефектите на други пестициди, като сиперметрин и атразин, които могат да причинят хиперактивност и свързаните с нея рискове като оксидативен стрес и тахикардия (Curi et al., 2022; Ehrt et al., 2016).

Относно размера на поповите лъжички, липсата на разлики между концентрациите в началото на експеримента показва, че разпределението им между опитите е достатъчно равномерно, че размерите им да не влияят на резултатите. В края на експеримента отново се наблюдава липса на разлики между концентрациите, което показва, че телесният индекс не се променя в следствие на излагане на фунгицида. Може да се заключи, че той не възпрепятства растежа на поповите лъжички.

Сравнението между измерванията на телесния индекс в началото и края на експеримента показва подобен резултат. Въпреки присъствието на пестицида във водата, всички попови лъжички са със сходни отклонения от стандартните стойности за маса към дължина на тялото след четири седмично излагане спрямо началните стойности, което демонстрира успешното им развитие както в контролните аквариуми, така и в присъствието на различните концентрации на Ортива® ТОП SC.

VII. Заключение

Проведените теренни и експериментални проучвания илюстрират прякото и непрякото влияние на пестициди и торове върху видове земноводни, които се срещат в райони на България с интензивна земеделска активност. Относно разпространението на видове земноводни на територията на страната, резултатите демонстрират, че голям процент от популациите на петте защитени вида, върху които анализът беше фокусиран, имат потенциала да бъдат изложени на селскостопански практики, защото голяма част от наблюденията за осемнадесет годишния период на изследването попадат в територии, които се класифицират като земеделски площи. Може да се заключи, че земеделските територии са не по-малко важни от естествените местообитания, което обуславя необходимостта от по-задълбочено проучване с цел изясняване на съществуващи и потенциални консервационни проблеми за земноводните в контекста на селското стопанство и подчертава актуалността на темата на настоящата докторантура.

Относно видовото разнообразие в целевите водоеми, резултатите показват, че и за трите вида, които са регистрирани с помощта на акустични сигнали и наблюдения на терен, се наблюдава по-голяма численост в оризищата, в сравнение с естествения водоем. Постоянно наводнените земеделски площи привличат индивидите, особено в периодите, в които естествените местообитания пресъхват, като това подчертава значението им за популациите на безопашатите земноводни, особено когато става въпрос за химично замърсяване.

Експериментите с амониев нитрат показаха, че торът влияе негативно на оцеляването, активността, растежа и чувствителността към химични сигнали на ларвите на двата вида жаби. При горската дългокрака жаба се наблюдават много по-изявени отрицателни ефекти за оцеляването, растежа и активността, в сравнение с кафявата крастава жаба. Резултатите показват, че селскостопанските практики могат да имат отрицателно въздействие върху разпространени видове в България, като имат потенциала да намалят числеността на популациите и да повлияят на разпространението им. Неспособността и на двата вида да откриват и избягват концентрации на амониев нитрат показва, че е вероятно тези негативни ефекти да се наблюдават в естествената им среда, като е важно да се отбележи, че изследваните концентрации са екологично значими и подобни количества от веществото са долавяни в естествени водоеми.

При експериментите с фунгицида, резултатите показаха, че отрицателните ефекти върху оцеляването на поповите лъжички на горската дългокрака жаба могат да се

наблюдават както при кратко, така и при продължително излагане. Изключително ниски концентрации, много по-ниски от тези, които се срещат на терен, особено в момента на прилагане, са достатъчни, за да се наблюдава смъртност от над петдесет процента при поповите лъжички за период от 48 часа. При хронично излагане с много по-ниски концентрации от установената концентрация на LC_{50} , смъртността продължава да е значително висока. По отношение на движението и телесния индекс се наблюдава тенденция към хиперактивност и ускорен растеж, което предполага, че фунгицидът има потенциал да изменя поведението на поповите лъжички.

VII.1. Основни изводи

1. Голям процент от популациите на петте изследвани вида земноводни (*Triturus cristatus*, *Triturus dobrogicus*, *Triturus ivanbureschi*, *Bombina bombina* и *Bombina variegata*) попада на територията на земеделски площи.
2. Земеделските територии са от основно значение за земноводните в България, което обуславя необходимостта от по-задълбочено проучване.
3. Наблюдава се по-голяма численост на видове безопашати земноводни в оризища, в сравнение с естествени водоеми, особено в периоди на суша, в които селскостопанските площи са изкуствено наводнени.
4. Екологично значими количества амониев нитрат имат изявено негативно влияние върху оцеляването, активността и растежа на горската дългокрака жаба.
5. Негативни ефекти в следствие на амониев нитрат върху кафявата крастава жаба, макар и по-слабо изразени спрямо наблюдаваните при горската дългокрака жаба, се наблюдават в контекста на активността и чувствителността на поповите лъжички към химични сигнали.
6. Горската дългокрака и кафявата крастава жаба нямат способност да доловят вредни за тях количества на амониев нитрат във водата и не показват избягващо поведение.
7. Концентрацията за LC_{50} на поповите лъжички от вида горска дългокрака жаба в следствие на 48-часово излагане на фунгицида Ортива® ТОП SC е в пъти по-ниска от препоръчаната за употреба от производителя.
8. Хроничното излагане на фунгицида Ортива® ТОП SC със значително по-ниски концентрации от изчислената LC_{50} както и тези, които се прилагат в земеделието,

показва висока смъртност и склонност към хиперактивност и ускорен растеж – признаци за поведенчески изменения при поповите лъжички.

Списък с приноси

Научни приноси:

1. За първи път в България е проведено комплексно изследване на влиянието на пестициди и торове върху видовете земноводни в райони с различна степен на антропогенно въздействие.
2. Установена е връзката между земеделските практики и разпространението на пет защитени вида земноводни в България, като е показано, че голяма част от популациите обитават земеделски територии и са изложени на агрохимикали.
3. Доказана е по-висока чувствителност на горската дългокрака жаба (*Rana dalmatina*) към амониев нитрат в сравнение с кафявата крастава жаба (*Bufo bufo*), по отношение на оцеляване, растеж и двигателна активност.
4. Установени са различия в поведенческите реакции на двата вида при експозиция на пестициди, включително способността им да разпознават химични сигнали от хищници.
5. За първи път е изследвана способността на попови лъжички да демонстрират избягващо поведение към тора амониев нитрат, като резултатите показват, че те не могат да доловят вредни за преживяемостта и развитието им концентрации, и не се наблюдава подобно поведение.
5. За първи път са тествани преки токсикологични ефекти на фунгицида Ортива® ТОП SC върху ларвите на горската дългокрака жаба, като са открити негативни ефекти дори при ниски концентрации.
6. Документирани са промени в двигателната активност и ускорен растеж на поповите лъжички при експозиция на фунгицида, което показва косвени ефекти върху метаморфозата.
7. Проучени са експозиционните пътища на пестицидите и торовете в оризища и естествени водоеми, като са установени различия във видовото разнообразие и активността на земноводните в зависимост от средата.
8. Първите по рода си данни за конкретния изследван пестицид могат да служат като обосновка за спирането му от производство и употреба, поради доказаното негативно влияние върху защитени нецелени организми.

Научно-приложни приноси:

1. Получените резултати допринасят за по-доброто разбиране на екологичните рискове от употребата на агрохимикали и могат да бъдат използвани при разработване на устойчиви земеделски практики.
2. Данните за чувствителността на различните видове земноводни към химични вещества могат да послужат като основа за бъдещи мониторингови програми и екологични оценки.
3. Резултатите от изследването могат да подпомогнат институциите, отговорни за опазването на биоразнообразието, при разработване на мерки за защита на земноводните в агроекосистемите.
4. Проучването предоставя научни аргументи за необходимостта от интегриране на оризищата и други земеделски водоеми в стратегиите за опазване на земноводните популации.
5. Разработената методология за лабораторни експерименти с попови лъжички може да бъде прилагана при оценка на токсичността на други химични вещества върху водни организми.
6. Събраните данни могат да се използват при подготовката на образователни и информационни кампании за намаляване на въздействието на пестицидите върху околната среда.

Списък с публикации

- Dimitrova B., Lukanov S.** Contrasting effects of ammonium nitrate on tadpole survival, growth and behavior in two common anuran species. *Ecological Frontiers*, 44, 4, Elsevier, 2024, DOI:<https://doi.org/10.1016/j.ecofro.2024.01.004>, 769-780. JCR-IF (Web of Science): 4.7, Q1, не оглавява ранглистата (Web of Science)*
- Popgeorgiev G., **Lukanov S., Dimitrova B., Naumov B.** Importance of agricultural areas for the distribution of protected amphibian species in Bulgaria. *Acta Zoologica Bulgarica*, 76, 1, 2024, 87-96. JCR-IF (Web of Science): 0.4, Q4 (Web of Science)
- Lukanov, S., Kolev, A., Dimitrova, B., Popgeorgiev, G.** Rice fields as important habitats for three anuran species—significance and implications for conservation. *Animals*, 14, 1, MDPI, 2024, DOI:<https://doi.org/10.3390/ani14010106>, JCR-IF (Web of Science): 2.7, Q1, не оглавява ранглистата (Web of Science)

Списък с цитирания

Dimitrova B., Lukanov S.. Contrasting effects of ammonium nitrate on tadpole survival, growth and behavior in two common anuran species. *Ecological Frontiers*, 44, 4, Elsevier, 2024, DOI:<https://doi.org/10.1016/j.ecofro.2024.01.004>, 769-780

Цитира се в:

Zamora-Camacho F.J., Aragón P. 2024. Increased temperature and exposure to ammonium alter the life cycle of an anuran species. *Ecology and Evolution* 14: e70685, @2024

Списък с участията в научни форуми

Участия с доклад:

1. **Dimitrova B.**, Lukanov S. 2023. Negative effects of high concentrations of ammonium nitrate on survival, growth and activity in *Rana dalmatina* tadpoles are not reflected in high avoidance. 22nd European Congress of Herpetology, 04–08 September 2023, Wolverhampton, United Kingdom.
2. Kolev A., **Dimitrova B.**, Popgeorgiev G., Lukanov S. 2023. Passive acoustic monitoring of two common anuran species across natural and agricultural habitats. 4th Interdisciplinary PhD forum with international participation, 16–19 May 2023, Sandanski, Bulgaria. http://edu.bas.bg/documents/2023_01_13_forum/progr.pdf

Участия с постер:

- Popgeorgiev, G., Naumov, B., **Dimitrova, B.**, Lukanov, S. 2022. Importance of agricultural habitats for the distribution of the European fire-bellied toad across Bulgaria – implications and perspectives. 21st European Congress of Herpetology, 04–09 September 2022, Belgrade, Serbia. https://seh-congress-belgrade2022.shdmr.org/fileadmin/user_upload/Book_of_Abstracts_SEH_2022_Belgrade.pdf

Impact of Pesticides on Amphibian Species from Water Bodies with Varying Degrees of Anthropogenic Influence in Central Bulgaria

PhD Thesis Summary

Blagovesta Dimitrova

Institute of Biodiversity and Ecosystem Research – BAS

Supervisor: Assoc. Prof. Simeon Lukanov, PhD

This dissertation investigates the direct and indirect effects of pesticides and fertilizers on amphibian species in areas with varying degrees of agricultural activity in Central Bulgaria. The study focused on five key aspects: species distribution in agricultural landscapes, water quality assessments, species diversity analysis, and laboratory experiments examining the impacts of ammonium nitrate and the fungicide Ortiva® TOP SC on amphibian larvae.

Mapping the distribution of five protected amphibian species in Bulgaria for eighteen years (2004–2022) revealed that most populations inhabit agricultural lands, exposing them to intensive farming practices, including pesticide use. Acoustic monitoring in two rice fields and a nearby natural pond near Plovdiv showed higher amphibian abundance in rice fields, emphasizing the importance of these artificial wetlands as breeding habitats. Water analysis from these sites indicated that most parameters met national standards, although elevated nitrate concentrations raised concerns. These findings justified selecting ammonium nitrate for further laboratory testing.

Laboratory experiments assessed the effects of ammonium nitrate and Ortiva® TOP SC on the larvae of the agile frog (*Rana dalmatina*) and the common toad (*Bufo bufo*). Ammonium nitrate exposure resulted in significantly higher mortality, reduced growth, and impaired swimming activity in *R. dalmatina* compared to *B. bufo*, indicating greater sensitivity in the agile frog. Environmentally relevant concentrations of Ortiva® TOP SC also caused significant mortality in *R. dalmatina*, with LC₅₀ values lower than the recommended application rates, suggesting a potential environmental threat. Although swimming activity was less affected by the fungicide, higher concentrations triggered increased movement, potentially leading to higher predation risks in natural settings.

The study highlights the vulnerability of amphibian populations to agricultural pollutants, particularly during sensitive developmental stages. It underscores the need for targeted conservation measures and more sustainable agricultural practices to mitigate the impacts of chemical use on amphibian biodiversity in agricultural landscapes.