

**Academia
Oamenilor de Știință
din România**



**Academy
of Romanian
Scientists**

*Add: str. Ilfov, nr. 3, sector 5, București, ROMANIA,
Tel. 00-4031/1070659; Fax. 00-4021/314.75.39, Web-site: www.aosr.ro,*

PROIECTUL

“Adaptarea insectelor sociale la schimbările climatice și interacțiunea acestora cu plantele invazive: mecanisme fiziologice, biochimice, genetice și comportamentale”

RAPORT DE PROGRES 2

Echipa de proiect:

Director de proiect:
lector univ. dr. Ioan TĂUȘAN

Membrii:
Asist. univ. dr. Ion BRÎNZĂ

Drd. Lucia POPOVICI

Drd. Silviu Giorgian ȚICU

Decembrie, 2025

În vederea realizării obiectivelor asumate în cadrul proiectului, în perioada iulie-noiembrie 2025, echipa proiectului a întreprins o serie de activități care vor fi detaliate mai jos.

1. Background

Schimbările climatice afectează comunitățile de nevertebrate, inclusiv comunitățile de insecte la diferite niveluri care includ:

- distribuției geografice;
- fenologiei sezoniere;
- funcțiile fiziologice.

La presiunea cauzată de schimbările climatice, se adaugă și prezenta plantelor invazive care accentuează presiunea ecologică, prin afectarea rețelelor trofice. În plus, prezența metalelor grele, induce tulburări în sistemul digestiv și excretor, afectarea homeostaziei ionice și respirației celulare, scăderea longevității indivizilor și ale castelor reproducătoare.

Insectele sociale (albine, furnici, termitelor) sunt esențiale în ecosisteme și sunt vulnerabile la stresuri combinate. Acestea prezintă diferite mecanisme adaptative de natură fiziologică, biochimică, genetică sau comportamentală.

2. Obiective urmărite

În cadrul proiectului nostru, ne-am propus mai multe obiective.

O1. Evaluarea impactului schimbărilor climatice asupra fiziologiei insectelor sociale

O2. Investigarea interacțiunii cu plantele invazive

O3. Identificarea modificărilor genetice și biochimice asociate adaptării la temperaturi extreme și metabolismului plantelor invazive

O4. Evaluarea stresului oxidativ și a mecanismelor imunologice implicate în adaptabilitate

O5. Modelarea ecologică a distribuției și impactului insectelor sociale în ecosistemele afectate de schimbările climatice

Pentru O1, ne propunem să realizăm analiza enzimelor antioxidante (SOD, CAT, GPx) și proteinelor de șoc termic (HSP70), precum și a efectelor asupra sistemului imunitar și supraviețuirii coloniilor.

Pentru O2, ne propunem studierea influenței compușilor emiși de plante invazive asupra comportamentului de foraj și recunoașterii feromonale, precum și impactul asupra organizării coloniilor

Referitor la O3, țintim evaluarea expresiei unor gene-cheie (ex. HSP70, FOXO, GSTs) și a modificărilor epigenetice implicate în adaptarea la stres termic și metaboliți vegetali.

În cazul O4 vom determina activitatea antioxidantă și a biomarkerilor imunologici, relevanți pentru adaptabilitatea în condiții extreme.

În final, la O5, vom urmări elaborarea unui model predictiv privind distribuția insectelor sociale în funcție de schimbările climatice și prezența plantelor invazive

3. Aspecte metodologice

3.1. Selectarea zonelor și colectarea insectelor sociale

- Identificarea regiunilor afectate de schimbările climatice (creșteri de temperatură, aridizare, modificări fenologice), utilizând baze de date climatice și GIS.
- Specii țintă: furnici (Formicidae), albine (Apoidea), termite (Rhinotermitidae).
- Metode de colectare: capcane Barber, capcane cu momeală, recoltare directă a cuiburilor.
- Context ecologic: evaluarea factorilor de stres combinat (secetă, urbanizare, presiune antropică).

3.2. Identificarea plantelor invazive și analiza metaboliților secundari

Determinarea speciilor invazive prin studii floristice și baze de date botanice.

Analize chimice:

- **HPLC** – compuși fenolici, flavonoide, alcaloizi.
- **GC-MS** – compuși volatili implicați în interacțiuni comportamentale.

Scopul utilizării acestor analize vizează: evaluarea potențialului toxic și etologic asupra insectelor sociale

3.3. Prelevarea de probe biologice pentru:

- **analize fiziologice** (homeostazie termică, mortalitate),
- **analize biochimice** (enzime antioxidante, markeri de stres oxidativ),
- **analize moleculare** (expresia genică, modificări epigenetice).

3.4. Studii experimentale de laborator

Aceste studii experimentale vor cuprinde

a. Expunerea la condiții climatice simulate

- Crearea unui mediu controlat (temperatură, umiditate, compuși volatili din plante invazive)
- Monitorizare comportamentală cu sisteme bazate pe AI (ex. BACH, ToxTrac, InsectDetect)

b. Analiza biochimică a stresului oxidativ

- Determinarea activității enzimelor antioxidante prin **metode spectrofotometrice**:
 - **SOD**: neutralizează radicalii superoxid (O_2^-)
 - **CAT**: detoxifică peroxidul de hidrogen (H_2O_2)
 - **GPx**: reduce peroxizii lipidici, dependentă de glutatation

c. Analiza metabolică

- Evaluarea produselor stresului oxidativ:
 - **UV-Vis**: detectare MDA și compuși carbonilici
 - **GC-MS**: identificare metaboliți volatili și produse de oxidare lipidică

d. Analiza expresiei genice

- **RT-qPCR**
- pentru genele: *HSP70*, *FOXO*,

- Implicate în: protecția proteinelor, homeostazie redox, detoxifiere, răspuns la stres

e. Analiza epigenetică

- **Cuantificarea metilării ADN**
- Investigarea **reglării epigenetice** a genelor de stres
- Evidențierea **plasticității fenotipice** și adaptării dinamice la mediu

3.5. Studii comportamentale în teren

a. Monitorizarea insectelor cu anTraX și SwarmSight

- Sisteme video bazate pe inteligență artificială (AI) pentru urmărirea individuală și colectivă
- Analiza tiparelor de mișcare și interacțiuni sociale în medii naturale

b. Evaluarea interacțiunilor sociale

- Utilizarea momelilor artificiale (glucide + proteine)
- Observații structurate (dimineața și după-amiaza) pentru înregistrarea interacțiunilor intra- și interspecifice

c. **Corelarea comportamentului cu date ecologice (GIS + senzori IoT)**

- Măsurători de temperatură, umiditate, compuși volatili etc.
- Integrarea datelor în sistem GIS pentru cartografierea distribuției coloniilor și a resurselor

3.6. Modelare ecologică și integrarea datelor

a. Analiza mișcărilor cu DeepLabCut

- Detecția mișcărilor fine, posturii și ritmului de deplasare al insectelor sociale
- Corelarea cu factori de stres (temperatură, prezența plantelor invazive)

b. Crearea unui model predictiv ecologic (GIS + machine learning)

- Integrarea datelor comportamentale, fiziologice și genetice

- Predicții asupra distribuției și interacțiunilor insectelor în condiții climatice viitoare

c. Platformă digitală interactivă

- Acces facil pentru cercetători și decidenți implicați în conservare și management ecologic

4. Calendarul activităților

Activitățile propuse în proiect vor fi realizate eficient prin respectarea unui plan care să permită efectuarea cu succes a obiectivelor urmărite (Tab. 1).

TABELUL 1: Activitățile cuprinse în proiect și estimarea duratei acestora

Etapă	Activitate	Durăță (luni)
1	Colectarea și identificarea speciilor	1–4
2	Experimente comportamentale și fiziologice	5–8
3	Analize biochimice și genetice	9–12
4	Modelare ecologică și interpretarea datelor	13–16
5	Redactarea articolelor și diseminarea rezultatelor	17–20

5. Rezultate preliminare

5.1 Colectarea materialului mirmecologic din teren

Pe baza datelor colectate din teren în perioada iunie-iulie 2025 care a presupus colectarea materialului mirmecologic (probe din colonii de *Lasius niger* și *Tetramorium cf. caespitum* dintr-o zonă cu presiune antropică ridicată, la care printr-un management defectuos se accentuează eroziunea habitatelor și la care se adaugă și secetă prelungită (vezi Fig. 1), au fost analizate o parte din date.



FIG. 1. HARTA LOCALIZĂRII PUNCTELOR DE PRELEVARE PROBE MIRMEOLOGICE (C1 – ZONA CEA MAI POLUATA – C9 – ZONA CEA MAI PUTIN POLUATA)

Cele două specii au fost selectate pe baza unor studii anterioare în care se confirma prezența acestora, dar și prin faptul că sunt specii extrem de tolerante la presiune antropică. Habitatele preferate de aceste specii, pot fi caracterizate ca fiind deschise cu o vegetație ierboasă bine reprezentată.

Prelevarea solului pentru analiza conținutului de metale grele

Din fiecare sit s-au colectat **3 probe de sol** (15 cm adâncime, 10 cm diametru), în proximitatea zonelor analizate în fiecare din cele 9 stații.

Probele au fost uscate, omogenizate și cernute printr-o sită de 20 mm pentru a obține o fracțiune granulometrică fină, adecvată analizelor chimice

Digestia probelor va fi realizată prin microunde, utilizând vase din teflon în sistemul Mars 5 Microwave System, la 200°C în 6 minute

Analiza metalelor grele va fi efectuată utilizând un spectrometru de masă cu plasmă cuplată inductiv (ICP-MS Varian 820-MS), dotat cu autosampler SPS-3 și nebulizator microconcentric.

Rezultate: Am obținut datele pentru analiza solurilor, iar acestea vor fi integrate într-un manuscris viitor.

5.2 Experimentele de interacțiune la insecte sociale (comunități de furnici)

Pentru studierea comportamentului, am ales ca subiect de testare specia *Lasius niger* (Fig. 2).



Fig. 2 COLONIE DE *LASIUS NIGER* ÎN COPȘA MICĂ

Distribuția coloniilor colectate:

- 3 colonii focale (FN1, FN2, FN3)
- câte o colonie vecină (NN1, NN2, NN3)
- câte o colonie mai îndepărtată (DN1, DN2, DN3)
- 3 colonii din zona nepoluată (XN1, XN2, XN3)



Fig. 3 COLECTAREA COLONIILOR DIN STAȚIA C1

Analiza în laborator

a. Arena și configurare

- Placă Petri 55 mm + barieră de apă într-o placă de 100 mm
- Filmare cu **Canon EOS M6 Mark II** + obiectiv macro **Canon EF 100 mm**
- Testare preliminară cu obiectivul **Raynox DCR-250**

b. Desfășurare

- Interacțiuni filmate 1 min, câte 5 replici/pereche
- Grupuri: FNx + FNx, FNx + NNx, FNx + DNx, FNx + XNx
- Selectarea furnicilor: prin contact cu un băț de lemn (alegere aleatorie)

Rezultate: Datele obținute sunt în curs de analiză.

5.3. Specii invazive și efectul lor asupra comunităților de furnici

Pentru componenta de specii invazive, am identificat în județul Sibiu și Mureș, mai multe locații invadate cu specia alohtona *Solidago canadensis*, respectiv în municipiul Sibiu, Pelișor, Biertan, și Daneș (Mureș).

Rezultate: Au fost colectate probe din colonii ale speciilor *Lasius niger* și *Tetramorium caespitum* din mai multe locații din județul Sibiu în august 2025. Analiza datelor colectate este în curs de realizare (Fig. 4).



Fig. 4 COLECTAREA COLONIILOR DIN SPECIILE *LASIUS NIGER* ȘI *TETRAMORIUM* CF. *CAESPITUM*

5.4. Rezultate privind Analiza parametrilor biochimici la furnici

Material și metode

După finalizarea experimentelor comportamentale, furnicile lucrătoare din fiecare grup experimental au fost sacrificate prin răcire rapidă, metodă fizică adaptată după protocolul utilizat la *Danio rerio* [1]. Pe scurt, furnicile au fost plasate în microtuburi de 1,5 mL pre-răcite și expuse la temperaturi scăzute (2–4 °C, gheață zdrobită) timp de aproximativ 10 minute, până la obținerea imobilizării complete și dispariția reacțiilor motorii.

Imediat după sacrificare, pentru fiecare replică biologică au fost colectate grupuri de 30–50 de furnici lucrătoare (în funcție de masa corporală). Insectele au fost clătite rapid în NaCl 0,9% rece pentru îndepărtarea impurităților, tamponate ușor pe hârtie

de filtru, cântărite și transferate în microtuburi pre-răcite. Fiecare probă „pool”-ată a reprezentat o replică biologică pentru analizele biochimice ulterioare.

Omogenizarea țesutului a fost realizată cu ajutorul unui mojar manual în sticlă pisată. Furnicile pool-ate au fost omogenizate în tampon fosfat de potasiu 0,1 M (pH 7,4) (Chemical Company, Iași, România) conținând 1,15% KCl (Chemical Company, România) pentru menținerea condițiilor izotonice, într-un raport de aproximativ 1:9 (m/v) (de exemplu, 100 mg țesut în 900 μ L tampon). Omogenizarea s-a efectuat pe gheață pentru a limita proteoliza și artefactele oxidative.

Omogenatele brute au fost centrifugate la 960 \times g timp de 15 minute la 4 °C. Supernatantele obținute au fost colectate cu atenție, păstrate permanent pe gheață în timpul procesării și utilizate pentru determinarea activităților enzimatică (AChE, SOD, CAT, GPX) și a biomarkerilor de stres oxidativ (proteine carbonilate, MDA). Probele care nu au fost analizate imediat au fost păstrate la -80 °C până la utilizare.

Conținutul total de proteine din fiecare supernatant a fost cuantificat prin metoda Bradford [2], utilizând serul de albumină bovină ca standard. Toate activitățile enzimatică și biomarkerii oxidativi au fost ulterior exprimați în funcție de concentrația de proteină (per mg proteină).

Determinarea activității acetilcolinesterazei (AChE)

Activitatea AChE în omogenatele întregului corp de furnică a fost evaluată prin metoda spectrofotometrică Ellman [3], cu modificări minore. Testul se bazează pe hidroliza acetiltiocolinei iodid (ATCh; Sigma Aldrich, Darmstadt, Germania) în prezența 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB; Sigma Aldrich, Darmstadt, Germania), care acționează ca reactiv cromogenic.

Reacțiile au fost efectuate în tampon fosfat 0,1 M (pH 7,4) la temperatura camerei. În timpul reacției, tiocolina eliberată prin hidroliza enzimatică a ATCh reacționează stoechiometric cu DTNB, generând anionul galben 5-tio-2-nitrobenzoat. Creșterea absorbției a fost monitorizată la 412 nm utilizând un spectrofotometru UV-Vis sau un cititor de microplăci.

Pentru fiecare probă, un volum fix de supernatant de furnică a fost incubat cu DTNB în tampon fosfat, urmat de adăugarea ATCh pentru inițierea reacției. Modificarea absorbției pe minut ($\Delta A/\text{min}$) a fost înregistrată într-un interval de timp definit, iar

activitatea AChE a fost calculată utilizând coeficientul de extincție molară al 5-tio-2-nitrobenzoatului, ținând cont de lungimea efectivă a căii optice. Activitatea enzimatică a fost exprimată ca nmol ATCh hidrolizați pe minut pe miligram de proteină. Concentrațiile de proteină au fost obținute prin testul Bradford [2].

Determinarea activității superoxid dismutazei (SOD)

Activitatea SOD în omogenatele de furnici a fost determinată prin măsurarea capacității enzimei de a inhiba reducerea fotochimică a nitroblue tetrazolium (NBT; AppliChem, Darmstadt, Germania) în prezența riboflavinei, conform metodei lui Winterbourn [4], adaptată pentru țesut insectiv.

Amestecul de reacție a conținut tampon fosfat de potasiu 0,067 M (pH 7,4), un volum adecvat de supernatant de furnică (extract enzimatic), EDTA 0,1 M (Carl Roth, Karlsruhe, Germania), riboflavină 0,12 mM (Sigma Aldrich, Germania) și NBT 1,5 mM. După asamblare, amestecurile de reacție au fost expuse la lumină fluorescentă pentru un timp fix, pentru a induce generarea de radical superoxid. Reducerea NBT la formazan a fost monitorizată spectrofotometric la 560 nm.

O unitate de activitate SOD a fost definită ca cantitatea de enzimă care produce inhibarea cu 50% a reducerii NBT, în raport cu martorul expus la lumină fără enzimă. Activitățile au fost normalizate la conținutul de proteină și exprimate ca unități pe miligram de proteină.

Determinarea activității catalazei (CAT)

Activitatea CAT a fost estimată pe baza ratei de descompunere a peroxidului de hidrogen (H_2O_2 ; Chemical Company, Iași, România), conform metodei lui Sinha [5], utilizată anterior pentru țesuturi de pește și adaptată aici pentru omogenatele de furnici.

Sistemul de reacție a fost format din 125 μ L supernatant de furnici și 125 μ L H_2O_2 0,16 M preparat în tampon fosfat de potasiu 0,1 M (pH 7,4) conținând 1,15% KCl (tampon preparat din KH_2PO_4 și K_2HPO_4 ; Chemical Company, Iași, România). După 180 s de incubare la temperatura camerei, reacția a fost oprită prin adăugarea a 500 μ L dintr-

un reactiv bicromat de potasiu–acid acetic glacial, compus din bicromat de potasiu 5% (Chemical Company, România) în acid acetic glacial (Sigma Aldrich, Darmstadt, Germania).

Probele au fost apoi incubate la 95 °C timp de 10 minute pentru dezvoltarea cromoforului, urmată de răcire la temperatura camerei și centrifugare la 14.000 rpm timp de 5 minute pentru îndepărtarea precipitatelor. Absorbanța supernatantului a fost citită la 570 nm. Activitatea CAT a fost calculată pe baza unei curbe de calibrare sau utilizând coeficientul de extincție al complexului de bicromat și exprimată ca $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ descompus pe minut pe miligram de proteină.

Determinarea activității glutathion peroxidazei (GPX)

Activitatea GPX în homogenatele de furnică a fost măsurată conform procedurii descrise de Fukuzawa și Tokumura [6], care cuantifică reducerea peroxizilor utilizând glutathion redus (GSH; Sigma Aldrich, Darmstadt, Germania) ca donator de electroni.

Amestecul de reacție a conținut extract enzimatic de furnică, tampon fosfat 0,25 M, EDTA 25 mM și azidă de sodiu (NaN_3) 0,4 M (Sigma Aldrich, Darmstadt, Germania) pentru a inhiba activitatea catalazei. Amestecul a fost preincubat la 37 °C timp de 10 minute. Ulterior, GSH și H_2O_2 au fost adăugate pentru inițierea reacției, care a continuat încă 10 minute la 37 °C.

Reacția a fost oprită prin adăugarea de acid metafosforic (Sigma Aldrich, Darmstadt, Germania), care a determinat precipitarea proteinelor și oprirea activității enzimatice. După centrifugare, GSH rezidual (sau produsele oxidate) a fost cuantificat spectrofotometric la 412 nm utilizând un reactiv cromogenic adecvat (de exemplu, DTNB), conform metodei originale. Activitatea GPX a fost exprimată ca unități pe miligram de proteină, o unitate reprezentând cantitatea de enzimă care catalizează conversia a 1 μmol de substrat pe minut, în condițiile de test.

Determinarea conținutului de proteine carbonilate

Gradul de oxidare a proteinelor în homogenatele de furnică a fost evaluat prin măsurarea grupărilor carbonil proteice utilizând metoda de derivatizare cu 2,4-

dinitrofenilhidrazină (DNPH; Sigma Aldrich, Darmstadt, Germania) descrisă de Oliver et al. [7], adaptată pentru extracte de insecte întregi.

Metoda se bazează pe reacția DNPH cu grupările carbonil ale reziduurilor de aminoacizi modificate oxidativ, ducând la formarea de 2,4-dinitrofenilhidrazone stabile. După derivatizare, probele au fost procesate conform protocolului de referință (precipitarea proteinelor, spălări succesive pentru îndepărtarea DNPH în exces și resuspendare în tampon adecvat), iar absorbția a fost măsurată la 370 nm.

Conținutul de carbonili a fost calculat utilizând coeficientul de extincție pentru proteinele derivatizate cu DNPH și normalizat la concentrația de proteină din fiecare probă. Rezultatele au fost exprimate ca nmol echivalenți DNPH pe miligram de proteină.

Determinarea nivelului de malondialdehidă (MDA)

Peroxidarea lipidică în homogenatele de furnică a fost evaluată prin cuantificarea malondialdehidei (MDA) utilizând metoda substanțelor reactive cu acid tiobarbituric (TBARS), conform Ohkawa et al. [8], cu adaptări pentru probe de insecte de dimensiuni reduse.

Pentru fiecare determinare, 200 μ L supernatant de homogenat de furnică au fost amestecați cu 1 mL acid tricloroacetic (TCA) 50% (Chimreactiv, București, România), 1 mL acid tiobarbituric (TBA) 26 mM (Sigma Aldrich, Darmstadt, Germania) și HCl 0,1 M (Chemical Company, Iași, România). Amestecul a fost vortexat energic și incubat la 95 °C timp de 20 de minute, apoi răcit rapid pe gheață timp de 5 minute.

După răcire, probele au fost centrifugate la 960 \times g timp de 10 minute, iar absorbția supernatantului limpede a fost înregistrată la 532 nm. Concentrațiile de MDA au fost calculate utilizând o curbă etalon (de exemplu, obținută cu 1,1,3,3-tetraetoxipropan) și exprimate ca nmol MDA pe miligram de proteină.

Toate determinările biochimice la furnici au fost efectuate în triplicat tehnic pentru fiecare replică biologică. Martorii de reactiv și curbele de calibrare corespunzătoare au fost incluși în fiecare serie de analize, pentru a asigura acuratețea, liniaritatea și reproductibilitatea rezultatelor.

Analiza datelor

Datele brute obținute din determinările biochimice au fost exportate în Microsoft Excel și prelucrate inițial prin calcularea mediei celor trei determinări tehnice pentru fiecare probă biologică (fiecare mușuroi). Pentru fiecare zonă de colectare au rezultat astfel câte trei valori independente (trei mușuroaie/zonă), iar toate analizele statistice s-au realizat pe aceste replici biologice ($n = 3/\text{zonă}$).

Pentru fiecare parametru biochimic (activități enzimatică și markeri de stres oxidativ), datele au fost exprimate ca **medie \pm eroarea standard a mediei (S.E.M.)** pentru fiecare zonă. Compararea între grupuri, în funcție de zona de colectare (factor fix cu 9 niveluri, de la Z1 – cea mai îndepărtată, la Z9 – cea mai apropiată de zona contaminată), s-a realizat prin **analiza unifactorială a varianței (one-way ANOVA)**. În prealabil au fost verificate ipotezele modelului prin testul **Shapiro–Wilk** pentru normalitatea reziduurilor și testul **Brown–Forsythe** pentru omogenitatea varianțelor, împreună cu inspecția grafică a histogramelor și Q–Q plot-urilor.

Pentru seturile de date care au respectat aceste presupuneri, identificarea diferențelor dintre perechi de zone s-a efectuat cu testul post hoc **Tukey** pentru comparații multiple. În situațiile în care normalitatea sau omogenitatea varianțelor nu au fost îndeplinite, s-a utilizat varianta neparametrică, **testul Kruskal–Wallis**, urmat de testul post hoc **Dunn** cu corecție pentru comparații multiple.

În plus, pentru a evalua existența unui **gradient spațial** al răspunsului biochimic în funcție de apropierea de sursa de metale grele, mediile pe zonă au fost corelate cu rangul zonei (1–9) utilizând coeficientul de corelație **Spearman** și, complementar, analiza regresiei liniare.

Pragul de semnificație statistică a fost stabilit la **$\alpha = 0,05$** ; în figuri și tabele valorile $p < 0,05$, $< 0,01$, $< 0,001$ și $< 0,0001$ au fost notate cu *, **, ***, respectiv ****. Toate analizele statistice au fost efectuate utilizând software-ul **GraphPad Prism**, versiunea 9.4 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, SUA).

Rezultate

Activitatea AChE

Activitatea AChE (exprimată ca nmoli ATCh/min/mg proteină) prezintă un gradient clar crescător de la zona Z1 (cea mai îndepărtată de sursa de metale grele) către Z9 (cea

mai apropiată). Media specifică este minimă în Z1 (~1,4 nmoli/min/mg), crește treptat în zonele intermediare (Z2–Z7, ~2–3,5 nmoli/min/mg) și atinge valorile cele mai mari în Z8–Z9 (~4–4,5 nmoli/min/mg) (Figura 5).

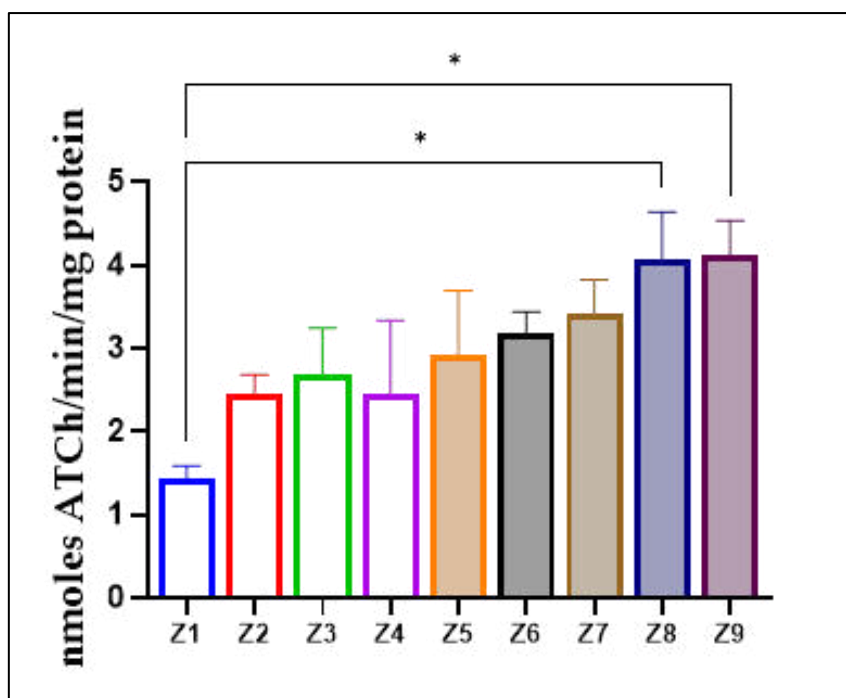


Figura 5. Activitatea acetilcolinesterazei (AChE) în homogenatele de furnici colectate din cele nouă zone (Z1–Z9), dispuse de la zona cea mai îndepărtată (Z1) la cea mai apropiată de sursa de contaminare cu metale grele (Z9). Valorile sunt exprimate ca nmoli ATCh hidrolizați/min/mg proteină (media \pm S.E.M.), $n = 3$ probe independente/zonă (câte un mușuroi per probă). Diferențele dintre zone au fost evaluate prin analiza unifactorială a varianței (one-way ANOVA) urmată de testul post hoc Tukey; barele de legătură indică comparațiile semnificative, $*p < 0,05$ față de Z1.

Analiza unifactorială a varianței (one-way ANOVA, $n = 3$ mușuroaie/zonă), urmată de testul post hoc Tukey, arată că activitatea AChE în Z5 și Z9 este semnificativ mai mare decât în Z1 (bracket-urile marcate cu *). Diferențele dintre zonele intermediare (Z2–Z4, Z6–Z8) și Z1 tind să urmeze același trend crescător, dar nu ating același nivel de semnificație după corecția pentru comparații multiple.

Per ansamblu, aceste rezultate indică un gradient spațial al activității colinesterazice, cu valori mai ridicate în zonele aflate în proximitatea maximă a contaminării cu metale grele. Acest tipar este compatibil cu o modificare dependentă de intensitatea expunerii, sugerând un răspuns enzimatic adaptativ sau un efect de stres neurotoxic subletal asupra furnicilor din zonele cele mai contaminate.

Activitatea enzimelor antioxidante

Activitatea enzimelor antioxidante arată un gradient clar de la zonele mai puțin expuse (Z1–Z3) spre zona cea mai apropiată de sursa de metale grele (Z9) (Figura 2):

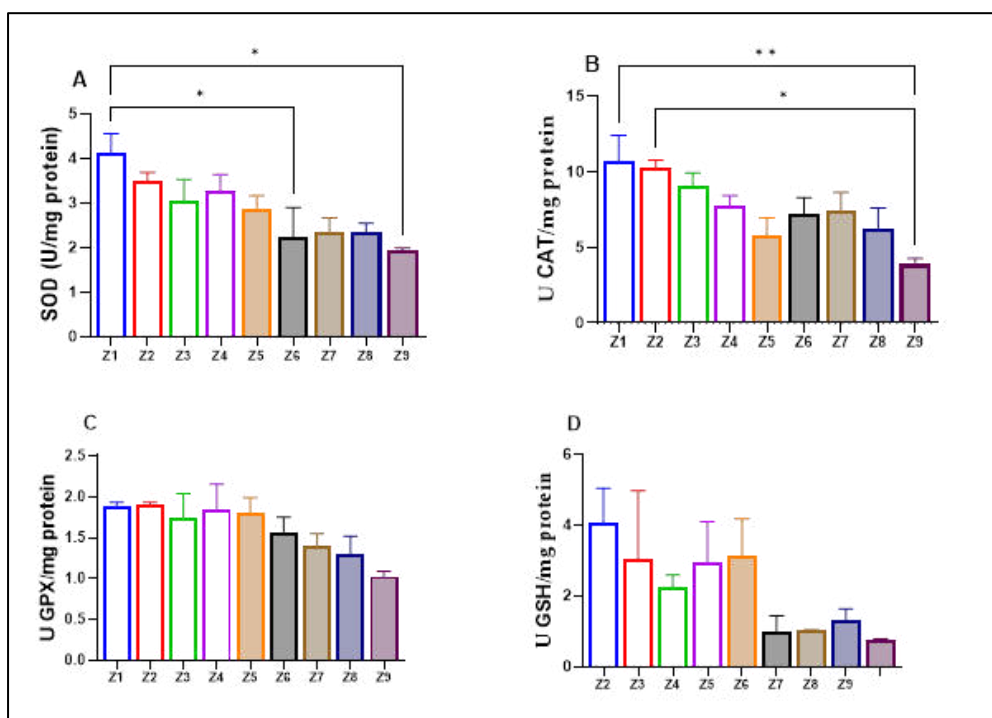


Figura 6. Activitatea enzimelor antioxidante și nivelul de glutation redus (GSH) în homogenatele de furnici colectate din cele nouă zone (Z1–Z9), ordonate de la zona cea mai îndepărtată (Z1) la cea mai apropiată de sursa de contaminare cu metale grele (Z9). (A) Activitatea superoxid dismutazei (SOD, U/mg proteină). (B) Activitatea catalazei (CAT, U/mg proteină). (C) Activitatea glutation-peroxidazei (GPX, U/mg proteină). (D) Conținutul de glutation redus (GSH, U/mg proteină). Valorile sunt exprimate ca medie ± eroarea standard a mediei (S.E.M.), $n = 3$ probe independente/zonă (câte un mușuroi per probă). Diferențele între zone au fost analizate prin one-way ANOVA, urmată de testul post hoc Tukey; barele de legătură indică comparațiile semnificative, $*p < 0,05$ (pentru comparațiile specificate în paneluri).

Activitatea SOD (Figura 6A) este maximă în Z1 (≈ 4 U/mg) și scade progresiv spre Z9 (≈ 2 U/mg). Analiza ANOVA urmată de testul Tukey arată diferențe semnificative între Z1 și zonele intermediare/proximale (în special Z5 și Z9, $p < 0,05$). Aceasta sugerează că furnicile din apropierea focarului de contaminare au o capacitate redusă de

dismutare a radicalului superoxid, posibil prin inhibiția directă a SOD de către metalele grele sau prin „epuizarea” adaptativă a enzimei în condiții de stres oxidativ cronic.

Pentru catalază (Figura 6B) se observă un model similar, dar mai pronunțat: valorile cele mai mari sunt în Z1–Z2 ($\approx 10\text{--}12$ U/mg), urmate de o scădere constantă către Z9 ($\approx 4\text{--}5$ U/mg). Diferențele între Z1 și zonele medii/proximale (de ex. Z6 și Z9) sunt semnificative statistic ($p < 0,05\text{--}0,01$, conform marcajelor cu * și **). Acest declin indică o capacitate diminuată de detoxifiere a peroxidului de hidrogen în zonele contaminate, ceea ce favorizează acumularea de peroxizi și propagarea stresului oxidativ.

Activitatea GPX (Figura 6C) este relativ ridicată și comparabilă în Z1–Z4 ($\approx 1,7\text{--}1,9$ U/mg), apoi descrește treptat până la Z9 ($\approx 1,0\text{--}1,2$ U/mg), însă fără diferențe statistice semnificative între grupuri. Tendința sugerează o posibilă ajustare fină a acestei enzime în funcție de nivelul de stres oxidativ, dar variabilitatea mare și n-ul mic fac dificilă demonstrarea fermă a unui efect al distanței față de sursa de metale.

Conținutul de GSH (Figura 6D) este evaluat doar pentru Z2–Z9 și prezintă valori mai mari și foarte variabile în zonele Z2–Z6 ($\approx 2\text{--}4$ U/mg) și niveluri joase, relativ constante, în Z7–Z9 ($\approx 0,5\text{--}1,5$ U/mg). Lipsa diferențelor semnificative și marja mare a S.E.M. sugerează răspunsuri heterogene între mușuroaie, dar, per ansamblu, se conturează o scădere a rezervelor de GSH în imediata vecinătate a sursei de metale grele, compatibilă cu consumul său pentru conjugarea xenobioticelor și neutralizarea ROS.

Împreună, aceste date indică faptul că în zonele îndepărtate de contaminare (Z1–Z3) furnicile dispun de un sistem enzimatic antioxidant funcțional, cu activități ridicate de SOD și CAT și niveluri relativ mari de GPX și GSH. Pe măsură ce coloniile sunt mai aproape de zona cu metale grele (Z6–Z9), activitatea SOD și CAT scade semnificativ, iar GPX și GSH tind, de asemenea, să se reducă. Acest profil este compatibil cu un stres oxidativ cronic asociat contaminării metalice, în care apărarea antioxidantă este inițial activată, dar ulterior deprimată sau depășită, crescând astfel vulnerabilitatea țesuturilor la peroxidare lipidică și oxidarea proteinelor.

Nivelul markerilor de stres oxidativ

Nivelul proteinelor carbonilate (Figura 7A) (exprimate ca nmoli DNPH/mg proteină) prezintă o creștere graduală de la Z1 către Z9, însă variația este moderată, cu

suprapunere importantă a barelor de eroare. Zonele Z1–Z5 au valori apropiate ($\approx 1,6$ – $2,2$ nmoli DNPH/mg), în timp ce în zonele cele mai apropiate de sursa de metale grele (Z8 și Z9) se observă cele mai mari niveluri medii ($\approx 2,5$ – $2,8$ nmoli DNPH/mg). Analiza unifactorială a varianței nu a indicat însă diferențe statistic semnificative între zone ($p > 0,05$), ceea ce sugerează că, deși există un trend de creștere a oxidării proteinelor către zonele mai contaminate, amplitudinea efectului este relativ mică și/sau variabilitatea inter-mușuroi este încă ridicată. Această tendință este totuși congruentă cu datele privind apărarea antioxidantă enzimatică: în zonele Z6–Z9, în care SOD și CAT sunt diminuate, se observă o ușoară acumulare a produselor de oxidare a proteinelor. Din punct de vedere ecotoxicologic, rezultatele indică faptul că expunerea cronică la metale grele începe să lase o „amprentă” asupra proteomului furnicilor, dar nivelul de stres oxidativ proteic se află încă într-o zonă de tranziție, fără salturi bruște între zone.

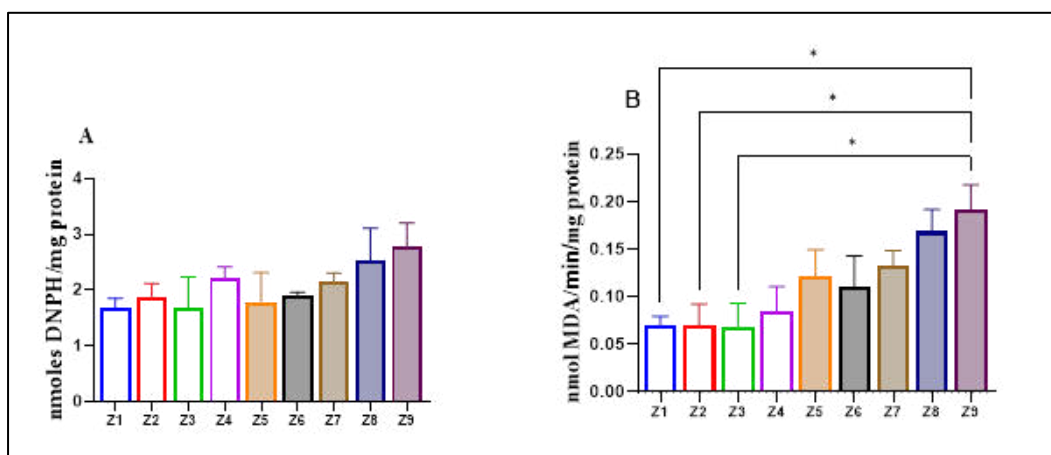


Figura 7. Markeri ai deteriorării oxidative a proteinelor și lipidelor în homogenatele de furnici colectate din cele nouă zone (Z1–Z9), ordonate de la zona cea mai îndepărtată (Z1) la cea mai apropiată de sursa de contaminare cu metale grele (Z9). (A) Nivelul proteinelor carbonilate, determinat prin reacția cu 2,4-dinitrofenilhidrazină (DNPH) și exprimat ca nmoli DNPH/mg proteină. (B) Intensitatea peroxidării lipidice, evaluată prin concentrația de malondialdehidă (MDA) și exprimată ca nmol MDA/min/mg proteină. Valorile sunt prezentate ca medie \pm eroarea standard a mediei (S.E.M.), $n = 3$ probe independente/zonă (câte un mușuroi per probă). Diferențele între zone au fost analizate prin one-way ANOVA urmată de testul post hoc Tukey; barele de legătură și asteriscurile indică comparațiile semnificative, $*p < 0,05$ (față de Z1, pentru comparațiile marcate).

Nivelul de MDA (nmol MDA/min/mg proteină) crește progresiv de la Z1 spre Z9, cu cele mai mici valori în zonele îndepărtate de contaminare (Z1–Z3, $\approx 0,08$ – $0,10$ nmol/min/mg) și cele mai mari în zonele cele mai apropiate de sursă (Z8–Z9, $\approx 0,18$ – $0,21$ nmol/min/mg). Analiza one-way ANOVA a evidențiat un efect semnificativ al zonei de colectare asupra peroxidării lipidice, iar testul post hoc Tukey a arătat că nivelurile de MDA din zonele cele mai contaminate (în special Z5, Z8 și Z9) sunt semnificativ mai mari decât în Z1 ($p < 0,05$). Acest lucru indică faptul că, odată cu apropierea de sursa de metale grele, membranele celulare ale furnicilor sunt supuse unui stres oxidativ net crescut.

Comparând acest profil cu activitatea enzimelor antioxidante, se conturează un tablou coerent: în timp ce activitățile SOD și CAT scad progresiv de la Z1–Z2 către Z7–Z9, MDA crește, ceea ce sugerează că, în zonele cu încărcătură mai mare de metale grele, capacitatea antioxidantă este depășită, rezultând o intensificare a peroxidării lipidice. În ansamblu, MDA pare a fi un marker mai sensibil al gradientului de contaminare decât proteinele carbonilate, reflectând mai clar „costul oxidativ” al viețuirii în proximitatea sursei de poluare.

Concluzii

În ansamblu, rezultatele obținute descriu un gradient biochimic coerent, corelat cu distanța față de sursa de contaminare cu metale grele. Activitatea AChE crește semnificativ de la Z1 către Z8–Z9, sugerând o afectare neurochimică dependentă de intensitatea expunerii, compatibilă fie cu un răspuns adaptativ, fie cu un efect neurotoxic subletal în zonele cele mai contaminate.

În paralel, activitățile enzimelor antioxidante majore (SOD și CAT) scad progresiv în zonele apropiate de focar, iar GPX și GSH prezintă tendințe de diminuare, indicând o capacitate defensivă antioxidantă tot mai redusă odată cu apropierea de sursa de metale. Această alterare a apărării antioxidante se reflectă la nivelul markerilor de stres oxidativ: proteinele carbonilate prezintă o creștere modestă, dar consistentă către Z8–Z9, iar MDA evidențiază o peroxidare lipidică semnificativ crescută în zonele cele mai contaminate.

Profilele enzimatică și non-enzimatică indica faptul că furnicile din proximitatea sursei de metale grele se află într-o stare de stres oxidativ cronic, caracterizată prin activitate colinesterazică crescută, apărare antioxidantă enzimatică deprimată și acumulare de

produse de oxidare a lipidelor și proteinelor. Acest tipar susține utilizarea furnicilor ca bioindicatori sensibili ai contaminării cu metale grele în ecosistemele terestre.

5.5 Alte rezultate:

De asemenea a fost submis manuscrisul cu cu titlul:

- Brînză, I., Popovici, L., Țicu, S., Tăușan I - *Phenotypic Plasticity and Ecological Resilience in Social Insects: Epigenetic, Nutritional, and Thermal Responses to Environmental Stressors*

Acest manusris este in curs revizuire (under review).

În final, avem și un al doilea manuscris în lucru:

- Țicu S., Brînză, Popovici, L., Răduțiu, M.,R., Zgăvărogea R., Tăușan, I. - *Ant assemblages (Hymenoptera: Formicidae) in heavy metal polluted grasslands. A study case from Southern Transylvania (Romania).*

6. Bibliografie selectiva:

Balch, T., Khan, Z., & Veloso, M. (2001). Automatically Tracking and Analyzing the Behavior of LiveInsect Colonies.

BioTracking. (n.d.). Retrieved February 28, 2025, from <https://www.cs.cmu.edu/~multirobotlab/biotracking/>

Bradford, M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem* 1976, 72, 248–254, doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3.

Burc, E., Girard-Tercieux, C., Metz, M., Cazaux, E., Baur, J., Koppik, M., Rêgo, A., Hart, A. F., & Berger, D. (2025). Life-history adaptation under climate warming magnifies the agricultural footprint of a cosmopolitan insect pest. *Nature Communications* 2025 16:1, 16(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41467-025-56177-2>

Chang, Y. W., Zhang, X. X., Chen, J. Y., Lu, M. X., Gong, W. R., & Du, Y. Z. (2019). Characterization of three heat shock protein 70 genes from *Liriomyza trifolii* and expression during thermal stress and

insect development. *Bulletin of Entomological Research*, 109(2), 150–159. <https://doi.org/10.1017/S0007485318000354>

Dong, W., Zou, Y., Zhao, C., Huang, T., Jiang, W., Li, F., & Wu, S. (2025). Glutathione-s-transferase regulates oxidative stress in *Megalurothrips usitatus* in response to environmental stress. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 208, 106299. <https://doi.org/10.1016/J.PESTBP.2025.106299>

Dukes, J. S., Jennifer Pontius, David Orwig, Jeffrey, R. G., Vikki, L. R., Nicholas Brazee, Barry Cooke, Kathleen, A. T., Erik, E. S., Robin Harrington, Joan Ehrenfeld, Jessica Gurevitch, Manuel Lerdau, Kristina Stinson, Robert Wick, & Matthew Ayres. (2009). Responses of insect pests, pathogens, and invasive plant species to climate change in the forests of northeastern North America: What can we predict? *Canadian Journal of Forest Research*, 39(2), 231–248. <https://doi.org/10.1139/X08-171/ASSET/IMAGES/X08-171T4H.GIF>

Durak, R., Dampc, J., Kula-Maximenko, M., Mołoń, M., & Durak, T. (2021). Changes in antioxidative, oxidoreductive and detoxification enzymes during development of aphids and temperature increase. *Antioxidants*, 10(8), 1181. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX10081181/S1>

Ellman, G.L.; Courtney, K.D.; Andres, V.; Feather-Stone, R.M. A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity. *Biochem Pharmacol* 1961, 7, 88–95.

Fukuzawa, K.; Tokumura, A. Glutathione Peroxidase Activity in Tissues of Vitamin E-Deficient Mice. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 1976, 22, 405–407

Gal, A., Saragosti, J., Kronauer, D. J. C. (2020). Antrax, a software package for high-throughput video tracking of color-tagged insects. *ELife*, 9, 1–32. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.58145>

Gekière, A. (2025). Terrestrial insect defences in the face of metal toxicity. *Chemosphere*, 372, 144091. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2025.144091>

Goto, A., Ji, S., Chtarbanova, S., & Kuraishi, T. (2023a). Editorial: Inflammatory and inflammatory-like responses in insects. *Frontiers in Immunology*, 14, 1184429. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2023.1184429>

Goto, A., Ji, S., Chtarbanova, S., & Kuraishi, T. (2023b). Editorial: Inflammatory and inflammatory-like responses in insects. *Frontiers in Immunology*, 14, 1184429. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2023.1184429>

Guate. (2024). Behavioral Ecology of Social Insects: Insights from Ant Colony Dynamics. *Journal of Applied Optics*, 137–142. <https://appliedopticsjournal.net/index.php/JAO/article/view/94>

Gupta, A., Nair, S. (2025). Epigenetic processes in insect adaptation to environmental stress. *Current Opinion in Insect Science*, 67, 101294. <https://doi.org/10.1016/J.COIS.2024.101294>

Gupta, T.; Mullins, M.C. Dissection of Organs from the Adult Zebrafish. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)* 2010, e1717, doi:10.3791/1717.

Halsch, C. A., Shapiro, A. M., Fordyce, J. A., Nice, C. C., Thorne, J. H., Waetjen, D. P., & Forister, M. L. (2021). Insects and recent climate change. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(2), e2002543117. https://doi.org/10.1073/PNAS.2002543117/SUPPL_FILE/PNAS.2002543117.SAPP.PDF

Hilker, M., Meiners, T. (2011). Plants and insect eggs: How do they affect each other? *Phytochemistry*, 72(13), 1612–1623. <https://doi.org/10.1016/J.PHYTOCHEM.2011.02.018>

John, A., Riat, A. K., Ahmad Bhat, K., Ganie, S. A., endarto, O., Nugroho, C., Handoko, H., & Wani, A. K. (2024a). Adapting to climate extremes: Implications for insect populations and sustainable solutions. *Journal for Nature Conservation*, 79, 126602. <https://doi.org/10.1016/J.JNC.2024.126602>

John, A., Riat, A. K., Ahmad Bhat, K., Ganie, S. A., endarto, O., Nugroho, C., Handoko, H., & Wani, A. K. (2024b). Adapting to climate extremes: Implications for insect populations and sustainable solutions. *Journal for Nature Conservation*, 79, 126602. <https://doi.org/10.1016/J.JNC.2024.126602>

Kohlmeier, P., Billeter, J. C. (2023). Genetic mechanisms modulating behaviour through plastic chemosensory responses in insects. *Molecular Ecology*, 32(1), 45–60. <https://doi.org/10.1111/MEC.16739>

Manoukis, N. C., Collier, T. C. (2019). Computer Vision to Enhance Behavioral Research on Insects. *Annals of the Entomological Society of America*, 112(3), 227–235. <https://doi.org/10.1093/AESA/SAY062>

Mendiola, S. Y., Chen, J. Z., Lukubye, B., Civitello, D. J., Vega, N. M., & Gerardo, N. M. (2024). Differential gene expression in the insect vector *Anasa tristis* in response to symbiont colonization but not infection with a vectored phytopathogen. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 12, 1390625. <https://doi.org/10.3389/FEVO.2024.1390625/BIBTEX>

Menzel, F., & Feldmeyer, B. (2021a). How does climate change affect social insects? *Current Opinion in Insect Science*, 46, 10–15. <https://doi.org/10.1016/J.COIS.2021.01.005>

Menzel, F., Feldmeyer, B. (2021b). How does climate change affect social insects? *Current Opinion in Insect Science*, 46, 10–15. <https://doi.org/10.1016/J.COIS.2021.01.005>

Mukherjee, K., Dobrindt, U. (2022). The emerging role of epigenetic mechanisms in insect defense against pathogens. *Current Opinion in Insect Science*, 49, 8–14. <https://doi.org/10.1016/J.COIS.2021.10.004>

Nojima, Y. (2021). Characterization of heat shock protein 60 as an interacting partner of superoxide dismutase 2 in the silkworm, *bombyx mori*, and its response to the molting hormone, 20-hydroxyecdysone. *Antioxidants*, 10(9), 1385. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX10091385/S1>

Oliver, C.N.; Ahn, B.W.; Moerman, E.J.; Goldstein, S.; Stadtman, E.R. Age-Related Changes in Oxidized Proteins. *J Biol Chem* 1987, 262, 5488–5491.

- Ohkawa, H.; Ohishi, N.; Yagi, K. Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction. *Anal Biochem* 1979, 95, 351–358
- Perez, R., & Aron, S. (2020a). Adaptations to thermal stress in social insects: recent advances and future directions. *Biological Reviews*, 95(6), 1535–1553. <https://doi.org/10.1111/BRV.12628>
- Perez, R., & Aron, S. (2020b). Adaptations to thermal stress in social insects: recent advances and future directions. *Biological Reviews*, 95(6), 1535–1553. <https://doi.org/10.1111/BRV.12628>
- Perl, C. D., & Baird, E. (2023). Editorial: Insects as a model in behavioral ecology. *Frontiers in Insect Science*, 3, 1298274. <https://doi.org/10.3389/FINSC.2023.1298274/BIBTEX>
- Rodrigues, Y. K., Beldade, P. (2020). Thermal Plasticity in Insects' Response to Climate Change and to Multifactorial Environments. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 8, 568593. <https://doi.org/10.3389/FEVO.2020.00271/PDF>
- Salerno, G., Reborá, M., & Gorb, S. (2023). Mechanoecology and Chemoecology: Physical and Chemical Interactions between Insects and Plants. *Insects* 2023, Vol. 14, Page 657, 14(7), 657. <https://doi.org/10.3390/INSECTS14070657>
- Sinha, A.K. Calorimetric Assay of Catalase. *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY* 1972, 47, 389–394.
- Sinha, A.K. Calorimetric Assay of Catalase. *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY* 1972, 47, 389–394.
- Sclocco, A., Ong, S. J. Y., Aung, S. Y. P., & Teseo, S. (2020). Integrating real-time data analysis into automatic tracking of social insect behavior. *BioRxiv*, 2020.11.03.366195. <https://doi.org/10.1101/2020.11.03.366195>
- Serdo, D. F. (2024). Insects' perception and behavioral responses to plant semiochemicals. *PeerJ*, 12(7), e17735. <https://doi.org/10.7717/PEERJ.17735>
- Si, F. L., Qiao, L., He, Q. Y., Zhou, Y., Yan, Z. T., & Chen, B. (2019). HSP superfamily of genes in the malaria vector *Anopheles sinensis*: Diversity, phylogenetics and association with pyrethroid resistance. *Malaria Journal*, 18(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/S12936-019-2770-6/FIGURES/6>
- Tronson, E., & Enders, L. (2025). Root microbes can improve plant tolerance to insect damage: Asystematic review and meta-analysis. *Ecology*, 106(1), e4502. <https://doi.org/10.1002/ECY.4502>
- ToxTrac software: Rodriguez A, Zhang H, Klaminder J, Brodin T, Andersson P.L, Andersson M., ToxTrac: a fast and robust software for tracking organisms. *Computer Vision and Pattern Recognition*, 2017. <https://doi.org/10.48550/arXiv.1706.02577>
- Winterbourn, C.C.; Hawkins, R.E.; Brian, M.; Carrell, R.W. The Estimation of Red Cell Superoxide Dismutase Activity. *J Lab Clin Med* 1975, 85, 337–341.