

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО БИОРАЗНООБРАЗИЕ И ЕКОСИСТЕМНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ

**ОСОБЕНОСТИ НА ЗИМУВАНЕТО НА ПЕЩЕРОЛЮБИВИ ВИДОВЕ
ПРИЛЕПИ В БЪЛГАРИЯ В КОНТЕКСТА НА ГЛОБАЛНИТЕ КЛИМАТИЧНИ
ПРОМЕНИ**

**АВТОРЕФЕРАТ
НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД**

на Ния Любенова Тошкова

за придобиване на научна и образователна степен “Доктор”

Научна специалност: 02.22.01 “Екология и опазване на екосистемите”



© Александър Николов

Научен ръководител: проф. д-р Васил Попов

София, 2025 г.

Дисертацията е разработена в рамките на редовна докторантура в Института по биоразнообразие и екосистемни изследвания - БАН. Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на разширено заседание на отдел "Екосистемни изследвания, екологичен риск и консервационна биология" при Института по биоразнообразие и екосистемни изследвания, БАН, състояло се на 17/03/2025 г.

Дисертационният труд е с общ обем 148 страници и съдържа 6 основни раздела, включително 12 таблици и 36 фигури. Списъкът на цитираната литература съдържа 253 заглавия.

Защитата ще се състои онлайн в платформата „Zoom“ на 04/07/2025 от 14:00 ч.

Научното жури е назначено със Заповед от Директора на ИБЕИ-БАН и е в състав:

Вътрешни членове:

1. доц. д-р Теодора Иванова Тодорова (ИБЕИ-БАН) - председател
2. доц. д-р Хелиана Иржи Дундарова (ИБЕИ-БАН) – рецензент

Външни членове

3. проф. д-р Диана Пенева Златанова (БФ, СУ „Св. Климент Охридски“) – рецензент
4. проф. д-р Стефан Въчев Панайотов (НЦЗПБ) - рецензент
5. проф. д-р Николай Добринов Начев (ШУ „Епископ Константин Преславски“) – рецензент

Материалите по защитата са на разположение на интересуващите се в библиотеката на Института по биоразнообразие и екосистемни изследвания при БАН, база 1.

I. УВОД

Разбирането на реакциите на видовете към изменението на климата е от съществено значение за оценката на тяхната уязвимост и разработването на ефективни стратегии за тяхното опазване. Въпреки това, изследванията в тази област често са ограничени както географски, така и таксономично. Поради своите физиологични особености прилепите са особено чувствителни към промените в околната среда (Korine et al., 2016), но въпреки това остават недостатъчно проучени в много райони (Festa et al., 2022). Това ограничава нашето разбиране за настоящето и бъдещето им състояние. Колебанията в температурата и количеството на валежите, свързани с климатичните промени, могат да повлияят на тяхната екофизиология, разпространение и в крайна сметка – на способността им за дългосрочно оцеляване. Това е особено критично за чувствителни периоди от жизнения им цикъл, какъвто е хибернацията.

Хибернацията е широко разпространен и ефективен адаптивен механизъм, който позволява на прилепите да преживяват суровите зимни условия и/или недостигът на хранителни ресурси. Много прилепи са факултативни хетеротермни животни, което означава, че са способни драстично да редуцират температурата на тялото и метаболизма си, състояние известно като торпор (Speakman and Thomas, 2003; Geiser, 2004). По време на торпор значително се забавят сърдечният ритъм, дишането и кръвообращението.

Торпорът може да бъде както краткотраен, така и продължителен. По време на хибернация прилепите преминават през дълги периоди на дълбок торпор, които могат да продължат няколко седмици, редувайки се с кратки периоди на събуждане (Ransom, 1990). Излизането от състояние на торпор представлява значително физиологично предизвикателство за хиберниращите бозайници, като консумацията на кислород от организма нараства над осем пъти в сравнение с активното състояние. (Lee and Park, 2002). Това води до увеличени нива на оксиданти, което може да предизвика дисбаланс и окислителен стрес, увреждане на биомолекули, клетъчна смърт и увреждане на тъкани (Halliwell, 1994; Betteridge, 2000). Маркерите за оксидативен стрес са ключови за разбирането на физиологичните процеси по време на хибернация и предоставят информация за общото здравословно състояние на организмите (Isaksson, 2010; Schneeberger et al., 2013; Beaulieu and Costantini, 2014).

Известно е, че поддържането на дълготраен торпор е от решаващо значение за оцеляването на хиберниращите бозайници (Németh et al., 2009; Reeder et al., 2012), а топлите условия оказват различно въздействие върху различните видове (Wells et al., 2022). Прилепите изразходват около 70 – 80% от зимните си енергийни запаси по време на излизанията си от състояние на торпор (Kayser, 1953), като критично ниските нива на запаси водят и до повишена активност (Brigham, 1987). Това подчертава необходимостта от задълбочени изследвания върху моделите на активност на различните популации и видове не само в контекста на климатичните промени, но и с оглед на фундаменталните аспекти на тяхната физиология и екология, които все още са слабо проучени.

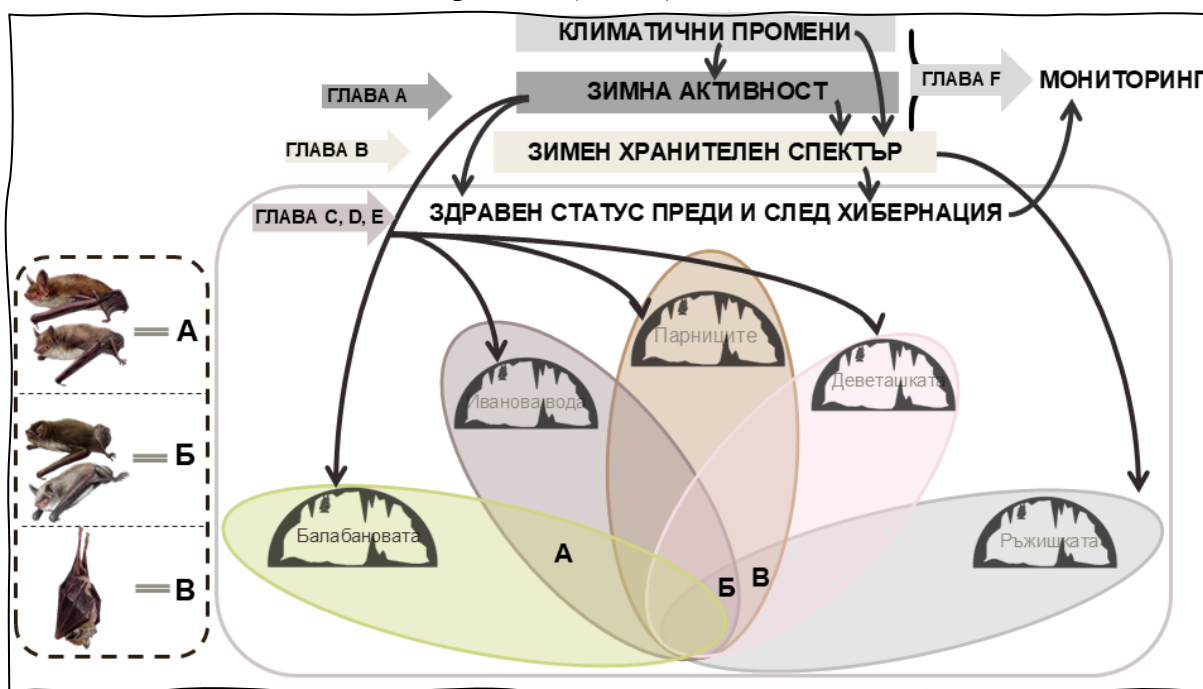
В България са известни над 100 подземни местообитания, които са от национално и международно значение за опазването на прилепните популации. Въпреки значителните усилия за мониторинг и опазване, състоянието на дори най-важните прилепни колонии остава неясно. Липсват данни за зимната активност и здравния статус на прилепите в България, а изследванията по темата в Европа са малобройни и фрагментирани. Основно изследванията в тази област са съсредоточени в Северна

Америка и обхващат Болестта на белия нос (WND) (Ford et al., 2011; Brownlee-Bouboulis and Reeder, 2013; Bernard and McCracken, 2017; Jackson et al., 2022).

В отговор на този недостиг в познанията, настоящата дисертация се фокусира върху зимната активност на прилепите в България, като полага основите за систематични и дългосрочни екофизиологични изследвания в тази област. На фона на наблюдаваните през последните десетилетия тенденции за по-топли зими в Европа, настоящото изследване представлява стъпка към разбирането на тяхното влияние. Макар че в рамките на един дисертационен период е трудно да се събере достатъчно информация за подобни процеси, особено при липсата на предходни данни, този труд създава основа за бъдещи дългосрочни проучвания. Те биха могли да подпомогнат както изучаването на промените в състоянието на прилепите, така и усилията за тяхното опазване.

II. ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящата дисертация е да се идентифицират и анализират особеностите на зимуване при пещеролюбиви видове прилепи в България, във връзка с влиянието на климатичните промени (Фиг. 1).



Фигура 1. Концептуална рамка на дисертационния труд. Представена е схема на взаимовръзките между отделните изследователски насоки. Стрелките посочват изпълнението на отделните задачи по обекти, както и съответните глави от дисертационния труд, в които са представени резултатите. Диаграмата на Вен илюстрира видовото припокриване на прилепите в изследваните пещери: А = *Myotis myotis* и *M. blythii*, Б = *M. capaccinii* и *Miniopterus schreibersii*, В = *Rhinolophus ferrumequinum*. Илюстрациите на видовете са дело на Toni Llobet.

За постигането на целта на дисертацията, бяха поставени следните задачи:

- 1) Изследване и установяване на моделите на зимна активност на прилепите.
 - Хипотезите по задача 1 се базираха на следните предположения: (1) различните видове прилепи проявяват специфични и различаващи се нива на активност през зимата; (2) прилепите, зимуващи в пещери на по-голяма надморска височина

проявяват по-ниски нива на зимна активност; (3) външната температура няма да оказва влияние върху вътрешните температури на пещерите, където зимуват прилепите; (4) прилепите ще проявяват определени модели на активност, свързани с температурните колебания извън пещерите, като се очаква по-висока активност през по-топлите зимни нощи.

2) Изследване на хранителната активност и хранителния спектър на прилепите през зимата.

- Хипотезите по задача 2 бяха: (1) прилепите са активни през зимата и се хранят извън пещерите; (2) през различните периоди от зимата прилепите проявяват различни нива на активност и интензивност на хранене, което може да се установи чрез количеството натрупано гуано под колониите; (3) хранителните предпочитания на прилепите се определят от моментното обилие на насекомите, които са потенциална плячка; (4) в района на изследваната пещера има комплекс от насекоми, активни през зимата.

3) Оценка на здравния статус на прилепи в изследваните обекти преди и след хибернация, както и влиянието на активността върху ключови физиологични параметри.

- Хипотезите по задача 3 включваха следните предположения: (1) популациите на различните видове ще показват различни нива на готовност за хибернация (натрупване на мастни резерви) и ще изразходват енергийните си запаси с различна скорост в зависимост от условията на средата; (2) индексът на увреждане на крилните мембрани ще варира при различните видове преди и след хибернация, като индивидите с по-висок индекс на увреждане ще имат по-нисък индекс на телесната маса; (3) уврежданията на крилните мембрани ще се увеличават по време на хибернация, особено при видове, засегнати от болестта на белия нос (WND), а видовете с по-висока зимна активност ще възстановяват по-ефективно уврежданията на крилната си мембрана; (4) количеството на зъбна плака ще се увеличава по време на хибернация поради намалената хранителна активност и продължителната неактивност; (5) ще има положителна корелация между степента на износване на зъбите и количеството зъбна плака; (6) ектопаразитното натоварване ще намалява по време на хибернация; (7) нивата на маркерите за оксидативен стрес (малондиалдехид, глутатион, маркер за ДНК-увреждане) ще варират преди и след хибернация.

4) Оптимизиране на методите за мониторинг на прилепите с цел по-ефективно и обстойно събиране на данни за влиянието на климатичните промени върху тях.

- Оптимизацията на методите за мониторинг беше осъществена въз основа на собствени изследвания, критичен преглед на литературни източници и активно участие в дискусии на панели и работни срещи в рамките на COST-акцията „Climate change and bats: from science to conservation“ (CLIMBAT, CA18107).
- Изработената методика е добавена като приложение със заглавие „Събиране на данни и оценка на въздействието на климатичните промени върху прилепите в България“ към националната методика за мониторинг и оценка на състоянието на пещеролюбиви видове прилепи (глава III.F от дисертацията).

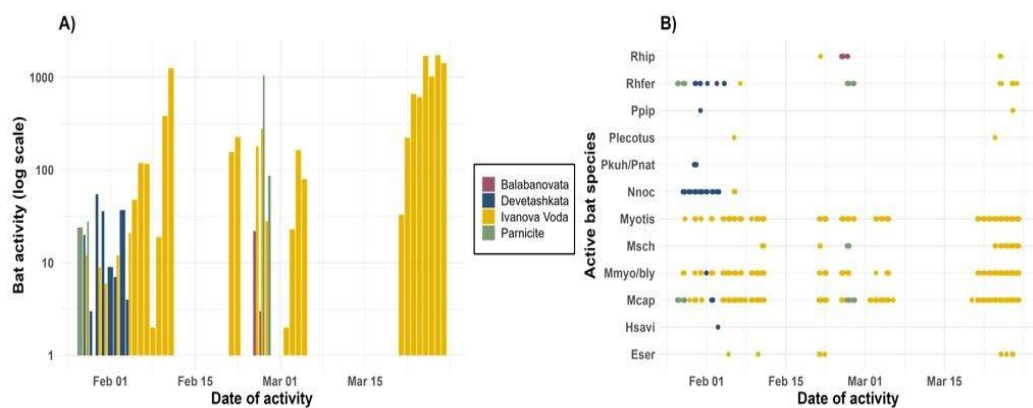
III. ОСНОВНИ ГЛАВИ (ПРЕДСТАВЕНИ КАТО ПУБЛИКАЦИИ) ОТ ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

A: Активност на пещеролюбивите прилепи през зимата в България, публикация със заглавие „Winter is (not) coming: Acoustic monitoring and temperature variation across important bat hibernacula“

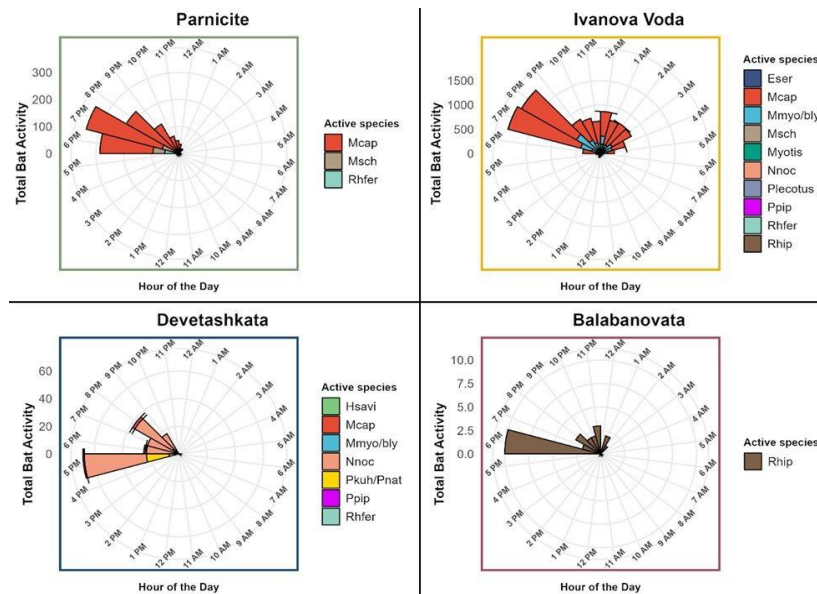
Резюме на публикацията: Малко се знае за зимната активност на прилепите в България, което поставя предизвикателства пред мониторинга на потенциалните отклонения в поведението им вследствие на затоплянето на климата. Използвайки пасивен акустичен мониторинг зимната активност беше изследвана в някои от най-големите зимни убежища в Европа. Резултатите разкриват специфични за пещерите и видовете модели на активност. Активността беше наблюдавана през всеки месец от изследването, с ясно изразени пикове в определени дни. В един от обектите на висока надморска височина активността на прилепите беше ограничена до една-единствена нощ, докато най-високата обща активност се наблюдаваше в обекта, разположен на най-голяма надморска височина (1325m). Най-активният вид беше *Myotis capaccinii* (Bonaparte, 1837). Макар че прилепите бяха активни предимно след залез слънце, следвайки обичайния си циркаден ритъм, беше наблюдавана и известна дневна активност, включително активност при температури до -8°C. На местата с достатъчно данни за активността, външната температура се оказва значим положителен предсказващ фактор за активността на прилепите, като по-високите температури бяха свързани с повишена активност. Данните също така показват, че прилепите рядко се хранят в близост до входовете на пещерите. Наблюдаваната разнородност в нивата на активност между изследваните обекти подчертава необходимостта от данни с висока резолюция, специфични за конкретното местообитание, вместо широки обобщения.

Материали и методи: През 2022 г. беше извършено визуално преброяване на прилепите в изследваните убежища с цел документиране на видово разнообразие и численост преди стартиране на акустичния мониторинг. Колониите бяха фотографирани и количествено оценени. Пасивният акустичен мониторинг беше осъществен с детектори Anabat Swift и Audiomoth, позиционирани в близост до входовете на пещерите Иванова вода, Парниците, Балабанова и Деветашка. Записите обхванаха 196 денонощия между януари и март 2022 г. Ехолокационните звуци бяха записани като full-spectrum файлове (WAC), конвертирани до WAV и анализирани със софтуера Kaleidoscope (версия 5.6.6). Прилепна активност беше измервана като брой 5-секундни файлове с повече от 2 прилени сигнала. Идентификацията на видовете се извърши ръчно и бяха използвани референтни звуци от определител за сравнение. Бяха събрани данни от шест морфологични параметъра на звуците. Представителни звуци (n=279) са архивирани в базата данни ChiroVox. Данни за външна температура бяха изтеглени от моделните данни ERA5 (ECMWF) за всяко убежище, с резолюция от 0.1°. Вътрешната температура на пещерите беше регистрирана два пъти дневно с температурни датчици (iButton), разположени близо до основните колонии. В допълнение, в три от обектите бяха събрани температурни данни от вградения температурен сензор на детекторите Anabat Swift, благодарение на които бяха прецизно отчетени реалните температури по време на активността на прилепите. Всички анализи и визуализации бяха извършени в софтуер R (версия 4.1.1). Отрицателна биномна регресия (zero-inflated NB) беше използвана, за да се оцени влиянието на външната и вътрешната температура върху активността на прилепите (пакети *MASS* и *pscl*). За корелации между температури беше приложена линейна регресия.

Резултати: Теренните изследвания разкриват специфични за пещерите и видовете модели на активност (Фиг. 2А). Активността беше наблюдавана през всеки месец от проучването, като се наблюдаваха пикове в определени дни. В пещерата Балабанова дупка (1285 m) активността на прилепите беше ограничена до една-единствена нощ, докато най-високата обща активност беше регистрирана в пещерата Иванова вода, разположена на най-високата надморска височина от всички изследвани обекти (1325 m). Най-активният вид през зимата, установен при сегашното проучване се оказа *Myotis saraccinii* (Фиг. 2В). Разликите в нивата на активност между изследваните обекти подчертават необходимостта от данни с висока резолюция, специфични за конкретното място, вместо генерални обобщения. Данните показаха, че прилепите са активни предимно след залез слънце, следвайки обичайния си циркаден ритъм, като активността беше най-интензивна след залез слънце и продължава до около 02:00 ч (Фиг. 3). Беше отчетена и активност през деня.

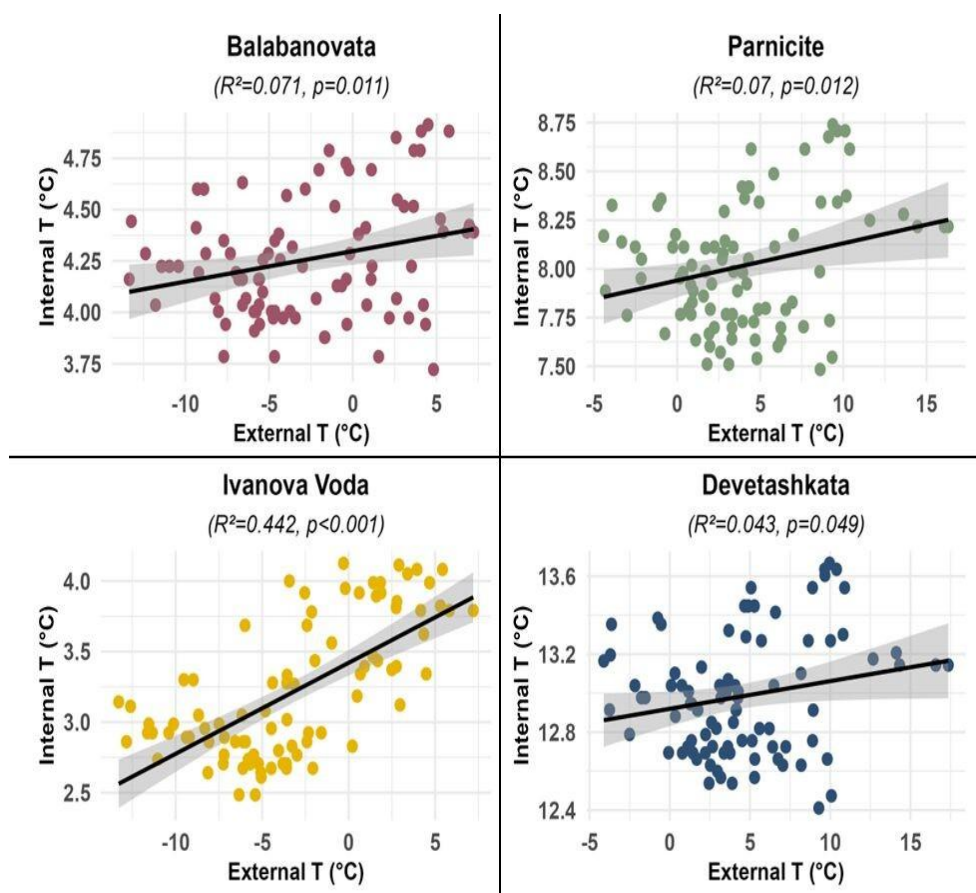


Фигура 2. (А) Общ модел на активността на прилепите през периода на изследване във всяка пещера. Активността е оценена чрез броя на звукозаписите, съдържащи поне два ехолокационни сигнала. (В) Видово специфични модели на активност за всяко от убежищата.



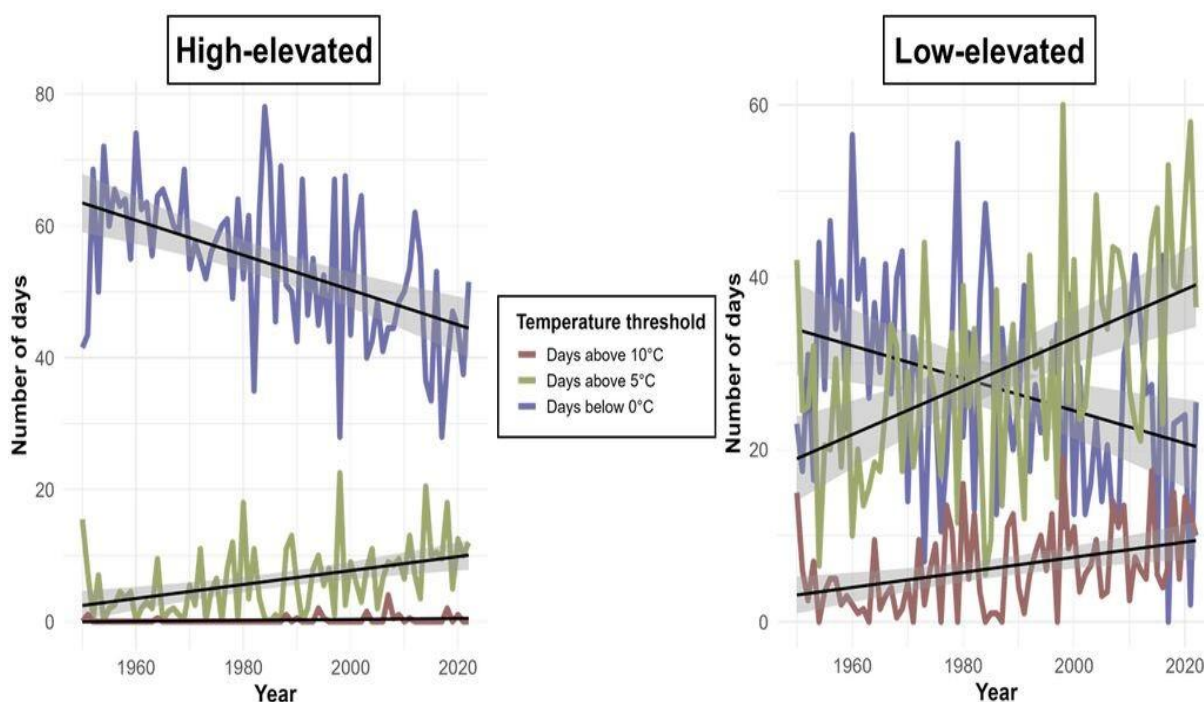
Фигура 3. Денонощна активност на видовете прилепи в изследвани пещери. Всеки участък отразява общата активност на даден вид във всеки час от денонощието. Оста x показва времето от деня във 12-часов формат (AM/PM), а оста y – активността, измерена чрез броя звукови записи, съдържащи поне два ехолокационни сигнала.

Въпреки че активност беше регистрирана при температури до -8°C , външната температура се оказва значим положителен фактор за активността на прилепите: по-високите температури се свързваха с повишена активност. Пещерите осигуряват стабилни вътрешни условия, които са от съществено значение за хибернацията на прилепите. Повечето от изследваните обекти, включително Балабановата, Парниците и Деветашката, показват ниски стойности на коефициента на корелация, което сочи за минимално влияние на външната температура върху вътрешния микроклимат. Това предполага, че местата за хибернация в тези пещери са ефективно изолирани от външните температурни колебания. За разлика от тях, в Иванова вода се наблюдава по-силно въздействие на външните температурни промени върху вътрешните условия, което може да обясни и повишената летателна активност на прилепите в тази пещера (Фиг. 4).



Фигура 4. Корелация между външната средна дневна температура и вътрешната температура в пещерите, където хибернират прилепите.

Анализът на историческите данни за температурите в районите на изследваните пещери показват отчетлива тенденция към по-меки зимни условия, с намаляване на броя на студените дни и увеличаване на тези с по-високи температури (Фиг. 5). Тъй като настоящите изследвания показват, че външната температура е основен фактор, влияещ върху активността на прилепите, особено в убежища, където външните температури оказват по-силно въздействие върху вътрешните условия, можем да очакваме удължаване на активния им период.



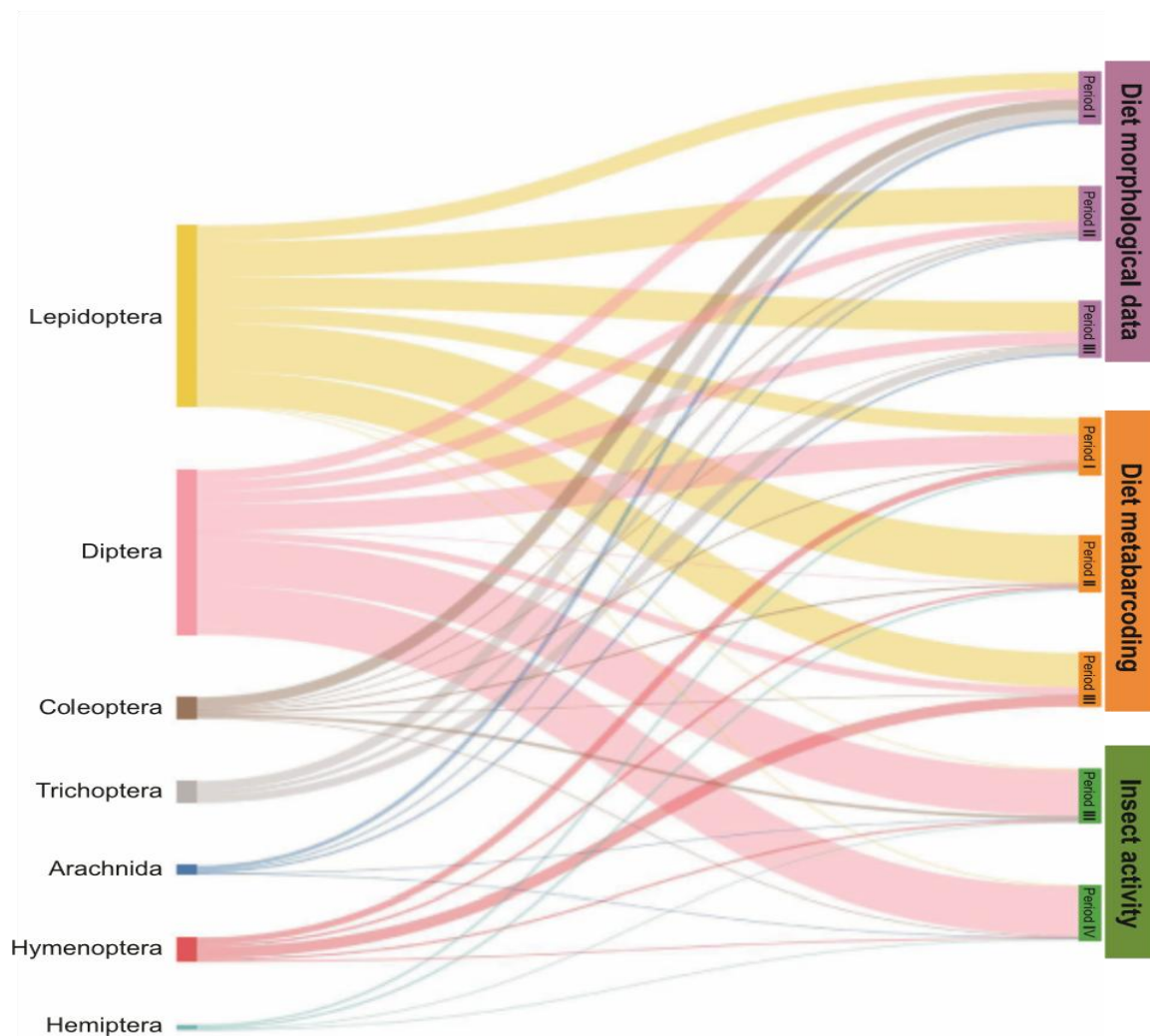
Фигура 5. Исторически температурни тенденции за високопланинските (Иванова вода и Балабановата) и нископланинските (Парниците и Деветаишката) зимни убежища. Представен е броят на дните с температури над прагове, смятани за важни за активността на прилепите. Наблюдава се намаляване на броя на дните с температури под 0 °C и увеличение на дните с температури над 5 °C и 10 °C.

В: Хранителен спектър на пещеролюбивите прилепи през зимата в България, публикация със заглавие: „Snacking during hibernation? Winter bat diet and prey availabilities, a case study from Iskar Gorge, Bulgaria“

Резюме на публикацията: По-доброто разбиране за това как фенологията на прилепите и насекомите се влияе от условията на околната среда и как това може да се отрази на физическото им състояние е от съществено значение в условията на променящия се климат. Изследвахме зимния хранителен спектър на пещерния дългокрил (*Miniopterus schreibersii* Kuhl, 1817) от пещера Ръжишката, Стара планина, България, по време на четири периода на пробовземане през зимата на 2021 г. (края на януари – края на март). Прилепното гуано беше анализирано посредством комбинация от ДНК-метабаркодинг и микроскопски морфологичен анализ. Освен това, с помощта на капани за улавяне на насекоми в полет (FIT), беше проследено наличието на плячка в района на пещерата. Резултатите показват, че прилепите се хранят активно извън пещерата и не използват пещерната фауна. Хранителният спектър варира през отделните периоди на изследването, като през два от периодите най-разпространеният разред насекоми беше Diptera, но прилепите предпочитаха Lepidoptera и Hymenoptera. Тези резултати бяха потвърдени и от метабаркодинга, който откри наличие на насекоми с дневна активност в пробите. Температурните датчици показаха силна корелация между външната температура и температурата в пещерата, което вероятно влияе върху моделите на активност на прилепите. Това изследване е първото по рода си в България и предоставя ценна информация за зимната активност и хранителния спектър на прилепите. Тези данни могат да послужат като основа за бъдещи изследвания на зимната активност на прилепите и активността на насекомите в контекста на променящите се климатични условия.

Материали и методи: Изследването беше проведено в района на Искърския пролом (Стара планина, България), в Ръжишката пещера (43.09008°N, 23.38507°E; 575 m н.в.), която попада в рамките на природен парк „Врачански Балкан“. Основен обект на изследването беше *Miniopterus schreibersii*, формиращ голяма зимуваща колония с численост между 600 и 2000 индивида. Видът е включен в Червената книга на България и в списъка на IUCN като уязвим. Пробите от гуано бяха събирани в три периода между януари и март 2021 г. чрез разполагане на капан за гуано (полиетиленово фолио с размери 3×4 m) под колонията. След всяко пробовземане фолиото се подменяше, за да се избегне замърсяване на пробите между периодите. Посредством морфологичен-микроскопски анализ бяха анализирани 254 проби гуано, подбрани на случаен принцип. Всяка фекална пелета беше накиснат в 70% етанол и подложен на микроскопско изследване (20–40×) след добавяне на глицерин. Идентификацията на фрагменти от насекоми се извърши до възможно най-ниско таксономично ниво с помощта на ентомологични ключове. Относителният дял на всички разреди насекоми, в хранителния, спектър беше изчислен като процентно присъствие в пробите (%F). За метагеномния анализ бяха организирани сборни проби с по 100 пелети гуано от всеки изследван период. След изсушаване на пробите и хомогенизация, беше изолирано и амплифицирано ДНК посредством COI-метабаркодинг (mlCOIintF и jgHCO2198 праймери). Индексираните ампликони бяха секвенирани чрез Illumina MiSeq (2×250 bp). Биоинформатичната обработка включваше качествен контрол на данните, клъстериране на OTU (при 97% идентичност), премахване на химерни последователности и идентификация чрез база данни BOLD и BLAST. В района около пещерата, на височина между 7 и 9 m, бяха поставени 12 капана за улавяне на насекоми в полет (FIT) без атрактанти. Събирането на материалите от капаните се извърши в два от периодите (II и III) на събиране на пробите от гуано. Насекомите бяха определени до разред и запазени за таксономична идентификация. Климатичните данни бяха извлечени от ERA5 (ECMWF Reanalysis). Данните отговарят на координатите на обекта. Вътрешната температура в пещерата беше измервана два пъти дневно посредством температурни датчици (iButton). Зависимостта между външната и вътрешната температура беше изчислена с линейна корелация на Пирсън.

Резултати: В резултат на метабаркодинга бяха идентифицирани 215 оперативни таксономични единици (OTU). След съвместна работа с екип от таксономи, бяха елиминирани гъбни таксони, едноклетъчни организми, нематоди, земни червеи, паразити и таксони със строго извънпалеарктично разпространение, останаха 66 таксона, регистрирани като част от хранителния спектър на колонията. Беше установено, че прилепите се хранят активно извън пещерата и не включват в хранителния си спектър пещерна фауна. Анализът на пробите показва сезонни промени в хранителния спектър. Въпреки че в два от периодите най-разпространеният разред насекоми беше Diptera, прилепите се хранеха предимно с Lepidoptera и Hymenoptera (Фиг. 6). Метабаркодирането потвърди тези наблюдения и разкри наличието на дневноактивни насекоми в пробите, което предполага и дневна активност на прилепите. Температурните датчици отчетоха силна корелация между външната температура и температурата в Ръжишката пещера, където се намираше колонията, което вероятно влияе върху моделите на активност на прилепите.



Фигура 6. Обобщени резултати за относителната численост на таксоните, установени чрез метабаркодирание и морфологичен анализ на проби от прилепно гуано. Представени са и данни за активността на насекомите в изследвания район.

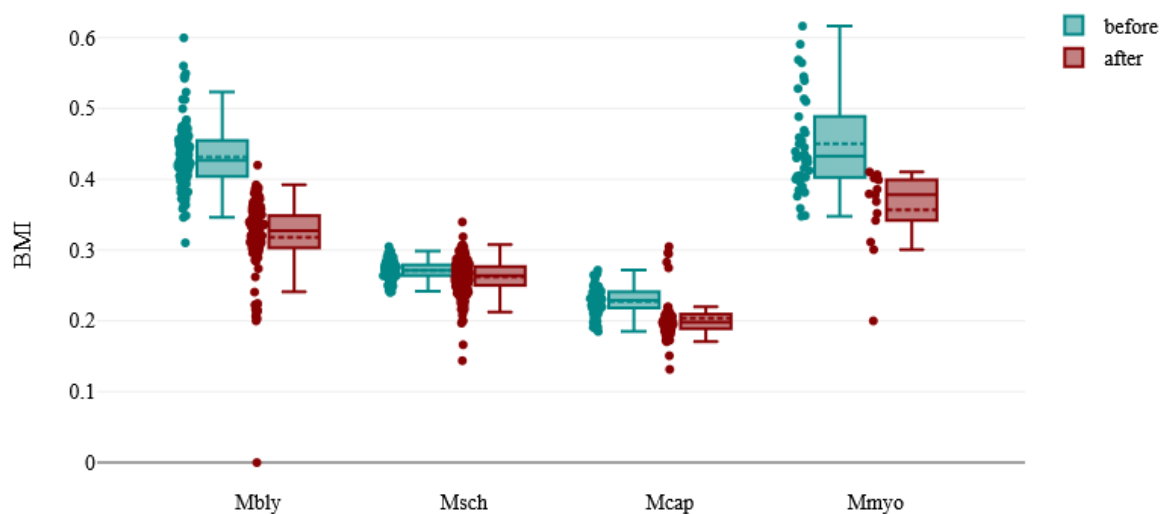
С: Здравен статут на прилепите в изследваните обекти преди и след хибернация, чернова с примерно заглавие „Oxidative stress levels and health biomarkers in hibernating bats: Insights from pre- and post-hibernation surveys in key underground roosts“

Резюме на публикацията: Оценката на здравния статус на дивите животни е от ключово значение за разбирането на техните популационни динамики, екологичната стабилност и въздействието на факторите на средата. В България систематичните данни за здравния статус на бозайниците, включително прилепите, остават оскъдни. Като биоиндикатори с национално и международно значение, прилепите изискват целенасочени изследвания в тази насока, за да се подпомогнат усилията за тяхното опазване. Общо 728 индивида бяха изследвани (след $n=326$ и преди хибернация $n=402$) от пет зимни убежища. Беше установен значителен спад в индекса на телесната маса (BMI) в края на хибернационния период при *Myotis blythii*, *Myotis capaccinii* и *Myotis myotis*, особено в пещерите, разположени на голяма надморска височина. Популациите на *M. blythii* от Иванова вода показаха най-голяма загуба по отношение на BMI, докато отделните популации на *Miniopterus schreibersii* демонстрираха леки намаления, увеличения или оставаха без промяна по отношение на индекса. Увреждането на крилата се увеличаваше след

хибернация само при *M. schreibersii*, докато ектопаразитното натоварване намаля при всички изследвани видове. Преди хибернация прилепите с по-висок BMI имаха по-ниска вероятност да имат ектопаразити. Износването на зъбите корелираше с нивата на зъбна плака, но хибернацията не водеше до увеличено натрупване на плака. Въпреки продължителната неактивност, липидната пероксидация остана стабилна, ДНК-уврежданията намаляват, а нивата на антиоксиданти се увеличават. Това предполага, че хибернацията може да подпомага възстановяването от окислителни увреждания и подчертава сложните физиологични реакции и адаптации на прилепите, свързани с този период. Дългосрочното проследяване на тези параметри е от съществено значение за разбирането на влиянието на климатичните промени върху здравето и оцеляването на прилепите.

Материали и методи: Изследването беше проведено в пет зимни прилепни убежища в България: Голяма Балабанова, Иванова вода, Деветашка пещера, Парниците (Долен Парник) и Ръжишката пещера. Събирането на проби се осъществи преди и след хибернация през зимата на 2020–2022 г., като прилепите бяха улавяни с капан на Тътел на входовете на пещерите. След идентифициране на уловените видове беше определян полът, възрастта, репродуктивното състояние, телесна маса и дължината на предмишницата, като на базата на тези два показателя беше изчисляван и индексът на телесна маса (BMI). Бяха сравнени стойностите на BMI преди и след хибернация за оценка на енергийните загуби. Външното здравословно състояние беше оценявано чрез определяне на степен на оплешивяване, зъбно износване и наличие на зъбна плака по модифицирана методика. Присъствието на ектопаразити и гъбния патоген (*Pseudogymnoascus destructans*) беше установявано визуално. От вида *Myotis blythii* бяха събрани проби от урина и тъканни проби за анализ на нивата на маркери за окислителен стрес. Бяха измервани нивата на глутатион (GSH), малондиалдехид (MDA) и увреждане на ДНК (8-OHdG). GSH и MDA се анализираха в тъканни проби чрез спектрофотометрични методи, а 8-OHdG – посредством ELISA. Всички проби се съхраняваха при -20°C до лабораторните дейности. Статистически анализи бяха извършени с помощта на софтуера R (версия 4.1.1). Използвани бяха корелационни анализи, ANOVA, U-тест, Краскал-Уолис, логистична регресия и χ^2 -тестове.

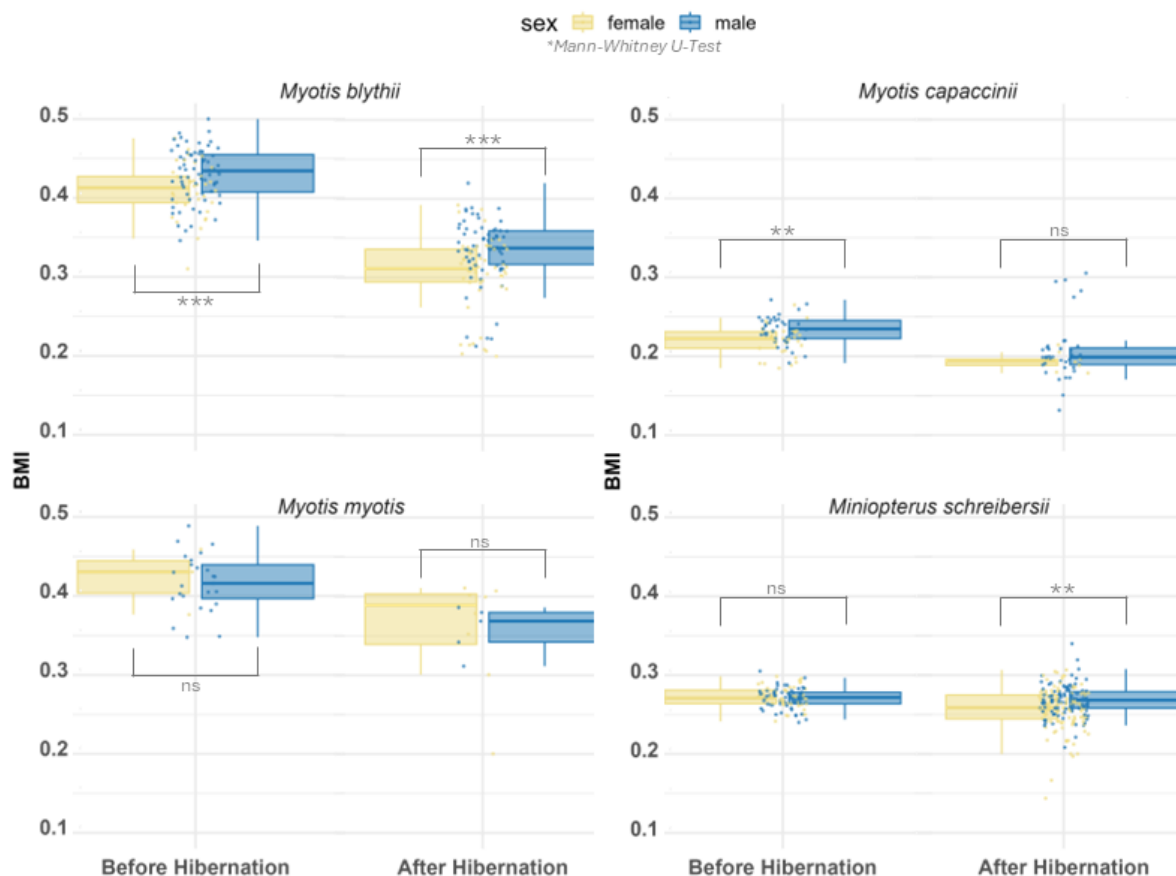
Резултати: След хибернация средният BMI намалява при всички изследвани видове прилепи, но значими разлики се наблюдават само при някои видове (Фиг. 1). Получените резултати подчертават, че ефектът от хибернацията върху телесната маса варира както между видовете, така и между различните пещери, вероятно в резултат на различия в летателната, хранителната активност и енергийните нужди през зимата. Може да се спекулира и евентуална адаптацията към по-меките климатични условия. Популациите на *Myotis blythii* от Балабановата и Иванова вода показват съществена загуба на BMI, като ефектът е силно изразен според критериите на Коен (Cohen, 1988). Подобна тенденция се наблюдава и при *M. capaccinii* от Иванова вода, докато при популациите в Парниците промяната не е значима. Колонията на *Myotis myotis* от Иванова вода също демонстрира значително намаление с голям ефект. При *M. schreibersii* резултатите са по-разнообразни – в Ръжишката пещера е отчетено значимо намаление с умерен ефект, докато в Парниците и Деветашката разликите не са статистически значими.



Фигура 7. Вариации в индекса на телесната маса (BMI) при различните видове преди и след хибернация.

При *M. blythii* от Балабановата дупка беше установено, че започва хибернационния период с по-нисък индекс в сравнение с популациите на същият вид от Иванова вода, които са в по-добро състояние. Въпреки това, в края на зимата енергийните загуби на прилепите от Балабановата са по-ниски и индивидите имат по-високи средни нива на BMI, в сравнение с тях при прилепите от Иванова вода загубите са значително по-големи. Тези разлики вероятно се дължат на вариациите в нивата на активност между двете пещери и адаптациите на колонии към специфичните условия на средата в тях.

Изследвани бяха междуполовите различия в натрупването на телесни мазнини преди зимата и в изразходването на тези запаси по време на хибернацията (Фиг. 8). Установено беше, че при някои видове и популации мъжките и женските индивиди на прилепите се различават по количеството натрупани мастни резерви и тяхното изразходване през зимния период. Въпреки че и двата пола следват сходни тенденции в изчерпването на мазнини, процесите протичат по различен начин. При *M. blythii* мъжките индивиди имат по-високи нива на BMI преди хибернация, като тази тенденция се запазва и след хибернация. При *M. capaccinii* се наблюдава подобна ситуация, но разликите между половете след хибернация не са статистически значими. При *M. schreibersii* не се наблюдават разлики между половете преди хибернация, но след нея загубите при женските индивиди са по-големи. Данните за *M. myotis* не показват разлика между изразходването и първоначалното натрупване на енергийни запаси, което може да се дължи на малкия размер на извадката за този вид.



Фигура 8. Ефекти от състоянието на хибернация и пола върху индекса на телесна маса (BMI) при изследваните видове прилепи. Разликите между половете в натрупването и изчерпването на мастни запаси варират в зависимост от вида и сезона.

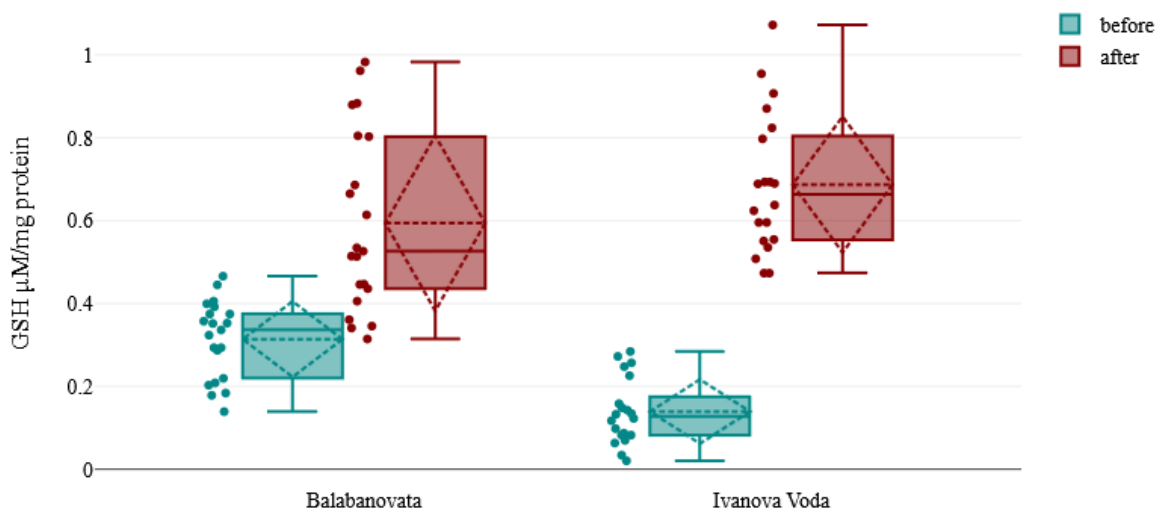
Беше изследвана връзката между индекса на увреждане на крилните мембрани (WDI) и индекса на телесна маса (BMI) при прилепите. Корелационният анализ разкри различни степени на зависимост между тези два показателя в зависимост от вида. При *M. blythii* и *M. schreibersii* беше установена значима отрицателна корелация, докато при *M. capaccinii* и *M. myotis* не беше наблюдавана статистически значима връзка. Тези резултати показват, че степента на зависимост между индексите BMI и WDI е видово специфична, като при някои видове се наблюдава по-силна корелация, а при други – по-слаба или липсваща такава. Това може да се дължи на разлики в нивата на активност, които от една страна могат да водят до повишен риск от наранявания на крилните мембрани, но от друга страна по време на активност регенерационните процеси се нормализират. Интересно наблюдение беше, че при част от повторно уловените индивиди с ниски нива на активност, след края на хибернацията дупката в крилната мембрана, причинена от събраната тъканна проба в началото на зимния период, не беше претърпяла никакво ниво на регенерация. Това е допълнително доказателство за ниската активност на прилепите в Балабановата дупка.

Анализът на данните показва, че WDI е значително по-висок след хибернация в сравнение с преди нея. Разликата в стойностите на WDI преди и след хибернация е статистически значима за всички изследвани видове като цяло, но се запазва само при *M. schreibersii* при анализ поотделно за всеки вид. Въпреки това, ефектът е малък, което предполага, че макар хибернацията да влияе върху състоянието на крилната мембрана, това влияние е слабо и ограничено.

Установена беше слаба положителна връзка между износването на зъбите и наличието на зъбна плака, като по-голямото износване е свързано с увеличено натрупване на плака. Въпреки първоначалната хипотеза, хибернацията не води до повишаване на зъбната плака при прилепите. Липсата на значима разлика и незначителният ефект сочат, че намалената хранителна активност през хибернацията не влияе върху натрупването на плака.

Анализът на данните не установи значима разлика в степента на оплешивяване и състоянието на козината на изследваните индивиди преди и след хибернацията, което предполага, че този показател не се влияе от хибернационния период. При всички изследвани видове мнозинството от индивидите (96,7%) имаха много добро състояние на козината и в двата периода, а степени на оплешивяване бяха регистрирани при едва 3,3% от общо 728 изследвани прилепа. Възможно е, подобно на други бозайници, състоянието на козината да е най-добро преди хибернацията, като адаптивен механизъм за запазване на енергийните запаси през зимата. Освен това, не беше установена връзка между присъствието на ектопаразити и състоянието на козината.

Настоящото изследване потвърждава повишаване на концентрацията на антиоксиданта глутатион (GSH) при прилепите от вида *M. blythii* в края на хибернацията. Увеличението се наблюдава и в двете изследвани колонии – в пещерите Иванова вода и Балабановата. За разлика от това, нивата на малондиалдехид (MDA), индикатор за липидно окисление, остават непроменени както преди, така и след хибернацията. Сходни стойности на MDA са регистрирани и в двете популации. Нивата на 8-хидрокси-2-деоксигуанозин (8-OHdG) в проби от урина от вида *M. blythii* показват статистически достоверна разлика между нивата на 8-OHdG в урината на прилепите преди и след хибернацията, както и достоверна разлика между популациите в отделните пещери (Фиг. 9).



Фигура 9. Сравнение на нивата на GSH ($\mu\text{M}/\text{mg}$ белтък) преди и след хибернация в проби от пещерите Балабановата и Иванова вода. Точките представят индивидуални стойности, а боксплотовете илюстрират разпределението и централната тенденция на данните във всяка група.

D: Здравен статут на прилепите в изследваните обекти преди и след хибернация, публикувана статия със заглавие „First record of *Psorergatoides* Fain, 1959 (Acari, Cheyletoidea, Psorergatidae) for the Balkan Peninsula with description of the cutaneous lesions on the wing membrane of its hosts *Myotis myotis* (Borkhausen, 1797) and *Myotis blythii* (Tomes, 1857)“

Резюме на публикацията: Здравите мембрани на крилата са от съществено значение за прилепите. Те играят важна роля в поддържането на водния баланс и по време на хибернация предпазват прилепите от дехидратация. Визуалната оценка на състоянието на крилната мембрана е лесен и ефективен метод за оценка на здравния статус и за откриване на аномалии и инфекции в популациите на прилепи. По време на изследването на крилата на прилепите преди и след хибернация установихме наличието на кожни акари, *Psorergatoides kerivoulae* (Fain, 1959). Този паразит причинява кожни лезии по мембраните на крилата на големия нощник (*Myotis myotis*) и остроухия нощник (*Myotis blythii*). Остроухият нощник е нов гостоприемник за паразита. Това изследване е първото, което описва хистопатологията на инфекцията по крилата. Доколкото ни е известно, това е най-южното находище на този паразит и първото съобщение на род *Psorergatoides* за Балканите.

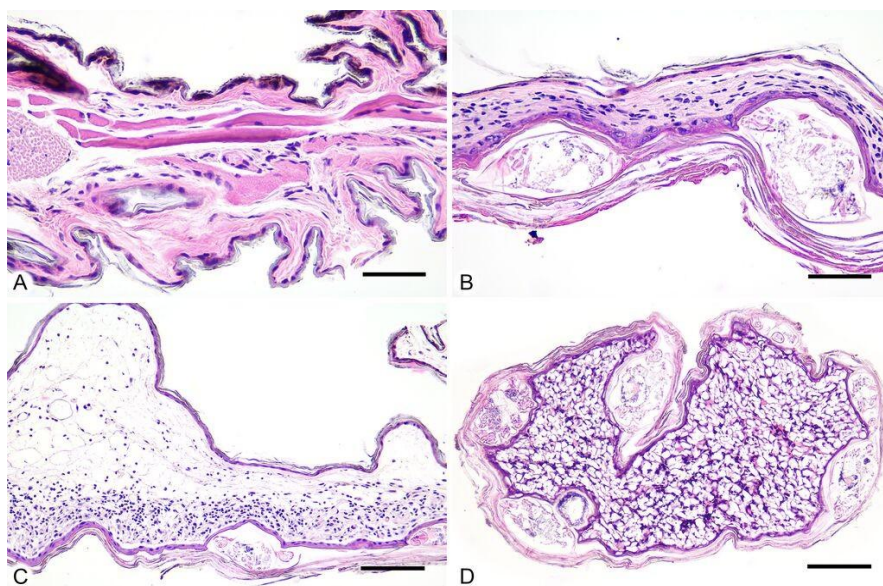
Материали и методи: Полевите изследвания се проведеха през 2020–2022 г. в две карстови пещери – Балабанова дупка (43.134° N, 23.040° E) и Иванова вода (41.894° N, 24.880° E), обитавани целогодишно от различни видове прилепи. Общият брой уловени индивиди беше 450, като уловът се извършваше с капан на Тътел в периодите преди и след хибернация. За всеки индивид бяха определени вид, пол, възраст, телесна маса и дължина на совалката. Двете крила на всеки прилеп бяха фотографирани и анализирани за наличие на кожни лезии. Кожни биопсии ($\varnothing = 3 \text{ mm}$) от нормална и увредена тъкан бяха фиксирани във формалин, включени в парафин, нарязани на тънки препарати и оцветени с хематоксилин-еозин. За изолиране на акарите част от пробите бяха обработени с органични разтворители (ксилол и етанол), след което паразитите бяха извлечени под стереомикроскоп. Морфологичният анализ се извърши с оптичен микроскоп (Amplival, Carl Zeiss Jena) и цифрова камера (Helicon Focus).

Резултати: По крилните мембрани на прилепите от Балабановата дупка и Иванова вода бяха открити характерни оранжеви кожни образувания, където кожата беше втвърдена и грапава. Бяха регистрирани 16 индивида с подобни кожни лезии в периода преди хибернация. Непосредствено след излизане от хибернация не бяха установени индивиди с подобни лезии, докато в края на май 2022 г., след началото на активния сезон, бяха регистрирани три индивида с лезии. Лезиите бяха предимно сферични, като при 10 индивида се наблюдаваха множествени поражения на едно и също крило. Размерът им варираше от 2 до 15 mm в диаметър. При по-тежките случаи лезиите обхващаха и двете крила, покривайки до 20% от общата им повърхност. Визуално се характеризираха с твърда, нееластична консистенция и тъмнооранжево оцветяване (Фиг. 10А), което улеснява разпознаването им на терен.



Фигура 10. Крила на *Myotis myotis*, заразени с *Psorergatoides kerivoulae*. А) Лезиите се виждат като бледо оранжеви оцветени петна по мембраната на крилото; Б) В тъканните проби се наблюдава голяма брой акари. По-тъмните овални дупките са останали след изваждането на акарите. Мащаб 1 mm.

Микроскопското изследване на кожни участъци от крилата на прилепи с нормална морфология и с лезии разкри наличие на паразитни акари само в засегнатите тъкани. Паразитите причиняват кожни лезии при видовете *M. myotis* и *M. blythii*. Между нормалните и засегнатите участъци на крилните мембрани бяха наблюдавани значителни хистологични различия. Нормалните участъци бяха покрити с кубовиден епител и съдържаха фокални вътреклетъчни натрупвания от кафяв пигмент, докато субепителната тъкан беше рехавата с тънкостенни съдове и набраздени мускулни влакна. В увредените участъци крилните мембрани бяха покрити с плосък епител, като по повърхността им се наблюдаваше засилена кератинизация, а в субепителната тъкан липсваха мускулни влакна (Фиг. 11Б–Г). В интердермалната област се наблюдаваха множество яйцевидни везикуларни структури, съдържащи паразитните акари, заобиколени от възпалителен инфилтрат от лимфоцити, плазмоцити, еозинофили и неутрофили. Някои от изследваните индивиди показаха сериозни тъканни изменения, които предполагат функционално увреждане на дермата. Отделянето на цели акари позволи идентификацията им до вид: *Psorergatoides kerivoulae* (Fain, 1959). Това е първото съобщение за род *Psorergatoides* Fain, 1959 (Acari, Cheyletoidea, Psorergatidae) от Балканите, като видът *M. blythii* е регистриран като нов гостоприемник на паразита.



Фигура 11. Хистологични разрези от крилна мембрана на *Myotis blythii blythii*. (А) Интактна зона с нормална тъканна морфология. (В) Заразена зона с два напречни разреза на *Psorergatoides kerivoulae*. (С, D) Лезии, индуцирани от акари, с наличие на лимфоплазматичен инфилтрат. Оцветяване с H&E. Мащабни ленти: 50 μ m (А, В); 100 μ m (С, D).

Липсата на лезии след хибернационния период предполага, че *P. kerivoulae* намалява репродуктивната си активност и следва жизнения цикъл на гостоприемниците си. Прилепите намаляват паразитното си натоварване през зимата както количествено, така и качествено.

Е: Здравен статут на прилепите в изследваните обекти преди и след хибернация, публикуван препринт, със заглавие „Assessing Wing Damage Index (WDI) in bats using ImageJ software“

Резюме на методиката: Визуалното изследване на здравния статус на прилепите може да даде ценна информация за тяхното състояние. Състоянието на мембраните на крилата е от съществено значение за прилепите, тъй като те са ключови за водния баланс и предпазват от дехидратация по време на зимния сън. Визуалната оценка на състоянието на крилните мембраните на прилепите е от решаващо значение за проследяване на техния здравен статус и идентифицирането на аномалии или инфекции. Извършването на тази оценка на терен обаче е свързано с практически предизвикателства, потенциални отклонения и повече време за работа, което може да причини стрес на животните. За да се адресират тези предизвикателства, предлагаме нова методология за събиране на данни относно състоянието на крилата на прилепите. Този метод включва заснемане на крилата на прилепите в полеви условия и извършване на подробен визуален анализ на тези снимки с помощта на софтуера със свободен достъп - ImageJ. Това позволява внимателно и задълбочено визуално изследване на здравния статус на крилата, както и събиране на количествени данни за различни аномални структури и определяне на индекса на увреждане на крилата (WDI). Това осигурява по-точна и сравнима оценка. Освен това, нашият протокол позволява прецизна оценка на площта на крилата - важен, но понастоящем недостатъчно проучен морфологичен параметър.

Ф: Оптимизиране на методите за мониторинг на прилепите с цел по-ефективно и обстойно събиране на данни за влиянието на климатичните промени върху тях: „Събиране на данни и оценка на въздействието на климатичните промени върху прилепите в България“

Резюме на методиката: Промените в климата имат различни ефекти върху различните видове прилепи, което е свързано със специфики на техните хранителни ниши, предпочитание към определени местообитания и екологични изисквания по време на размножителния период. Също така различните популации на видовете по света ще усещат промените в различна степен в зависимост от спецификата на екосистемите и мащаба на очакваните изменения. Прилепите са чувствителни към предизвиканите от човека изменения на средата, а колебания в температурата и количеството на валежите, свързани с климатичните промени, могат да засегнат тяхната еко-физиология, разпространение и в крайна сметка способността им за дългосрочно оцеляване. Твърде вероятно е климатичните промени да се отразят на европейските популации на прилепи и оттам на количеството на насекоми, което те регулират в земеделските площи, горите и градските райони. Това може да има сериозни последици както върху европейското биоразнообразие като цяло, така и върху икономиката. Въпреки важността на проблема, изследванията, целящи да предвидят последиците на климатичните промени върху европейските прилепни популации, са малко. Така, липсата на познания по темата възпрепятства изготвянето на превантивни стратегии, смекчаващи възможните

негативни влияния върху прилепите в бъдеще. В допълнение към наличната в България национална програма за мониторинг на пещеролюбиви прилепите, бяха разработени препоръки, които включват преглед на текущите проблеми, както и предложени мерки, които да дадат възможност на местните природозащитници да събират по-изчерпателни и последователни данни за популациите на прилепите и свързаните с климата заплахи. Този структуриран подход ще подобри разбирането ни за природозащитния статус на прилепите на национално ниво, което ще даде възможност за по-прецизни и ефективни стратегии за опазване. Тези усилия биха могли да допринесат за разбирането на дългосрочните последици от изменението на климата върху популациите на прилепите в България.

IV. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В резултат на проведените изследвания, част от настоящата дисертация, може да се заключи, че зимната активност на прилепите е силно повлияна от локалните екологични фактори и микроклиматичните условия в техните убежища. Въпреки че външната температура оказва влияние върху нивата на активността, степента на този ефект варира между различните колонии, като стабилността на вътрешния микроклимат в убежищата също играе роля. Това подчертава значението на специфичните характеристики на убежищата за физиологията и поведението на хиберниращите прилепи, както и необходимостта от повече изследователски усилия в тази насока.

Видово-специфичните модели на активност, циркадният ритъм и хранителното поведение през зимата показват различни адаптивни стратегии, които позволяват на прилепите да регулират енергийните си нужди. Установеното намаляване на индекса на телесната маса (BMI) в края на хибернационния период при *Myotis blythii*, *Myotis capaccinii* и *Myotis myotis*, особено в пещери на голяма надморска височина, показва, че енергийните загуби зависят от мястото, където хибернират прилепите. Колонията на *M. blythii* от Иванова вода показва най-голямо намаление в BMI, докато при *Miniopterus schreibersii* бяха наблюдавани както намаления, така и липса на промяна.

Може да се твърди, че увреждането на крилата след хибернация се увеличава само при *M. schreibersii*, докато ектопаразитното натоварване намалява при всички изследвани видове. Износването на зъбите е в корелация с нивата на зъбна плака, но самата хибернация не води до увеличено натрупване на плака. Въпреки ниските нива на активност на *M. blythii*, нивата на липидната пероксидация остават стабилни, докато нивата на изследвания маркер за ДНК-увреждане намаляват, а антиоксидантната защита се увеличава. Това потвърждава, че хибернацията е съпроводена от механизми, които предотвратяват и/или намаляват окислителния стрес.

Климатичните промени, водещи до по-топли зимни условия, могат да удължат активния период на хиберниращите прилепи и да повлияят на тяхната екология. Това подчертава необходимостта от дългосрочен мониторинг, за да се проследят ефектите върху популациите и да се осигурят мерки за тяхното опазване.

A. ОСНОВНИ ИЗВОДИ

Въз основа на проведените изследвания и получените резултати могат да се направят следните изводи:

- 1) Значителните разлики в нивата на зимна активност на прилепите между изследваните обекти подчертават необходимостта от индивидуални изследвания вместо обобщения на базата на определени обекти. Два от изследваните обекти, разположени на сходна надморска височина и със сходни външни температури през зимата, показват коренно различни модели на активност. Това подчертава ролята на локалните екологични фактори и специфичните характеристики на зимните убежища за определяне на активността на прилепите.
- 2) Пещерите осигуряват стабилни вътрешни условия, които са от съществено значение за хибернацията на прилепите. Повечето от изследваните обекти, включително Балабановата, Парниците и Деветашката, показват ниски стойности на коефициента на корелация, което сочи за минимално влияние на външната температура върху вътрешния микроклимат. Това предполага, че местата за хибернация в тези пещери са ефективно изолирани от външните температурни колебания. За разлика от тях, в Иванова вода се наблюдава по-силно въздействие на външните температурни промени върху вътрешните условия, което може да обясни и повишената летателна активност на прилепите в тази пещера, както и в Ръжишката. В Иванова вода вътрешната температура не корелира с активността, докато в Парниците се отчита значителен отрицателен ефект. Възможно е стабилните температури в Парниците ($\text{Mean} \pm \text{SD}: 7.86^{\circ}\text{C} \pm 0.22^{\circ}\text{C}$) да са причина за този резултат, като минималните колебания може би нямат биологично значимо въздействие върху хиберниращите прилепи.
- 3) Съществува положителната зависимост между външната температура и активността на прилепите през зимата извън техните убежища. Тази зависимост се наблюдава в обектите, където външната температура оказва по-силно влияние върху вътрешните температури на пещерата.
- 4) Активността на прилепите през зимата следва типичен циркаден ритъм, като е най-интензивна след залез слънце и продължава до около 02:00 ч. Установена е и дневна активност с акустичен мониторинг. Анализите на проби от гуаното събрано от зимуващи колонии прилепи в България, недвусмислено показва, че прилепите се хранят зимата извън пещерите. Откритите в резултат на метагеномния анализ дневно активни насекоми в хранителният спектър на прилепите, показва дневна активност на прилепите през зимата за първи път в България, свързана с хранене.
- 5) Настоящото изследване показва, че мониторингът на зимната активност на прилепите, трябва да е съчетан със събирането на данни за температурата, последващи температурни анализи и това предоставя ценна информация за поведението и екологичните изисквания на различните видове.
- 6) Анализирани за първи път исторически и съвременни данни за районите на изследваните пещери очертават тенденцията за намаляване на дните с температури под 0°C и увеличаване на дните с температури над 5°C през зимата. Това дава основание да спекулираме, че тези промени могат да удължат периодите на активност на хиберниращите прилепи както в изследваните обекти, така и на територията на цяла България, променяйки тяхното физиологично състояние и енергийни разходи.
- 7) Изследването показва, че дори само натрупването на гуано под зимуващите колонии може да бъде добър индикатор за активността на прилепите през зимата. Съвпадението между липсата на гуано в Балабановата пещера и ниската регистрирана акустична активност подчертава значението на интегрирания

подход, включващ акустичен мониторинг, анализ на гуано и температурни измервания.

- 8) Анализът на хранителния спектър чрез ДНК-метабаркодинг и микроскопски методи потвърди, че колонията на *M. schreibersii* в Ръжишката пещера се храни с насекоми, уловени извън пещерата, като най-често срещаните разреди са Diptera, Lepidoptera и Hymenoptera. Метабаркодингът показва както често срещани, така и редки насекоми в храната на прилепите.
- 9) Хибернацията оказва значително влияние върху здравния статус на прилепите. Промените може да са в положителна и отрицателна насока, като водят до значителни промени в индекса на телесната маса, влошаване на състоянието на крилните мембрани и намаляване на ектопаразитното натоварване от друга страна. Промените в индекса на телесната маса варират между различните видове и популации, което може да се дължи на различия в летателната и хранителната активност през зимата, енергийните нужди и адаптацията към специфичните условия на средата.
- 10) Индексът на увреждане на крилната мембрана (WDI) е значително по-висок след хибернация ($p < 0.05$), но размерът на ефекта е малък (r ; Коен 1988), което предполага, че макар хибернацията да има влияние върху състоянието на крилната мембрана, това влияние е ограничено и вероятно незначително.
- 11) Хибернационният период не се отразява на нивата на зъбна плака при изследваните прилепи. Допълнителни изследвания на бактериалния състав на оралния микробиом и промените, които настъпват вследствие на продължителното гладуване и намалените хранителни нужди, представляват интересен въпрос за бъдещи изследвания.
- 12) Не се наблюдават промени в състоянието на козината, което може да е свързано с адаптация към засилените нужди за адекватна термоизолация през зимата. Периодите на смяна на козината при прилепите не са добре проучени, а настоящото изследване е едно от малкото с такава голяма извадка по темата.
- 13) Антиоксидантните системи на прилепите се активират по време на хибернация, което подпомага възстановяването от оксидативни увреждания. Концентрацията на антиоксиданта глутатион (GSH) се увеличава при *M. blythii* след хибернация, което е индикатор за повишена антиоксидантна защита.
- 14) Нивата на малондиалдехид (MDA), индикатор за липидно окисление, остават непроменени както преди, така и след хибернация, което предполага, че липидната пероксидация при *M. blythii* остава стабилна по време на хибернация.
- 15) Нивата на 8-OHdG в урината намаляват след хибернация при *M. blythii*, което предполага възстановяване от оксидативни увреждания на ДНК. Може да се предположи, че хибернацията играе ключова роля в адаптацията на прилепите към сезонните промени, като подпомага възстановяването от оксидативни увреждания.
- 16) Остроухият нощник *M. blythii* е нов гостоприемник на *P. kerivoulae*. Това разширява списъка на известните гостоприемници на *P. kerivoulae* и дава основание да се предположи, че той е с по широк спектър от гостоприемници.
- 17) Увредените кожни участъци на крилните мембрани на прилепите от жизнената дейност на *P. kerivoulae* разкриват изменения свързани със засилена кератинизация. Интердермално се наблюдават множество яйцевидни везикуларни структури, съдържащи паразитни акари. Тези структури са заобиколени от възпалителен инфилтрат, съставен от лимфоцити, плазмоцити, еозинофили и неутрофили, което показва имунен отговор на гостоприемника към паразита. Липсата на мускулни влакна в субепитела предполага специфични

адаптации на кожата в отговор на паразитната инфекция. Степента на тъканни изменения при някои от изследваните индивиди предполага функционално увреждане на дермата. Това може да има сериозни последици за здравето и физиологичните функции на прилепите, особено по отношение на полета, осмо и терморегулацията.

- 18) Липсата на лезии след края на хибернационния период предполага, че *P. kerivoulae* намалява активността си през зимата и това позволява възстановяването на крилната мембрана. Това най-вероятно е свързано с адаптиране към жизнения цикъл на гостоприемниците, които също намаляват своята активност през студените месеци и значително намаляват телесната си температура. Може да се предположи, че поради намалената активност на гостоприемника и понижената телесна температура намалява и репродуктивната активност на *P. kerivoulae*. Жизненият цикъл на този акар вероятно следва този на гостоприемниците си, което е характерно за много ендо и екто паразити.
- 19) Изследването на WDI и наличието или отсъствието на лезии, причинени от паразитни кожни акари потвърждава тенденцията за значителни разлики в паразитното натоварване преди и след хибернационния период установена при хелминти и ектопаразитни кръвосмучещи насекоми.

В. ПРИНОСИ НА НАСТОЯЩОТО ИЗСЛЕДВАНЕ

- 1) Проучването е първото по рода си за територията на България и разкрива моделите на зимна активност в четири от най-значимите зимни убежища за прилепи в Европа. Тези данни предоставят ценна информация за предпочитанията на видовете и динамиките в поведението им.
- 2) За първи път в България е регистрирана летателна активност на прилепи при температури от -8°C. Това наблюдение попада сред най-ниските температури, при които е установявана летателна активност на прилепите в света. Това откритие разширява познанията за физиологията и поведенческите стратегии на прилепите през зимния период.
- 3) Документирана е връзка между динамиката на външните температури и честотата на регистрираната акустична активност, което потвърждава, че температурните промени могат да предизвикат епизоди на активност по време на хибернационния период.
- 4) За първи път в България е установено, че част от прилепите в зимни колонии проявяват активност и през дневните часове. В някои от случаите тази регулярна дневна активност е свързана с хранене при подходящи температурни условия.
- 5) Анализирани са за първи път исторически и съвременни данни за районите на изследваните пещери и е очертана тенденцията за намаляване на дните с температури под 0°C и увеличаване на дните с температури над 5°C. Това ни дава основание да спекулираме, че тези промени могат да удължат активния период на хиберниращите прилепи, променяйки тяхното физиологично състояние и енергийни разходи.
- 6) За първи път са установени за фауната на България и Балканския полуостров кожни паразитни акари от род *Psorergatoides* Fain, 1959 (Acari, Cheyletoidea, Psorergatidae) с вида *Psorergatoides kerivoulae* Fain, 1959, причиняващи значителни кожни увреждания върху крилните мембрани на зимуващи прилепи. За първи път *M. blythii* е установен като гостоприемник на *P. Kerivoulae* и е описана хистопатологията на лезиите, причинени от паразитния акар *P. kerivoulae*, което осигурява нова информация за неговото въздействие върху прилепите и потенциалните патологични последици.

- 7) За първи път са доказани разлики преди и след хибернация в нивата на глутатион и на маркера за ДНК увреждане (8-OHdG) при прилепи. Установено е увеличение на антиоксидантите и намаляване на нивата на 8-OHdG в урината. Резултатите показват адаптивни физиологични промени в отговора на окислителния стрес по време на хибернация, което може да има важни последствия за разбирането на механизмите на клетъчната защита при прилепите.
- 8) За първи път са изследвани в България – зимният хранителен спектър на прилепите, тяхната активност и обилието на потенциалната им плячка в моделен обект – зимно убежище в защитен карстов район. За първи път в световната практика при изследване на хранителния спектър на прилепи е приложен комбиниран методичен подход, съчетаващ морфологичен анализ на гуано, метабаркодинг и мониторинг на зимната активност на моделни групи от потенциална плячка. Тази интеграция на методи разширява аналитичните възможности и ограничава риска от интерпретационни грешки.

С. НАУЧНО-ПРИЛОЖНИ ПРИНОСИ

- 1) Всички сурови данни събрани по време на дисертацията са качени с отворен достъп. Това увеличава прозрачността на изследването и позволява повторното използване на данните в бъдещи изследвания. Това може да подпомогне развитието на глобални и локални инициативи за изследване на зимната активност на прилепите, тяхното поведение и екофизиология.
- 2) Звукови записи на регистрираните видове прилепи по време на дисертацията са качени в акустичната база данни ChiroVox. Това осигурява ценен ресурс за бъдещи изследвания и сравнителен анализ на биоакустичните характеристики на видовете в отделните популации. Тази база данни може да подпомогне както научната общност, така и природозащитните дейности, свързани с опазването на прилепите.
- 3) Разработен и публикуван е нов методологичен подход за определяне на индекс на увреждане на крилата при прилепи. Този подход представлява съществен инструмент за мониторинг на индивидуалното и популационно здравословно състояние. Методът позволява оценка на въздействието на заболявания като WND, както и бързо идентифициране на лезии, причинени от паразита *P. kerivoulae*, по крилните мембрани. Освен това намира приложение и в морфологични изследвания, свързани със структурата и състоянието на кожните мембрани.
- 4) Предложени са някои нови допълнения за актуализиране на методиката за мониторинг и оценка на състоянието на пещеролубивите видове прилепи към Националната система за мониторинг на биологичното разнообразие.

V. БЛАГОДАРНОСТИ

Изказвам своята дълбока благодарност към научния си ръководител проф. д-р Васил Попов за насоките, търпението и безценната помощ при изпълнението на този дисертационен труд. Особено съм благодарна на д-р Станимира Делева за подкрепата, мотивацията и приятелството, всички дискусии и насоки в работния процес. Без тях този радостен момент нямаше да бъде възможен. Признателна съм на д-р Йордан Димитров за съдействието по време на лабораторните дейности и за хилядите научни и философски разговори в Париж и София. Изказвам благодарност към доц. д-р Николай Симов за всички идеи, финансова подкрепа, съвети и приятелство. Безкрайно съм му благодарна за отделеното време и усилия да разгледа и критикува настоящия труд. Особено ценя това, че ме научи да възприемам критиката като конструктивна насока и подкрепа.

Признателна съм на съавторите ми, които активно се включиха в разширяването на мащабите на настоящия дисертационен труд, допълвайки насоките му така че да включват и зимна активност на насекоми: доц. д-р Марио Лангуров, доц. д-р Боян Златков, доц. д-р Ростислав Бекчиев, гл. ас. д-р Тошко Любомиров, д-р Еберхард Цилке, и магистрите, които разпределиха ентомологичните материали: Радост Ангелова и Росина Първанова. Благодарна съм на д-р Цветан Симеонов за помощта при свалянето на климатичните данни и на д-р Албена Факирова за описанието на хистопатологията причинена от паразитните акари.

За безценната помощ на терен в суровите зимни условия благодаря на Борис Петров, Тодор Каракиев, Йорданка Донкова и Владимир Василев от пещерен клуб „Под ръба“. Специални благодарности изказвам на д-р Виолета Желязкова, Катрин Димитрова, Калояна Косева, Максим Колев и д-р Антония Хубанчева за участието им в теренните дейности и за идейната и приятелска подкрепа през целия период на моята докторантура. Безкрайно благодаря на Петър Велков за това, че направи „Лаби“ подвижната теренна лаборатория, без който нямаше да мога да събера необходимите проби, както и за всички вкусни и весели мигове на терен.

Благодарна съм на доц. д-р Михаела Недялкова, доц. д-р Йордан Кошев, гл. ас. д-р Мария Качамакова, доц. д-р Симеон Луканов, доц. д-р Теодора Тодорова и проф. д-р Снежана Грозева за административната подкрепа и множеството насоки през годините на докторантурата. Благодарна съм на колегите от отдела, за критичното и сериозно отношение, която проявяват към докторантите.

Благодарна съм на д-р Рикардо Роха, д-р Мюриел Дитрих, д-р Гизела Коп и д-р Карън Сиърс, за това че ме приютиха в лабораториите си и обогатиха докторантските ми години, позволявайки ми да стана част от изследователската им дейност и да осъществя допълнителни специализации.

Най-вече благодаря на моя обичан съпруг - Борис Петров, който винаги намира начин да ме направи по-добър и мотивиран човек. Благодарна съм му за търпението, помощта на терен, в носенето на тежката екипировка, шофирането и безценните съвети. Благодаря на родителите ми Любен Тошков и Ваня Тошкова, които намират сили да ме подкрепят дори и в най-авантюристичните ми идеи и никога не ми казаха, че искам много от тях (въпреки че често това е така). Благодаря на прекрасната ми сестра Ива Тошкова, която знае как да ме накара да се посмея хубаво. Благодаря на Антония

Петкова и Хана Тошкова-Петкова за разходките и на Рижко и Сивчо за това, че не ме оставиха сама по време на дългите часове анализи на данни.

Настоящият дисертационен труд стана възможен благодарение на докторантска стипендия от Фондация "Карол Знание", докторантската стипендия на Българска Фондация Биоразнообразие, проект СР-06-N51/9 "Пещерите като резервоар за нови и рецидивиращи зоонози - екологичен мониторинг и метагеномни анализи в реално време"; финансирането от Рамковата програма на ЕС "Хоризонт 2020" чрез COST Action CA18107 "Climate change and bats: from science to conservation - ClimBats", съфинансирането на българските дейности от Националния фонд за научни изследвания на Република България (СР-06-COST/15 от 16.12.2020 г.). Благодарна съм на програма Еразъм+, Френския институт в България, Германската федерална екологична фондация и програма "Фулбрайт" за предоставените стипендии за научни обмени.

VI. ЦИТИРАНА ЛИТЕРАТУРА (ОТ ГЛАВА УВОД)

- Beaulieu, M. and Costantini, D. (2014). Biomarkers of oxidative status: missing tools in conservation physiology. *Conservation Physiology*, 2(1), cou014-cou014. <https://doi.org/10.1093/conphys/cou014>
- Bernard, R. F. and McCracken, G. F. (2017). Winter behavior of bats and the progression of white-nose syndrome in the southeastern United States. *Ecology and Evolution*, 7(5), 1487-1496. <https://doi.org/10.1002/ece3.2772>
- Brigham, R. M., (1987). Winter activity by *Eptesicus fuscus*: the influence of energy reserves. *Canadian Journal of Zoology* 65: 1240 – 1242.
- Brownlee-Bouboulis, S. A. and Reeder, D. M. (2013). White-nose syndrome-affected little brown myotis (*Myotis lucifugus*) increase grooming and other active behaviors during arousals from hibernation. *Journal of Wildlife Diseases*, 49(4), 850-859. <https://doi.org/10.7589/2012-10-242>
- Festa, F., Ancillotto, L., Santini, L., Pacifici, M., Rocha, R., Toshkova, N., Amorim, F., Benítez-López, A., Dómer, A., Hamidović, D., Kramer-Schadt, S., Mathews, F., Radchuk, V., Rebelo, H., Ruczyński, I., Solem, E., Tsoar, A., Russo, D., and Razgour, O. (2023). Bat responses to climate change: a systematic review. *Biological Reviews*, 98(1). <https://doi.org/10.1111/brv.12893>
- Ford, W. M., Britzke, E. R., Dobony, C. A., Rodrigue, J. L., & Johnson, J. B. (2011). Patterns of acoustical activity of bats prior to and following white-nose syndrome occurrence. *Journal of Fish and Wildlife Management*, 2(2), 125-134. <https://doi.org/10.3996/042011-jfwm-027>
- Geiser, F., (2004). Metabolic rate and body temperature reduction during hibernation and daily torpor. *Annual Reviews of Physiology* 66: 239 – 247.
- Halliwel, B. (1994). Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence?. *The lancet*, 344(8924), 721-724.
- Isaksson, C. (2010). Pollution and its impact on wild animals: a meta-analysis on oxidative stress. *EcoHealth*, 7(3), 342-350. <https://doi.org/10.1007/s10393-010-0345-7>
- Jackson, R. T., Willcox, E. V., Zobel, J. M., & Bernard, R. F. (2022). Emergence activity at hibernacula differs among four bat species affected by white-nose syndrome. *Ecology and Evolution*, 12(7). <https://doi.org/10.1002/ece3.9113>

- Korine, C., Adams, R. A., Russo, D., Fisher-Phelps, M., and Jacobs, D. S. (2015). Bats and water: anthropogenic alterations threaten global bat populations. *Bats in the Anthropocene: Conservation of Bats in a Changing World*, 215-241. https://doi.org/10.1007/978-3-319-25220-9_8
- Kayser, C. (1953). L'hibernation des mammifères. In *Annales de Biologie* (Vol. 29, pp. 109-150).
- Lee, M., Choi, I., & Park, K. (2002). Activation of stress signaling molecules in bat brain during arousal from hibernation. *Journal of Neurochemistry*, 82(4), 867-873. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.01022.x>
- Németh, I., Nyitrai, V., and Altbäcker, V. (2009). Ambient temperature and annual timing affect torpor bouts and euthermic phases of hibernating European ground squirrels (*Spermophilus citellus*). *Canadian Journal of Zoology*, 87(3), 204-210.
- Ransome, R., 1990. The natural history of hibernating bats. Christopher Helm, London.
- Reeder, D. M., Frank, C. L., Turner, G. G., Meteyer, C. U., Kurta, A., Britzke, E. R., ... & Blehert, D. S. (2012). Frequent arousal from hibernation linked to severity of infection and mortality in bats with white-nose syndrome. *PLoS ONE*, 7(6), e38920. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038920>
- Schneeberger, K., Cziráj, G. Á., & Voigt, C. C. (2013). Inflammatory challenge increases measures of oxidative stress in a free-ranging, long-lived mammal. *Journal of Experimental Biology*. <https://doi.org/10.1242/jeb.090837>
- Speakman J.R. and D.W. Thomas, (2003). Physiological ecology and energetics of bats. Pp.430-490, In: *Bat Ecology* (T.H. Kunz and M.B. Fenton, eds.) University of Chicago Press, Chicago.

VII. ПРИЛОЖЕНИЯ

ДЕКЛАРАЦИЯ

ЗА ОРИГИНАЛНОСТ И ДОСТОВЕРНОСТ

от Ния Любенова Тошкова

Във връзка с провеждането на процедура за защита на дисертация за придобиване на ОНС „Доктор” в Института по биоразнообразие и екосистемни изследвания – БАН, еднозначно декларирам:

1. Резултатите, обсъжданията и изводите в научната продукция, които предоставям в процедурата, са оригинални и не са заимствани без цитиране от изследвания и публикации, в които нямам участие.
2. Представената от мен информация във вид на копия на документи и публикации, лично съставени справки и др. съответства на обективната истина.

05.03.2025 г.

гр. София

Декларатор:

/Н. Тошкова/

СПИСЪК С ПУБЛИКАЦИИ

№	Публикации по дисертацията	Точки*
1.	Toshkova, N., Zlatkov, B., Fakirova, A., Zhelyazkova, V., Simov, N. (2022). First record of Psorergatoides Fain, 1959 (Acari, Cheyletoidea, Psorergatidae) for the Balkan Peninsula with description of the cutaneous lesions on the wing membrane of its hosts Myotis myotis (Borkhausen, 1797) and Myotis blythii (Tomes, 1857). Biodiversity Data Journal, 10: e89514. https://doi.org/10.3897/BDJ.10.e89514 , JCR-IF (2022): 1.3; SJR (2022): 0.46, Q2 (Scopus)	20
2.	Toshkova, N., Dimitrova, K., Langourov, M., Zlatkov, B., Bekchiev, R., Ljubomirov, T., Zielke, E., Angelova, R., Parvanova, R., Simeonov, T., Simov, N. (2023). Snacking during hibernation? Winter bat diet and prey availabilities, a case study from Iskar Gorge, Bulgaria. Historia Naturalis Bulgarica, 45(5): 125–142. https://doi.org/10.48027/hnb.45.053 SJR (2022): 0.246	10
3.	Toshkova, N., Kolev, M., Deleva, S., Simeonov, T., Popov, V. (2025) Winter is (not) coming: Acoustic monitoring and temperature variation across important bat hibernacula. Biodiversity Data Journal, 13: e141801. https://doi.org/10.3897/BDJ.13.e141801 JCR-IF (2023): 1.0; SJR (2023): 0.367, Q2 (Scopus)	20

НАУЧНИ ДОКЛАДИ ИЗНЕСЕНИ НА НАУЧНИ МЕРОПРИЯТИЯ В СТРАНАТА И ЧУЖБИНА

Заглавие на абстракта	Конференция	Дата	Точки	Тип представяне
Winter activity patterns and pre and post-hibernation sampling of wild bat populations in the context of changing environmental conditions	A. Международен хибернационен симпозиум	1-5 август 2021; Гронинген, Нидерландия	32	доклад
Winter bat diet and insect availabilities, a case study from Iskar Gorge, Bulgaria	Климентови дни	4 ноември, 2022; София, България	0	постер
EuroBaTrait 1.0, a species-level trait database of bats in Europe and beyond	Среща на Британското екологично общество	19-21 декември, 2022; Единбург, Шотландия	0	постер
Temperature sensitivity of bat antibodies links the metabolic state with antigen-recognition diversity	Четвърта младежка научна сесия "Биомедицина и качество на живота" (BMQL '2023)	5–6 декември 2023, София, България	32	доклад
Winter is coming: bat activity and oxidative stress levels a case study from Bulgaria	XVI Европейски симпозиум на прилепните изследователи	2-6 септември 2024, Тарагона, Испания	32	доклад