

“Evaluarea genetică și monitorizarea factorilor moleculari și biotehnologici care influențează performanțele productive la speciile de sturioni de Dunăre crescute în sisteme intensive recirculante”- AQUASTUR -

Etapa IV. Identificarea parametrilor biotehnologici optimi în vederea îmbunătățirii gradului de adaptabilitate la stres și a obținerii unor rate superioare de supraviețuire și creștere la sturionii din specia *Huso huso* destinați acvaculturii.

Activitatea 4.1. Analiza parametrilor biochimici și a principalelor enzime antioxidante cu rol protector (SOD, CAT, GR și GPX), glutatation, peroxidaza lipidică din sângele genitorilor de morun cu scopul de a evalua statusul de sănătate și adaptarea la stres.

Activitatea 4.2. Analiza markerilor ADN în vederea identificării și caracterizării speciilor pure de sturioni și a hibridilor obținuți din acestea în acvacultură.

Activitatea 4.3. Testarea modului experimental de creștere în sistem recirculant și de monitorizare a morunului în acvacultură în scopul îmbunătățirii performanțelor productive.

Activitatea 4.4. Realizarea primei serii de experimente din cadrul proiectului privind producerea și dezvoltarea larvară la morunul (*Huso huso*) de Dunăre.

Activitatea 4.5. Completarea bancii de material biologic (recoltarea, transportul și conservarea de probe).

Activitatea 4.6. Identificarea factorilor biotici și abiotici responsabili de inducerea fenomenului de stres și evaluarea răspunsurilor fiziologice pentru specia *Huso huso*. Monitorizarea factorilor identificați pe perioada creșterii experimentale.

Activitatea 4.7. Organizare workshop.

Activitatea 4.8. Completarea paginii web a proiectului cu datele din Etapa IV.

Activitatea 4.9. Diseminare rezultate la conferințe naționale și internaționale și publicare de articole științifice.

REZUMAT

În ultimii ani în studiile asupra fiziologiei peștilor s-au folosit metode uzuale în evaluarea stării de sănătate a animalelor, cu scopul de a evalua starea de sănătate dar și a adaptării la stres. Astfel, s-a introdus noțiunea de profil metabolic sanguin, care constă în determinări hematologice sanguine și biochimice ale profilului proteic, glucidic, mineral, energetic, și care oferă informații despre starea fiziologică a peștilor. Analizele biochimice pot oferi informații importante pentru monitorizarea stării de sănătate a peștilor, prin detectarea eventualelor perturbări metabolice. În vederea analizei parametrilor biochimici s-au recoltat probe biologice de sânge prin puncție din vena caudală, de la masculii și femelele de morun, atât din mediul natural – pescuți din Dunăre cât și crescuți în mediu controlat de acvacultură. Au fost cunoscute principalii indicatori hematologici: numărul de eritrocite, hematocritul, hemoglobina și constantele eritrocitare. Parametri biochimici plasmatici au fost determinați cu ajutorul Autoanalizorului VETTEST 8008 bazat pe tehnologia specifică biochimiei uscate și pe reacția colorimetrică care utilizează kituri speciale. De asemenea, a fost analizată activitatea enzimatică a principalelor enzime cu rol protector: catalaza, superoxid dismutaza, glutatation-S-transferaza, glutatation peroxidaza și glutatation reductaza. Valorile activităților enzimactice pentru toate enzimele enumerate s-au menținut relativ constante, diferențele fiind nesemnificative statistic, încadrându-se în limitele normale raportate pentru alte specii de sturion.

Analiza la nivel molecular a indivizilor/ liniilor/ stocurilor de sturioni se realizează utilizând diferiți markeri ADN, cum ar fi secvența ADN mitocondrial sau markeri nucleari de tipul microsateliților. În vederea caracterizării potențialilor genitori selectați pentru reproducerea dirijată ca aparținând speciei pure sau având caracter de hibrid interspecific a fost selectat inițial un set de microsateliți, dintre aceștia fiind utilizați ulterior 8 microsateliți care funcționează ca loci disomici (cu cel mult două alele/individ) în cazul speciilor de sturioni de Dunăre cu 120 de cromozomi, cum ar fi *Huso huso*. În urma analizei diversității genetice cu ajutorul microsateliților, s-a observat că locii aleși prezintă un grad de polimorfism suficient de mare pentru ca locii să fie informativi pentru analiza diversității genetice.

Completarea băncii de material biologic inițiată în cadrul proiectului s-a realizat prin adăugarea probelor constând în fragmente prelevate din înotătoarea anală de la reproducătorii de morun.

Rezultatele obținute în urma acestui studiu evidențiază că exemplarele analizate prezintă reacții reduse la stresul indus de densitățile diferite de stocare, sugerând o capacitate bună de adaptare la creșterea intensivă. Observațiile preliminare ale răspunsului fiziologic al organismului sunt similare celor realizate de alți autori pe exemplare de vârstă timpurie la specia morun, supuse stresului acut de manipulare și de captivitate și care au sugerat că înregistrarea unor reacții reduse de stres pot fi explicate de istoria lor evolutivă asociată cu dezvoltarea adaptativă la factorii stresori din mediul natural.

Deși cercetările care au examinat răspunsul fiziologic al exemplarelor la acțiunea stresului de densitate au dus la obținerea unor rezultate originale, datele înregistrate sugerează o gamă largă de variație fiziologică prin comparație cu alte specii de sturioni aceste diferențe putând fi atribuite și stadiului de dezvoltare, regimului de hrană precum și frecvenței operațiilor de manipulare.

Analiza parametrilor biochimici și a principalelor enzime antioxidante cu rol protector (SOD, CAT, GR și GPX), glutatation, peroxidaza lipidică din sângele genitorilor de morun cu scopul de a evalua statusul de sănătate și adaptarea la stres.

În ultimii ani în studiile asupra fiziologiei peștilor s-au folosit metode uzuale în evaluarea stării de sănătate a animalelor, cu scopul de a evalua starea de sănătate dar și a adaptării la stres. Astfel, s-a introdus noțiunea de profil metabolic sanguin, care constă în determinări hematologice sanguine și biochimice ale profilului proteic, glucidic, mineral, energetic, și care oferă informații despre starea fiziologică a peștilor. Analizele biochimice pot oferi informații importante pentru monitorizarea stării de sănătate a peștilor, prin detectarea eventualelor perturbări metabolice. Date din literatura de specialitate atestă modificări ale indicatorilor biochimici în funcție de specie, vârstă, sex sau stare de sănătate (Akrami et al., 2013; Charoo et al., 2013).

Analiza parametrilor hematologici și biochimici plasmatici. În vederea analizei sângelui sub aspect hematologic și biochimic s-au recoltat probe biologice de sânge (1 mL) prin puncție din vena caudală de la juvenili. O parte din sângele integral (200 μ L), recoltat cu seringi heparinate în prealabil, a fost folosit pentru realizarea hemogramei, iar restul a fost centrifugat la 8000 rpm timp de 10 min pentru separarea plasmei de elementele figurate. Cu ajutorul metodelor standard pentru hematologia veterinară (Svobodova, 2001), s-au determinat indicii hematologici (numărul de eritrocite - $Ex \times 10^6 \text{ cel./}\mu\text{l}$), hemoglobina - Hb g/dL, hematocritul – Ht %) și constantele eritrocitare (volumul eritocitar mediu – VEM fL, hemoglobina eritocitară medie – HEM pg și concentrația în hemoglobină eritocitară medie – CHEM g/dL) conform metodologiei prezentată detaliat în raportul etapei 1/2012. Parametri biochimici plasmatici (TP, Glu, Alb, Glob, Chol, Trig, Alt, Ast) au fost determinați cu ajutorul Autoanalizorului IDEEX VETTEST 8008, a cărui principiu de funcționare constă în utilizarea tehnologiei specifice biochimiei uscate și a reacției colorimetrice, utilizând kit-uri speciale compatibile IDEXX VetTest.

Profilul hematologic. Datorită funcțiilor sale, sângele poate evidenția, prin reacția sa, capacitatea organismului de a răspunde operativ și adaptativ prin mecanisme de homeostazie și alostazie la variațiile și modificările externe (Klontz, 2013) pentru a păstra în limite normale, integritatea, structura și funcționalitatea organismului peștilor. Reacția hematologica este dată de variațiile hematocritului, hemoglobinei, numărului de eritrocite, precum și de a constantelor eritrocitare, înregistrate pe parcursul experimentului, prezentate sintetic în tabelul 1.

Analizând valorile indicilor hematologici și a constantelor eritrocitare prezentate analitic în tabelul 6 și grafic în figurile 1-6 se desprind următoarele observații:

Tabel 1. Parametri hematologici pe parcursul experimentului și reacția la acțiunea stresului de densitate.

Densitate		DS_30 (V1)		DS_45 (V2)		DS_90 (V3)		DS_135 (V4)	
Etapa		<i>final</i>	<i>initial</i>	<i>initial</i>	<i>initial</i>	<i>final</i>	<i>final</i>	<i>initial</i>	<i>final</i>
E ($\times 10^6 \text{ cel./}\mu\text{l}$)	<i>Media</i>	0,78	0,99	0,93	0,96	0,78	0,81	0,92	0,73
	<i>St.dev.</i>	0,12	0,14	0,08	0,18	0,11	0,08	0,08	0,15

	<i>Min.</i>	0,62	0,88	0,82	0,74	0,64	0,73	0,79	0,56
	<i>Max.</i>	0,96	1,23	1,01	1,18	0,89	0,93	1,02	0,93
Hb (g/dL)	<i>Media</i>	5,76	6,14	5,91	6,37	6,13	5,77	6,05	6,38
	<i>St.dev.</i>	0,47	0,94	0,42	0,73	0,81	0,41	0,58	0,81
	<i>Min.</i>	5,18	4,63	5,33	5,74	5,17	5,31	5,24	5,31
	<i>Max.</i>	6,27	6,84	6,25	7,54	6,98	6,22	6,66	7,55
Ht (%)	<i>Media</i>	16,17	17,97	18,01	18,05	16,25	15,73	16,40	15,53
	<i>St.dev.</i>	1,77	1,57	0,81	1,81	3,17	2,42	2,21	2,27
	<i>Min.</i>	13,51	16,25	16,90	16,50	13,55	12,20	12,50	13,79
	<i>Max.</i>	17,95	20,25	18,90	20,95	21,11	18,54	17,70	19,46
VEM (fL)	<i>Media</i>	210,03	184,68	195,24	192,09	214,69	194,93	178,01	216,92
	<i>St.dev.</i>	27,53	30,84	21,41	28,55	67,41	19,40	12,84	35,19
	<i>Min.</i>	182,57	145,93	167,33	164,73	169,43	168,28	159,24	166,14
	<i>Max.</i>	248,39	218,92	226,22	239,86	332,44	217,74	192,39	263,78
HEM (pg)	<i>Media</i>	74,83	62,53	63,99	67,54	80,53	72,15	65,88	89,14
	<i>St.dev.</i>	9,20	10,33	7,03	8,32	18,68	7,88	2,79	13,09
	<i>Min.</i>	65,64	52,87	52,77	55,68	58,71	62,74	61,51	66,11
	<i>Max.</i>	87,86	73,91	71,36	78,84	109,85	81,85	69,04	97,21
CHEM (g/dL)	<i>Media</i>	35,68	34,09	32,82	35,38	38,30	37,22	37,20	41,85
	<i>St.dev.</i>	1,56	3,92	2,07	3,73	5,78	4,65	3,56	8,77
	<i>Min.</i>	34,20	27,54	30,13	31,36	33,04	31,30	31,97	31,59
	<i>Max.</i>	38,31	37,70	35,48	40,85	47,68	43,51	41,89	54,72

O în ceea ce privește **numărul de eritrocite** nu au fost evidențiate modificări semnificative nici față de momentul inițial (testul T-paired, $p > 0,05$), nici la comparația mediilor obținute pentru cele patru loturi experimentale (ANOVA, $p > 0,05$, $p = 0,783$), valorile obținute încadrându-se în ecartul optim pentru sturioni $0,56 \pm 1,23 \times 10^6$ celule/μl sânge (Ghittino, 1983; Dicu, 2013).

O raportat la momentul inițial al experimentului, valorile **hematocritului** prezintă o scădere generală, semnificativă fiind doar în varianta cu cea mai mare densitate, DS_135 (testul T- paired, $p < 0,05$; $p = 0,4$), unde se observă o reducere cu o valoare medie de aproximativ 1,80 % la sfârșitul experimentului. Aceste valori înregistrate la sfârșitul experimentului se situează sub limita inferioară raportată de alți autori pentru puietul altor specii de sturioni (Knowles și colab., 2006; Docan și colab., 2011; Dicu și colab., 2013). De altfel, comparând valorile finale înregistrate pentru cele patru loturi experimentale, nivelul hematocritului nu a înregistrat valori semnificativ diferite (ANOVA, $p > 0,05$; $p = 0,959$), valorile cele mai scăzute fiind obținute în lotul DS_30 ($15,52 \pm 2,27$ %);

O raportat la momentul inițial al experimentului, analiza variației cantității de **hemoglobină** evidențiază o tendință de creștere, nesemnificativă, pentru lotul cu densitatea DS_30 și de scădere pentru celelalte trei loturi (testul T-paired, $p > 0,05$) la finalul experimentului. De asemenea, comparând, la final, valorile hemoglobinei între cele patru loturi, nu au fost observate diferențe semnificative (ANOVA, $p > 0,05$; $p = 0,390$), valoarea cea mai mică fiind înregistrată în cazul lotului DS_45 ($5,75 \pm 0,46$ g/dl).

O raportat la momentul inițial, **volumul eritrocitar mediu** prezintă o creștere nesemnificativă (testul T- paired, $p > 0,05$) la sfârșitul experimentului; comparația valorilor obținute între cele patru variante experimentale nu a evidențiat diferențe semnificative la nivelul loturilor experimentale (ANOVA, $p > 0,05$; $p = 0,837$), densitatea diferită neafectând volumul ocupat de eritrocite. Aceste valori crescute pentru VEM indică o rată a sintezei hemoglobinei diferită de cea a diviziunilor celulare care este mai redusă. În consecința componentele citoplasmice, inclusiv hemoglobina, sunt sintetizate în exces în timpul întârzierii între diviziunile celulare, ducând la formarea unor eritrocite de dimensiuni crescute.

O valorile **hemoglobinei eritrocitare medii** reprezentând conținutul mediu de hemoglobină pe eritrocit prezintă modificări semnificative față de momentul inițial la nivelul loturilor cu densitatea DS_30 (testul T-paired, $p < 0,05$; $p = 0,021$) și D_45 (testul T-paired, $p < 0,05$; $p = 0,048$), valorile la sfârșitul experimentului înregistrând o creștere medie de 23,25 pg, respectiv de 10,84 pg față de debut. De altfel, creșterea valorilor pentru această constantă eritocitară la sfârșitul experimentului este una generală, însă comparația mediilor celor patru loturi experimentale pentru densitățile diferite ilustrând diferențe nesemnificative (ANOVA, $p > 0,05$; $p = 0,209$). În majoritatea situațiilor, HEM se corelează cu VEM deoarece conținutul eritocitar normal de Hb este aproximativ 95% din concentrația de Hb maxim posibilă aspect caracteristic anemiilor macrocitare. O valorile concentrației eritocitare medii de hemoglobină (CHEM) care măsoară raportul dintre masa de hemoglobină și volumul de eritrocite arată o tendință generală de creștere pe parcursul derulării experimentului privind reacția puietului la stresul de densitate. Chiar dacă nesemnificativă din punct de vedere statistic (ANOVA, $p > 0,05$, creșterea a fost omogenă la nivelul celor patru loturi experimentale, astfel încât analiza statistică nu a evidențiat diferențe notabile determinate de stresul de densitate.

Profilul biochimic sanguin. Cuantificarea modificărilor cantitative ale profilului biochimic sanguin, prin analiza parametrilor biochimici implicați în evaluarea stării de sănătate sau în evidențierea unor disfuncții metabolice, este utilă pentru caracterizarea stării fiziologice sau a eventualelor modificări patologice care pot surveni ca urmare a reacției de apărare a organismului.

Unele studii au evidențiat la peștii crescuți în densități ridicate o mărire temporară a cantității de glucoză din sânge și/sau a concentrației de cortizol (Barcellos et al., 1999; Ruane et al., 2002), în timp ce alții nu au observat nici un efect (Vijayan et al., 1990; Kebus et al., 1992; Procarione et al., 1999). Creșterea cortizolului plasmatic afectează metabolismul carbohidraților prin stimularea producției de glucoză prin gluconeogeneză, ducând la creșterea cantității de glucoză plasmatică. Drept urmare, cuantificarea variației glucozei din sânge a devenit una dintre cele mai uzuale tehnici de monitorizare a stresului la pești (Pickering & Pottinger, 1989; Barton & Iwama, 1991).

În tabelul 2 sunt prezentate valorile parametrilor biochimici atât la începutul experimentului cât și la final în cele patru variante de densitate. Din analiza statistică a parametrilor biochimici din plasma sanguină, a exemplarelor crescute în densități diferite de stocare, nu s-au evidențiat diferențe semnificative (ANOVA; $p > 0,05$) în ceea ce privește nivelul plasmatic al TP, Glu, Alb, Glob, Chol, Trig, Ast ci doar valoarea enzimei ALT a înregistrat diferențe semnificative (ANOVA; $p < 0,05$) față de momentul inițial al experimentului.

Concentrația *proteinelor plasmaticice* este afectată, în primul rând, de modificările volumului plasmatic, care la pești a putut fi observată în unele condiții stresante. În studiul nostru valoarea proteinelor plasmaticice a variat între 1,7 – 2,13 g/dl, și cu excepția loturilor DS_45 și DS_90 unde s-au înregistrat valori ușor mai reduse, acestea s-au încadrat în limitele normale pentru puietul de sturioni. Cu toate acestea, diferențele înregistrate între cele patru loturi de densitate au fost nesemnificative statistic (ANOVA; $p > 0,05$). În general, un nivel scăzut al proteinemiei indică aport necorespunzător al proteinelor în hrană care va intensifica astfel catabolismul proteic ducând în final la epuizarea organismului (Patriche, 2008).

Albuminele și globulinele reprezintă principalele categorii de proteine plasmaticice. Albuminele sunt sintetizate exclusiv în ficat și datorită implicării lor în hidratarea intravasculară și în transportul metaboliților endogeni și exogeni (Baker M.E., 2002), pot reflecta starea de sănătate metabolică a peștilor sau existența unor condiții stresante. Analiza nivelului albuminelor plasmaticice pe parcursul experimentului evidențiază variații în ecartul $0,42 \pm 0,58$ g/dL, fără diferențe semnificative ($p > 0,05$; $p = 0,56$) între cele patru loturi experimentale, însă valorile înregistrate au fost mai scăzute decât cele raportate de literatura de specialitate pentru juvenalii altor specii de sturioni (0,8–1,7 g/dL). Modificarea valorii proteinelor plasmaticice și diminuarea nivelului categoriilor proteice poate duce la o perturbare a echilibrului homeostatic al organismului crescând susceptibilitatea la îmbolnăviri.

Cuantificarea *glucozei* din sânge a înregistrat valori similare cu cele găsite în literatura de specialitate (Saeedeh et al, 2008), înregistrându-se o creștere a valorii glicemice ($67 \pm 29,11$ mg/dl) la lotul DS_90, însă nesemnificativă statistic (ANOVA; $p > 0,05$). Glucoza este o sursă importantă de energie pentru menținerea homeostaziei organismului, în timpul glicolizei anaerobe, glicogenul stocat în ficat și mușchi putând fi utilizat în producerea de ATP. Dat fiind faptul că o creștere a concentrației de glucoză plasmatică este un răspuns

fiziologic caracteristic peștilor supuși unui stres acut sau cronic, rezultatele obținute în studiul de față atestă că densitatea de stocare nu a indus modificări fiziologice în metabolismul glucidic.

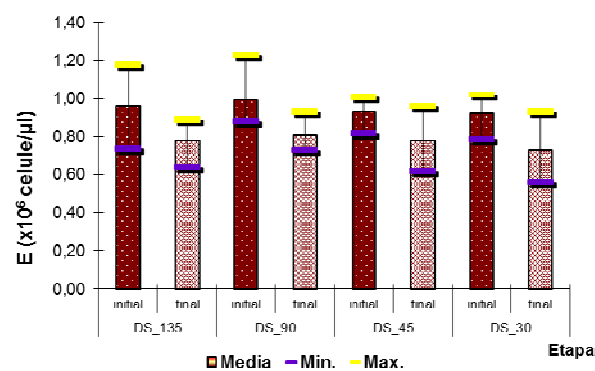


Figura 1. Dinamica numărului de eritrocite în cadrul experimentului de densitate.

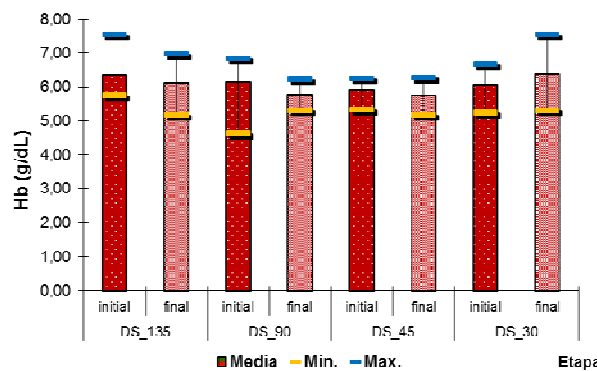


Figura 2. Dinamica hemoglobinei în cadrul experimentului de densitate

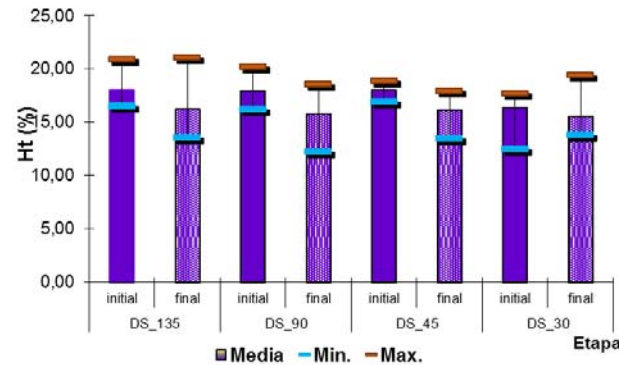


Figura 3. Dinamica hematocritului în cadrul experimentului de densitate.

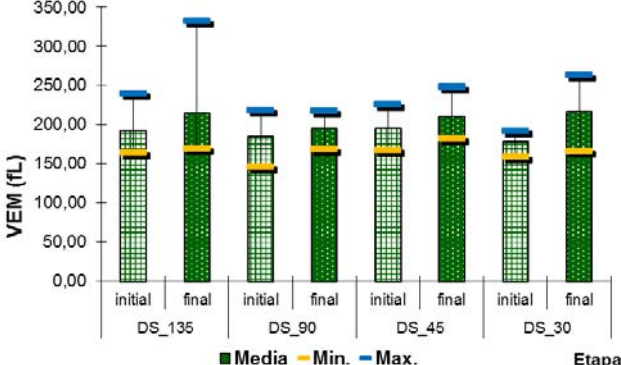


Figura 4. Dinamica volumului eritrocitar mediu în cadrul experimentului de densitate.

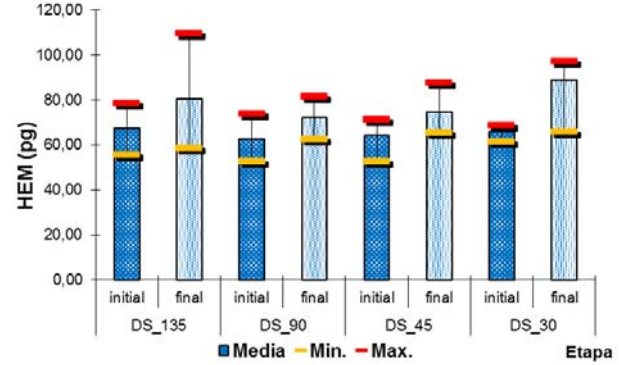


Figura 5. Dinamica hemoglobinei eritrocitare medii în cadrul experimentului de densitate.

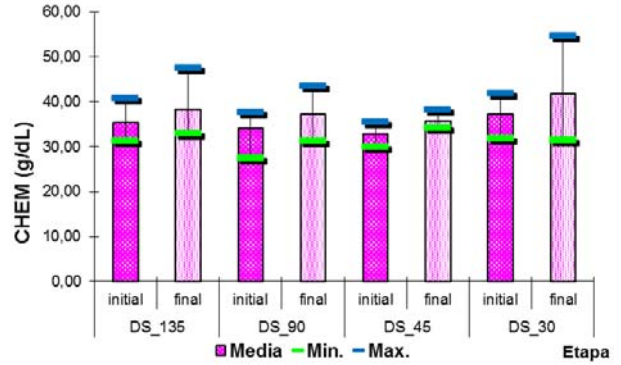


Figura 6. Dinamica volumului eritrocitar mediu în cadrul experimentului de densitate.

Tabel 2. Dinamica parametrilor biochimici ai puietului crescut în diferite densități de stocare.

Parametru biochimic (U.M.)	Loturile experimentale (Media±St.dev.)				
	INITIAL	DS_30 ex	DS_45 ex	DS_90 ex	DS_135 ex
TP(g/dL) Proteine totale	1,98±0,23	2,04±0,32	1,76±0,27	1,70±0,80	2,13±0,46
ALB(g/dL) Albumin	0,44±0,09	0,5±0,1	0,42±0,07	0,58±0,19	0,46±0,19
GLOB(g/dL) Globuline	1,58±0,15	1,56±0,22	1,34±0,22	1,63±0,17	1,6±0,26

GLU (mg/dL) Glucoză	37,8±10,27	50,4±11,66	47,2±6,69	67±29,11	49,8±7,10
CHOL (mg/dL) Cholesterol	81,8±10,76	68,8±11,25	67,2±19,39	76±11,93	59,75±15,47
TRIG(mg/dl) Triglyceride	400±0,00	373±0,00	208±0,00	400±0,00	374±0,82
ALT (U/L) Alanin Aminotrasferază	256±29,95	171±28,14	168±15,06	170±22,3	194±14,82
AST (U/L) Aspartat Aminotrasferază	643±70,37	574,2±100,62	609,4±78,25	491,8±246,11	590,8±101,74

Efectul factorilor de stres asupra unor specii de pești a fost corelat cu un conținut redus de lipide (Svobodova et al., 2006). În cazul nostru, se remarcă o diminuare a concentrației *colesterolului* plasmatic din sânge din lotul DS_135 unde s-au înregistrat valori de 59,75 mg/dl față de 68,8 mg/dl în DS_30, 67,2 mg/dl în DS_45 și 76 mg/dl în DS_90, însă aceste diferențe au fost ne semnificative statistic (ANOVA; $p > 0.05$). Trigliceridele și colesterolul sunt substanțe energetice de bază, derivate din absorbția lipidelor în intestin și a metabolismului acizilor grași în ficat. Vijayan et al. (1990) au raportat o reducere a valorii trigliceridelor în cazul speciei *Salvelinus fontinalis* expusă acțiunii stresante a densității de stocare care a generat astfel, cereri mai mari de energie.

ALT, AST sunt enzime care pot oferi, indirect, informații despre buna funcționare a ficatului, fiind în strânsă legătură cu metabolismul proteinelor, grăsimilor și carbohidraților, unele studii indicând că stresul influențează activitatea enzimelor legată de metabolismul energetic celular (Zhang et al., 2007). Spre deosebire de alți parametri biochimici, analizați în acest studiu, activitatea enzimei ALT a înregistrat o reducere semnificativă statistic (ANOVA; $p < 0,05$, $p = 0,005 \div 0,01$) în toate cele patru variante de densitate raportat la momentul inițial. În ceea ce privește compararea nivelului enzimei ALT între loturi se observă o creștere a valorii ALT în DS_135 înregistrând valori de 194 U/L versus 171 U/L în DS_30, 168 U/L în DS_45, 170 U/L în DS_90, însă ne semnificativă statistic (ANOVA; $p > 0,05$, $p = 0,33$), rezultat ce sugerează o posibilă afectare a funcției hepatice.

Evaluarea activității enzimatice a superoxid dismutazei (SOD): SOD este o enzimă inductibilă, efectul inductiv al anionului superoxid asupra sintezei acesteia fiind demonstrat la bacterii anaerobe și facultativ aerobe dar și la mamifere. Măsurarea activității SOD a fost realizată utilizând metoda spectrofotometrică descrisă de Paoletti (1986), care se bazează pe capacitatea SOD de a cataliza reacția de transformare a anionilor superoxid în oxigen molecular și peroxid de hidrogen. Procesul de oxidare a NADH a fost urmărit timp de 20 de minute, prin modificarea densității optice la 340nm, după o perioadă de incubare de 5 minute la 37°C la un multireader TECAN. Mediul de reacție a conținut: 20μl EPT, 160 μl TDB (tampon 100mM trietanolamină – 100mM dietanolamină, pH 7,4), 5μl soluție EDTA 100mM/ MnCl₂ 50mM, 8μl NADH 7,5 mM. Reacția enzimatică a fost declanșată prin adăugarea a 20 μl β-mercaptoetanol. După cele 5 minute de incubare la 37°C, citirile s-au efectuat față de un martor care nu conține EPT. O unitate de activitate SOD este definită ca acea cantitate de enzimă necesară inhibării cu 50% a ratei de oxidare a NADH din martor.

Evaluarea activității enzimatice a catalazei (CAT): Majoritatea celulelor aerobe conțin catalaza. La animale este prezentă în aproape toate organele. În celulă, catalaza se găsește în peroxizomi și în cantități mult mai mici în mitocondrie și în reticulul endoplasmatic. Măsurarea activității CAT s-a realizat conform metodei spectrofotometrice descrisă de Aebi (1974), urmărind modificarea densității optice la 240nm, timp de un minut. Degradarea H₂O₂ sub acțiunea catalazei existente în EPT a fost urmărită după adăugarea a 50 μl EPT în amestecul de reacție care conținea 600 μL de tampon fosfat de potasiu, 0,1M pH 7,1 și 350 μL H₂O₂ 0,059 M. Citirile au fost realizate față de un martor în care nu a fost adăugat peroxidul de hidrogen. O unitate enzimatică descompune 1μmol de H₂O₂ într-un minut la 25°C și pH 7, $k / \text{min} = 2,3 / \text{min} \times \log E1/E2$, unde E1 este valoarea $\Delta DO_{240nm} / \text{min}$ inițială și E2 este valoarea $\Delta DO_{240nm} / \text{min}$ finală. Determinarea activității catalazice a fost realizată utilizând spectrofotometrul Jasco V-530.

Evaluarea activității enzimatice a glutathion reductazei (GR): GR catalizează reducerea legăturii disulfurice a glutathionului oxidat GSSG rezultând două molecule de glutathion redus. GR este o FAD-enzimă homodimeră

cu o structură înalt conservată în toate regnurile, fiind indusă în condiții de stres oxidativ. Rolul său în apărarea antioxidantă este acela de a reface GSH, un important antioxidant celular (Mannervik, 1987). Evaluarea activității GR a fost realizată utilizând metoda descrisă de Goldberg și Spooner (1983). Metoda de determinare a activității enzimatice se bazează pe capacitatea GR de a cataliza reacția de reducere a glutatationului oxidat cu participarea NADPH. Oxidarea NADPH a fost urmărită spectrofotometric timp de 5 minute pe baza scăderii densității optice la 340nm. Reacția enzimatică catalizată de GR a fost declanșată prin adăugarea a 25μl EPT în amestecul de reacție care conține 855 μL H₂O, 50 μL tampon fosfat de K 0,1 M, pH 7,7, 50 μl NADPH 2mM și 20 μL GSSG 33mM. Citirile au fost efectuate față de un martor în care nu s-a adăugat soluție 33 mM GSSG. Activitatea enzimatică a fost calculată ca nmoli NADPH oxidat/min/mg proteină, folosind coeficientul de extincție molară al NADP⁺ $6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Evaluarea activității glutatation reductazei a fost realizată utilizând spectrofotometrul Jasco V-530.

Evaluarea activității enzimatice glutatation-S-transferazei (GST): Glutathion S-transferazele sunt enzime implicate în metabolismul xenobioticelor. GST pot constitui până la 10% din proteinele citosolice în unele organe de la mamifere (Boyer, 1989) și catalizează conjugarea glutatationului redus (la nivelul grupării sulfhidril) la centrele electrofile ale unei mari varietăți de substraturi (Douglas, 1987). Dozarea activității GST a fost realizată cu ajutorul metodei descrise de Habig (1974). GST catalizează reacția în care este utilizat GSH și un substrat electrofil. Reacția enzimatică a fost urmărită spectrofotometric prin creșterea absorbantei la 340nm. Metoda folosește un substrat electrofil de tipul clor dinitrobenzenului. Creșterea absorbantei la 340 nm a fost urmărită timp de 5 minute, la 25 °C, după adăugarea a 50 μl EPT în amestecul de reacție care conținea 630 μl H₂O, 200 μL tampon fosfat de K 0,1 M, pH 7,1, 20 μL soluție alcoolică 1-clor, 2,4-dinitrobenzen (CDNB) 25 mM și 100 μL GSH 20 mM. Reacția enzimatică a fost urmărită față de o probă martor în care nu a fost adăugat extractul proteic total cu activitate GST. Activitatea enzimatică specifică a fost calculată ca nmoli GS, folosind coeficientul de extincție molară $9,6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Evaluarea activității glutatation-S-transferazei a fost realizată utilizând spectrofotometrul Jasco V-530.

Evaluarea activității enzimatice a glutatation peroxidazei (GPX): GPX face parte dintr-o familie de enzime ce catalizează detoxifierea hidroperoxizilor organici rezultați din procesele metabolice normale prin conjugarea acestora cu GSH. Există mai multe izoenzime codificate de gene diferite. Până în acest moment, la om, s-au descoperit opt izoforme diferite de GPX. GPX1 este cea mai des întâlnită, găsindu-se în citoplasmă la aproape toate mamiferele și al cărei substrat este H₂O₂. GPX4 are o afinitate mai mare pentru hidroperoxizii lipidici, fiind exprimată în celulele mamiferelor dar în cantități mai mici. Funcția biochimică a glutatation peroxidazei este aceea de a reduce hidroperoxizii lipidici la alcooli și de a reduce H₂O₂ la apă. GPX2 și GPX3 sunt enzime extracelulare, prima fiind găsită și în intestin, iar cea de-a doua este abundentă la nivelul plasmei sanguine. Determinarea activității GPX a fost realizată folosind metoda descrisă de Beutler (1984), bazată pe capacitatea GPX de a cataliza reacția de reducere a peroxidului de hidrogen și a altor peroxizi în prezența GSH. Metoda aleasă pentru determinarea activității enzimei se bazează pe monitorizarea formării GSSG, care este redus continuu prin adăugarea unui exces de glutatation reductază, generând un nivel constant de GSH. Determinarea cantitativă a GSSG format se face indirect, prin măsurarea oxidării concomitente a NADPH la $\lambda=340 \text{ nm}$, în conformitate cu reacția catalizată de glutatation reductază. Procesul de oxidare a NADPH a fost urmărit timp de 5 minute, la 25°C, după adăugarea a 10 μL terț butil hidroxiperoxid 7mM într-un amestec de reacție care conținea 798 μl H₂O, 100 μL tampon Tris/HCl 1M, EDTA 5 mM, pH 8, 20 μL GSH 0,1 M, 1μL glutatation reductază, 60 μl NADPH 2 mM, 10μL EPT, care a stat în repaus la temperatura camerei 5 minute. Activitatea enzimatică a fost calculată ca nmoli NADPH oxidat/min/mg proteină, folosind coeficientul de extincție molară $6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$. Evaluarea activității glutatation peroxidazei a fost realizată utilizând spectrofotometrul Jasco V-530. În cazul nostru valorile activităților enzimatice pentru toate enzimele enumerate s-au menținut relativ constante, diferențele fiind ne semnificative statistic, încadrându-se în limitele normale raportate pentru alte specii de sturion.

Analiza markerilor ADN în vederea identificării și caracterizării speciilor pure de sturioni și a hibrizilor obținuți din acestea în acvacultură

Analiza la nivel molecular a indivizilor/ liniilor/ stocurilor de sturioni se realizează utilizând diferiți markeri ADN, cum ar fi secvența ADN mitocondrial sau markeri nucleari de tipul microsateiților. Prin genotiparea

indivizilor este posibil să determinăm originea acestora, dar și nivelul de heterozigotie al liniilor/ stocurilor de acvacultură și distanța genetică dintre acestea. Înaintea realizării experimentelor de reproducere dirijată, au fost caracterizați din punct de vedere molecular genitorii de morun. Analiza markerilor ADN s-a realizat în cazul reproducătorilor de morun ce au atins maturitatea sexuală și care au fost considerați a fi apti din punct de vedere fiziologic pentru a fi implicați în reproducerea asistată. Aceștia au fost reprezentați de femele și masculi caracterizați prin mijloace ecografice, care au atins maturitatea sexuală și care au capacitatea fiziologică de a se reproduce. Posibili genitori au provenit atât din mediul natural, fiind pescuiți în Dunăre, cât și din acvacultură. De la indivizii respectivi au fost prelevate probe biologice au constatat în fragmente de înotătoare fixate în etanol. Probele respective pot fi stocate în această formă pentru o perioadă îndelungată, fără a fi afectată calitatea ADN extras din acestea.

Izolarea de ADN genomic din fragmentele de înotătoare prelevate a fost realizată utilizând un protocol clasic cu fenol-cloroform-alcool izoamilic, având la bază un proces de extracție care se desfășoară după următoarele etape: i) omogenizarea țesutului prin procedee mecanice sau chimice (în cazul țesuturilor solide); ii) îndepărtarea membranelor lipidice utilizând detergenți; iii) îndepărtarea proteinelor (cu proteaze și prin precipitare cu solvenți organici) și ARN (cu ribonuclează); iv) precipitarea ADN în soluție alcoolică concentrată. Purity și concentrația probelor ADN a fost verificată spectrofotometric prin citirea soluțiilor de ADN la un spectrofotometru de tip NanoDrop8000.

Șapte dintre cei 11 loci microsatelitari selectați au fost amplificați prin două reacții multiplex. Pentru *Huso huso* a fost efectuată o reacție 5-plex (pentru LS19, LS34, LS54, LS68, Aox45), respectiv 2-plex (pentru LS57 și Aox23). Ulterior, analiza s-a realizat prin electroforeză capilară cu detecție în fluorescență. Ceilalți loci au fost amplificați prin reacții monoplex și analizați prin electroforeză în gel de poliacrilamidă.

Caracterizarea microsateliților selectați și genotiparea indivizilor

Locusul LS19 a prezentat la toți indivizii un profil diploid, ceea ce înseamnă că pentru fiecare individ analizat a fost obținut un singur semnal (corespunzător pentru două alele identice - individ homozigot) sau două (corespunzătoare pentru două alele diferite - individ heterozigot). Locusul LS19 a fost caracterizat la specia *Acipenser fulvescens*, la care a și fost identificat inițial (May *et al.*, 1997). Acest locus prezintă un motiv repetitiv trinucleotidic (TTG)_n și acest aspect a permis, în cazul nostru, discriminarea între alelele reale și artefactele de amplificare. Pentru specia *Huso huso* au fost identificate 9 alele cu mărimea de 133, 136, 139, 148, 151, 154, 157, 160, respectiv 163pb. Frecvența alelică a fost calculată cu ajutorul programului Genetix (Belkir *et al.*, 2002) și rezultatele obținute au fost prezentate în tabelul 3.

Locusul LS34 a prezentat la toți indivizii un profil diploid, prezentând pentru fiecare individ una sau două alele (Figura 1). Locusul LS34 a fost caracterizat pentru prima dată la specia *Acipenser fulvescens* (May *et al.*, 1997) și prezintă un motiv repetitiv trinucleotidic (GTT)_n. Luând în considerare acest aspect, a fost facilitată discriminarea între alelele reale și artefacte. Locusul LS34 a prezentat o alelă unică de 142 pb.

Locusul LS54 a fost caracterizat la specia *Acipenser fulvescens* (May *et al.*, 1997) ca fiind un locus cu un motiv repetitiv tetranucleotidic (GATA)_n. Acest locus prezintă un profil diploid pentru populațiile de sturioni aparținând speciei *Huso huso* (Figura 7).

Locusul LS54 a manifestat un nivel ridicat de polimorfism în cadrul populației analizate. Pentru *H. huso* au fost identificate 8 alele: 152, 212, 220, 224, 232, 236, 240, 244, 248 și 252.

Locusul LS57 a fost identificat la *A. fulvescens* și s-a constatat că prezintă un motiv repetitiv de tipul (GAA)_n. În cazul fiecărui individ analizat au fost identificate câte 2 până la 4 alele pentru locusul respectiv.

Analiza electroforegramelor obținute a confirmat că alelele observate constituie alele reale, și nu artefacte de amplificare. În sprijinul acestei afirmații vine faptul că semnalele observate corespund unor mărimi ale alelelor care respectă motivul repetitiv de 3 pb, caracteristic locusului LS57. Apariția unui profil poliploid în cazul acestui locus readuce în discuție gradul de ploidie al sturionilor. Până în prezent nu există programe statistice care să permită analiza datelor poliploide. În plus, este foarte dificil de estimat genotipul real în cazul locilor poliploizi. De aceea, locusul LS57 a fost eliminat din calculul statistic și ne-am limitat la identificarea alelelor obținute pentru fiecare populație analizată.

Locusul LS68 prezintă un motiv repetitiv tetranucleotidic (GATA)_n și a fost caracterizat pentru prima dată la specia *Acipenser fulvescens* (May *et al.*, 1997). Acest locus prezintă un profil diploid pentru *Huso huso* și totodată a fost observat un nivel mic de polimorfism, fiind evidențiate doar trei alele: 144, 148 și 152 pb.

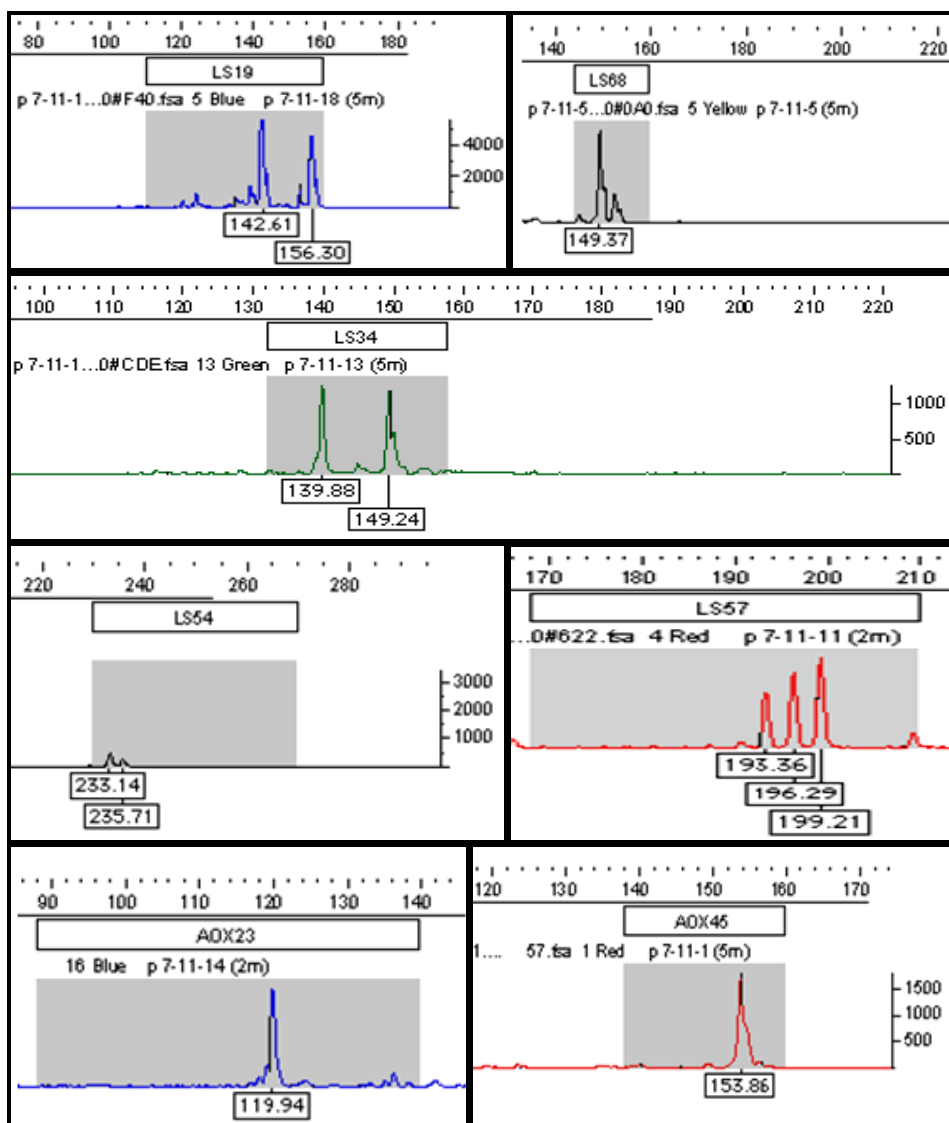


Figura 7. Profilele obținute pentru șapte microsateliți la morun.

Locusul Aox23 prezintă un motiv repetitiv complex, de tipul $(ATT)_x(AC T)_y(AAT)_z$, care a fost izolat și caracterizat la specia *Acipenser oxyrinchus* (King *et al.*, 2001). Acest locus a prezentat un profil diploid pentru morun (Figura 7). În cazul populației analizate au evidențiate 4 alele: 91, 106, 118 și 136.

Locusul Aox45 prezintă un motiv repetitiv trinucleotidic de tipul $(AAT)_n$ și a fost caracterizat inițial la *A. oxyrinchus* (King *et al.*, 2001). Acest locus prezintă un profil diploid pentru *Huso huso*. Toți indivizii analizați au fost homozigoți, caracterizându-se prin prezența unei alele fixe de 154 pb.

Locusul LS39 a fost caracterizat inițial la sturionul de lac nord-american, *Acipenser fulvescens*, observându-se că prezintă un motiv repetitiv de tipul $(GTT)_n$ (May *et al.*, 1997). În cadrul populației de morun din Dunăre au fost identificate patru alele: 105, 108, 111 și 114. Au fost calculate frecvențele alelice cu ajutorul programului Genetix (Belkir *et al.*, 2002).

Locusul AnacE4 a fost izolat inițial la sturionul adriatic *Acipenser naccarii*, fiind caracterizat de o repetiție dinucleotidică $(CA)_n$ (Forlani *et al.*, 2008). Locusul a prezentat un profil diploid. În cadrul populației de morun studiată au fost identificate alelele 332, 334, 336, 338, 358 și 360.

Locusul AnacC11, similar locusului AnacE4, a fost izolat și caracterizat pentru prima dată la specia *A. naccarii* și prezintă un motiv repetitiv tetranucleotidic $(TCTA)_n$ (Forlani *et al.*, 2008). Pentru populațiile din Dunăre, aparținând speciei *Huso huso* s-a observat un profil diploid pentru acest locus microsatelitar, ceea ce a permis genotiparea tuturor indivizilor. Au fost identificate trei alele: 145, 165 și 173 pb.

Locusul AoxD234 a fost izolat la specia *Acipenser oxyrinchus* și se caracterizează printr-un motiv repetitiv tetranucleotidic (TAGA)_n (Henderson-Arzapalo *et al.*, 2002). Acest locus prezintă un profil diploid pentru speciile cu ~120 de cromozomi, considerate funcțional diploide. În cazul populațiilor de morun au fost identificate 10 alele: 199, 207, 211, 215, 219, 227, 239, 243, 247 și 251 pb.

Analiza statistică a datelor și interpretarea rezultatelor

Estimarea diversității genetice a fost realizată prin calculul unor indici statistici cu ajutorul programului Genetix (Belkir *et al.*, 2002).

Tabel 3. Alele observate și frecvențele alelice calculate la exemplarele din specia *Huso huso*.

Alele	LS19	Alele	LS54	Alele	LS68	Alele	Aox23	Alele	AnacE4	Alele	AoxD234
133	0.0093	152	0.0100	144	0.1389	91	0.0500	332	0.1296	195	0.0093
136	0.0278	212	0.0400	148	0.6111	106	0.4400	334	0.5278	199	0.0185
142	0.1111	220	0.0400	152	0.2500	118	0.3500	336	0.0093	207	0.0278
148	0.0278	224	0.0200			136	0.1600	338	0.0185	211	0.0185
151	0.1019	232	0.0200					358	0.1759	215	0.2130
154	0.2130	236	0.2300	Alele	AnacC11	Alele	LS39	360	0.1389	219	0.0093
157	0.1019	240	0.0400	145	0.4444	105	0.2500			227	0.2500
160	0.3333	244	0.3600	165	0.2037	108	0.6111			239	0.0370
163	0.0741	248	0.0600	173	0.3519	111	0.1204			243	0.0648
		252	0.1800			114	0.0185			247	0.1111
										251	0.2407

Astfel, au fost calculate valorile medii ale heterozigoției estimate (H_E), heterozigoției observate (H_O) și deviațiile lor standard, precum și numărul mediu de alele per locus (Tabel 4). Se consideră că markerii moleculari sunt utili în studii de variație genetică dacă prezintă o heterozigoție medie între 0,3 și 0,8 (Takezaki & Nei, 1996). Heterozigoția reprezintă unul dintre parametrii cei mai importanți care ne poate da informații despre diversitatea și chiar istoria unei populații. Valorile heterozigoției pot varia între 0 (absența heterozigoției) și 1 (în cazul existenței unui număr mare de alele cu aceeași frecvență). Ambele situații au fost observate în cadrul analizei noastre. Astfel, pentru locusul LS34 au fost obținute valori ale heterozigoției egale cu 0, acesta fiind caracterizat de prezența unei alele fixe în populație, iar pentru locusul AoxD234 a fost obținută valoarea 1. Valori ridicate ale heterozigoției medii semnifică un nivel crescut de variație genetică. În schimb, dacă heterozigoția medie este redusă diversitatea genetică este de asemenea redusă. În cazul analizei efectuate de noi, heterozigoția observată este mai mică decât cea estimată, ceea ce poate sugera existența cosangvinizării între indivizi.

Tabel 4. Heterozigoția observată (H_O), estimată (H_E) și numărul mediu de alele per locus.

Locus	H_E	H_O	Medie
LS19	0.8033	0.6667	
LS34	0.0000	0.0000	
LS39	0.5492	0.3889	
LS54	0.7758	0.4800	
AnacE4	0.6540	0.3889	
AnacC11	0.6372	0.4259	
AoxD234	0.8146	0.9815	
Medie	0.6049± 0.2843	0.4760±0.2989	6.2857

Echilibrul Hardy-Weinberg a fost testat cu ajutorul programului GenePop v1.2. (Raymond & Rousset, 1995). Toți locii au arătat deviații de la echilibrul H-W. Deviațiile de la valorile așteptate pot avea mai multe cauze, cum ar fi, mărimea scăzută a populației, existența fenomenului de cosangvinizare sau prezența alelelor nule în populație, alele care pot conduce la un exces fals de homozigoți. Analiza unui număr mai mare de loci poate oferi o imagine corectă a diversității genetice deoarece fiecare locus va conține o istorie independentă a populației care depinde de proporția mutațiilor sau de deriva genetică.

Datele obținute de noi vin în completarea datelor de evaluare și monitorizare a populațiilor de sturioni din Dunărea Inferioară. Ca urmare a unor factori antropici, printre care cel mai recent îl constituie pescuitul intens și necontrolat în perioada 1990-2004, populațiile de sturioni care se reproduc în Dunăre au atins un prag critic.

Testarea modului experimental de creștere în sistem recirculant și de monitorizare a morunului în acvacultură în scopul îmbunătățirii performanțelor productive. Realizarea primei serii de experimente din cadrul proiectului privind producerea și dezvoltarea larvară la morunul de Dunăre. Identificarea factorilor biotici și abiotici responsabili de inducerea fenomenului de stres și evaluarea răspunsurilor fiziologice pentru specia *Huso huso*. Monitorizarea factorilor identificați pe perioada creșterii experimentale.

Implementarea tehnologiilor de creștere a sturionilor s-a realizat în mai multe tipuri de sisteme tehnologice, extensiv cu valorificarea superioară a hranei trofice naturale, semiintensiv în monocultură și policultură interspecifică, cu specii de ciprinide asiatice cu valorificarea bazei trofice naturale și administrarea de furaje, însă cel mai des sistem tehnologic uzilizat a fost cel intensiv recirculant.

Creșterea sturionilor în sistemul de acvacultură intensiv recirculant este în dependență absolută față de hrana artificială. Hrănirea sturionilor în perioada de pui este considerată o perioadă critică. O multitudine de studii și cercetări au evidențiat rolul determinant al hrănirii, faptul că aceasta este unul dintre cei mai importanți factorii în etapa de creștere, cu impact asupra ritmului de creștere, a ratei supraviețuirii, a menținerii unui biomediu de calitate, a minimizării stresului și maximizării eficienței economice. Deci, hrănirea reprezintă o condiție esențială a succesului în creșterea acestor specii. O hrănire neadecvată sub aspect calitativ și cantitativ, o perioadă scurtă de privare de hrană, reprezintă un potențial factor stresant care poate avea repercursiuni în plan comportamental, instalarea canibalismului, morfologic, prin manifestarea fenomenului de degenerare la nivelul aparatului digestiv și la nivelul țesutului muscular.

Pentru punerea în evidență a efectului indus de privarea de hrană asupra indicatorilor bioproductivi ai puietului crescut în sistem de acvacultură intensiv recirculant a fost inițiat un experiment pe o durată de 30 de zile. Cercetările experimentale s-au desfășurat în perioada 15.07.2015 – 05.11.2015, în doua ecotipuri de bazine de creștere din cadrul sistemului de acvacultură intensiv recirculant aparținând partenerului P3 – S.C. OSETRA FARM S.R.L. Materialul biologic a fost reprezentat de puiet rezultat în urma reproducerii artificiale efectuate în cursul anului 2015 în cadrul Statiei sturionice aparținând partenerului P2 - S.C. Kaviar House S.R.L. Materialul sturionicol a fost populat în sistem la data de 15.07.2015.

Caracteristicile tehnice și funcționale ale sistemului de acvacultură intensiv recirculant

Sistemul intensiv de creștere este realizat pe o platformă betonată în suprafață de 1845,47 mp și are în componența sa: hala producție I în suprafață de 199,93 mp, hala de producție II în suprafață de 929,47 mp, spațiu multifuncțional în suprafață de 196,42 mp și casa pompe cu suprafață 24,94 mp. Unitatea este racordată la o rețea de energie electrică și este dotată cu un sistem de rezervă pentru producerea curentului electric, de tipul generatoarelor. Cele doua incinte de tip hală sunt realizate din BCA și panouri metalice, izolate bine din punct de vedere hidric și termic, în care sunt amplasate următoarele sisteme necesare creșterii intensive a sturionilor: sistemul de alimentare cu apă proaspătă ; modulele de creștere a sturionilor

Sursa de apă este asigurată din pânza de apă freatică având calitatea corespunzătoare cerințelor fiziologice ale speciei de cultură. Sistemul de alimentare cu apă proaspătă din pânza freatică este compus din puț forat de medie adâncime, două bazine de stocare din beton, un bazin din fibră de sticlă, electropompă submersibilă. Necesarul zilnic de apă proaspătă introdus în sistem este de 10% din volumul total al apei din bazinele de creștere (165 m³).

Modulele de creștere sunt în număr de 26 și se compun din: un bazin de creștere, instalația de alimentare cu apă proaspătă, un sistem de pompare al apei tehnologice, un sistem de filtrare al apei tehnologice, conductă de evacuare a apei uzate.

Caracteristicile bazinelor. Primul ecotip de bazin este reprezentat de un bazin circular, construit din pânză caucată amplasată pe un cadru metalic, având diametru de 3,05 m și o suprafață utilă de 7,3 mp, adâncimea apei din acest bazin fiind de 30 cm și un volum de exploatare tehnologică de 2,19 mc. Cel de al doilea ecotip este reprezentat de patru bazine de formă rectangulară, fabricate din inox, cu dimensiuni de (3,5 x 1,96 x 0,6 m) și un volum de exploatare tehnologică 2,05 m³. Fiecare bazin de creștere are în componență un filtru și o

pompă de recirculare a apei. Sistemul de filtrare al apei tehnologice, cu rol de condiționarea apei recirculate, este compus din trei compartimente supraetajate realizate din material plastic. Apa tehnologică uzată este pompată în compartimentul superior al filtrului, care are rolul de a asigura o distribuție uniformă pe întreaga suprafață a compartimentului imediat inferior. Acest al doilea compartiment are rol de filtrare a apei, operațiunea realizându-se în două trepte: pe o prima treaptă are loc o filtrare mecanică prin intermediul unor bureți din material poros (MP) în grosime de 30 de cm, la nivelul căruia sunt reținute particulele groiere, cea de-a doua treaptă, filtru biologic propriu-zis, alcătuit dintr-o succesiune de materiale filtrante (agregate minerale de diferite mărimi și diverse materiale ceramice în cantitate de 10 kg/unitate de filtrare) în care are loc reținerea compușilor cu azot.

Organizarea experimentului. Un lot de 250 exemplare cu o masă individuală de 20g obținut prin reproducere artificială în cursul anului 2015 de Partenerul P2 - S.C. Kaviar House S.R.L a fost preluat la data de 15.07.2015. Lotul a fost distribuit într-o primă fază într-un bazin circular cu un volum de 2,19 mc pentru aclimatizare la noile condiții tehnologice de creștere. Înainte ca bazinul de creștere să fie populat, a fost dezinfectat cu albastru de metil și în fiecare filtru s-a adăugat 50 ml soluție de Sera Nitrivec pentru formarea culturilor de bacterii nitrificatoare.

Condițiile de temperatură și chimism a biomediei acvatic nu au variat în limite mari și s-au încadrat în parametrii prezentați în tabelul 5.

Tabel 5. Chimismul și termica biomediei acvatic din cadrul sistemului de acvacultură intensiv recirculant.

Oxygen mg/l	Temperatura -°C-	pH -UpH-	NO ²⁻ -mg/l-	NO ³⁻ mg/l
8	17,2 – 17,5	7,2 - 8	1 – 1,3	13 – 19

Lotul a fost crescut în condițiile mai sus menționate pe o perioadă de 42 de zile până la începerea testelor de privare de hrană. Hrănirea s-a realizat cu furaj tip COPPENS de 2 mm. Numărul meselor a fost stabilit la 8 mese/ 24 h. Cantitatea de hrană administrată a fost de 2,2% din masa lotului. Ritmul mediu de creștere înregistrat în această perioadă a fost de 145,51g/exemplar, ceea ce raportat la perioada de creștere reprezintă 3,46g/zi spor creștere. Supraviețuirea înregistrată a fost de 90%.

Experimentul propriu-zis a demarat în luna septembrie, lotul a fost distribuit în cinci bazine, 45 de ex/bazin, exemplarele au fost atent selecționate, loturile constituite au fost omogene ca talie. Durata experimentului a fost de 30 de zile, variantele experimentale fiind organizate după schema din tabelul 6.

Tabel 6. Schema experimentală aplicată.

Lot martor Nr. exemplare – 45 Masa medie individuală – 187,1g/ex. Masa totală – 8420g	Neînfometat
V1 – 7 Nr. exemplare – 45 Masa medie individuală – 159g/ex. Masa totală -7160 g	Lot înfometat 7 zile - hrănit 7 zile și monitorizat până la atingerea masei medii inițiale
V2 – 14 Nr. exemplare – 45 Masa medie individuală – 108g/ex. Masa totală -4860 g	Lot înfometat 14 zile – hrănit 14 zile și monitorizat până la atingerea masei medii inițiale
V3 – 21 Nr. exemplare – 45 Masa medie individuală – 132 g/ex Masa totală – 5940 g	Lot înfometat 21 zile – hrănit 21 zile și monitorizat până la atingerea masei medii inițiale
V4 – 28 Nr. exemplare – 45 Masa medie individuală – 132 g/ex Masa totală – 5940 g	Lot înfometat 28 zile – hrănit 28 zile și monitorizat până la atingerea masei medii inițiale

Condițiile de biomediu acvatic pe perioada de derulare a experimentului de privare de hrană au fost monitorizate zilnic pentru temperatură, oxigen, pH, nitriții și nitrații și săptămânal pentru ceilalți parametri. Valorile înregistrate sunt prezentate în tabelul 7.

Tabel 7. Valorile de biomediu acvatic pe perioada derulării experimentului.

Parametru chimic	Limite			
	Minime	Optime	Maxime	Valori medii
pH – upH	6,9	7 – 7,8	8 – 8,5	7,65
O ₂ solvit – mg/l	6	7 - 12	14	8
Ca ²⁺ - mg/l	30	90-120	160	76,20
Mg ²⁺ - mg/l	5	10-40	50	114
Cl ⁻ (cloruri) - mg/l	6	30	40	147
NO ₃ ⁻ - mg/l	1	2,5 - 4	30	78,3
NO ₂ ⁻ - mg/l	-	lipsă	0,002	0,027
SO ₄ ²⁻ - mg/l	0 – 15	20 - 40	70 – 80	235
NH ₄ ⁺ - mg/l	0,05 – 0,5	0,5 - 1	2	0,077
Alcalinitate ml HCL/l	0,2	2 - 4	6	11,00
Duritate (°D)	8	12 - 18	20	44,10

Zilnic, pe parcursul derulării experimentului și pe perioada de monitorizare, până la atingerea masei medii inițiale, materialul sturionicol a fost cântărit. Evaluarea rezultatelor s-a realizat prin calcularea și reprezentarea grafică a indicatorilor biotehnologici realizați (Tabel 8 și Figura 8).

Tabel 8. Indici biotehnologici înregistrați la puietul privat de hrană.

Număr variantă	Lot martor	Varianta 1	Varianta 2	Varianta 3	Varianta 4
0	1	2			
Privare de hrană – zile	-	7	14	21	28
Începutul experimentului					
Nr. exemplare	45	45	45	45	45
Biomasa inițială – g -	8420	7160	4860	5940	5940
Masa medie individuală – g -	187,1	159	108	132	132
Sfârșitul experimentului					
Nr. exemplare	37	29	37	29	37
Supraviețuire %	82	64	82	64	82
Biomasă finală – g-	6990	6490	4480	5780	4980
Masa medie individuală finală – g -	189	144,3	99,5	128,5	110,75
Indici biotehnologici la finele experimentului					
Pierderi de masă individuale înregistrate – g -	(+) 1,9	(-) 14,7	(-) 8,5	(-) 3,7	(-) 21,25
Pierderi de masă totale înregistrate -g-	(-) 1430	(-) 670	(-) 380	(-) 160	(-) 960
Rata zilnică de pierdere masa g/zi	(+) 0,06	2,1	0,61	0,18	0,76
Indici biotehnologici după începerea furajării					
Nr. zile furajare după privarea de hrană	-	7	14	21	28
Biomasă finală – g-	8040	5530	3833	4856	5220
Masa medie individuală finală – g -	211,2	145	110,88	153,8	140,3
Sporul individual de creștere – g -		0,1	0,8	1,2	1,05
Nr. de zile de furajare pentru a atinge greutatea inițială		52	45	38	31
Cantitate de furaje consumată – g-	13503	2407	2721	2519	2168

Din analiza datelor primare ale experimentului, în prima etapă, cele 250 de exemplare având o masă medie individuală de 20 g/ex. și o biomasă totală de 5000g au înregistrat un ritm bun de creștere. Hrana zilnică a fost reprezentată de un furaj granulat de 2 mm, cu un conținut proteic de 50%. Rația, distribuită în 8 mese a reprezentat 2,2% din masa totală a lotului. Peștii au avut în permanență un comportament activ și se apreciază că materialul sturionicol s-a adaptat la condițiile de biomediu ale sistemului. Pierderile în perioada de acomodare au fost de 10% din efectiv. În cea de a doua etapă, a experimentului propriu-zis, cea prin care s-a dorit să se evidențieze comportamentul puietului la privarea de hrană, factorul alimentar a acționat relativ puternic producând scăderi de masă medie corporală evaluate între 8g, la exemplarele lotului V1-7 și de 4g la exemplarele lotului V28. Exemplarele lotului V2-14 au înregistrat scăderii a masei medii de 3g iar cele din lotul V3-21 au înregistrat o creștere a valorii mesei medii cu 2g. Este cunoscut faptul că în procesul schimbărilor condițiilor de viață, modificările morfofiziologice au un caracter individual, în sensul că unele exemplare slăbesc iar altele cresc, în funcție de baza lor ereditară.

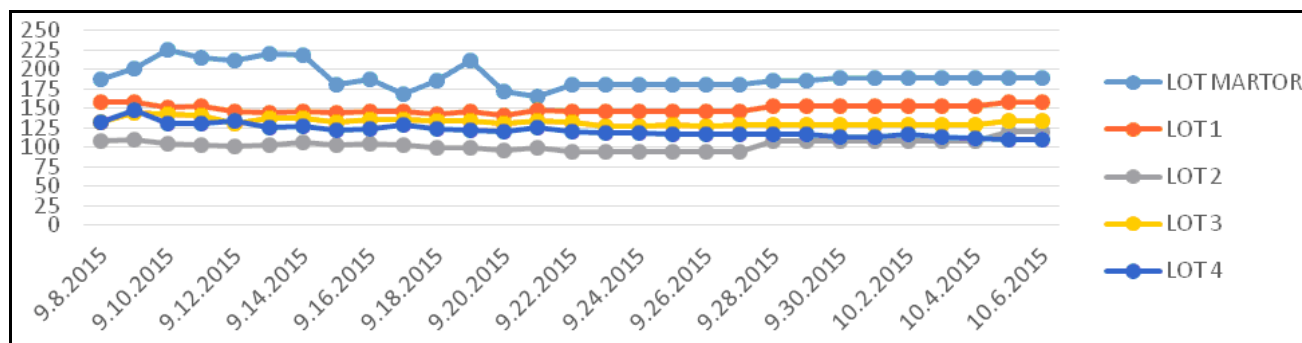


Figura 8. Evoluția masei medii a exemplarelor pe perioada experimentului.

Pierderi de material sturionicol nu au fost înregistrate în primele 7 zile de la demararea experimentului, acestea s-au instat imediat după aceea. Ulterior, după 14 zile de înfometare, comparând rezultatele se constată de asemenea o scădere a valorii medii a masei cu 2-4 g. Evaluat în procente, scăderea de masă este 2-7% față de masa inițială. În etapa a treia a experimentului, când materialul sturionicol a fost hrănit o perioadă de timp echivalentă cu cea de înfometare, se constată că acesta se reabilitează și înregistrează un ușor spor de creștere. Perioada de timp în care lotul ajunge la masa medie de la începutul înfometării este cuprinsă între 31 și 52 de zile. Scăderea de masă semnalată la exemplarele private de hrană într-o perioadă cuprinsă între 7 și 28 de zile și creșterea compensatorie ulterioară, pe o perioadă de hrănire echivalentă, se apropie de rezultatele raportate în literatură. Analiza rezultatelor confirmă că puietul se poate reabilita într-un interval de timp echivalent cu perioada de înfometare, dar procesul este greoi și conversia furajului nu are un randament optim.

Cuantificarea indicatorilor biotehnologici și ai eficienței utilizării nutrienților precum și a diferiților parametrii biochimici și fiziologici cu variabilitate specifică la stres

În țara noastră, în ultimii ani, dezvoltarea și promovarea tehnologiilor sturionicole a fost realizată simultan cu implementarea sistemelor moderne de producție (sisteme recirculante), ambele direcții reprezentând obiective strategice de dezvoltare a sectorului de acvacultură din România. În acest context, elaborarea unor tehnologii în vederea obținerii unor linii de descendenți cu parametri productivi superiori este oportună și, totodată, necesară pentru rentabilizarea activității de sturionicultură.

Densitatea de stocare este considerată principalul factor implicat în determinarea productivității și rentabilității fermelor sturionicole și nu numai. În general, suprapopularea este considerată un factor de stres cronic, comun în sistemele superintensive de acvacultura, ce poate induce o creștere prelungită a nivelului de cortizol plasmatic (Pickering & Pottinger, 1989), cu consecințe nefaste la nivelul biomasei de cultură. Stresul cronic poate induce modificări ale activității enzimactice (Falahatkar et al., 2009), a indicatorilor hematologici și biochimici (Ghomi et al., 2010) dar și a performanței de creștere a peștor (Ruchin, 2007), acestea rezultate putând fi utilizate pentru optimizarea condițiilor de creștere a biomasei de cultură (Zarejabad, 2009).

Design experimental

Experimentul s-a desfășurat în perioada 20 Octombrie 2015-18 noiembrie 2015 în cadrul sistemului recirculant pilot al Departamentului de Acvacultură, Știința Mediului și Cadastru, Universitatea Dunărea de Jos din Galați, prevăzut cu patru unități de creștere cu un volum de 500 litri fiecare și unitățile de condiționare a calității apei. Materialul biologic folosit în experiment a fost reprezentat de 300 bucăți puiet, cu masa medie inițială de $78,02 \pm 21,06$ g, provenit de la ferma aparținând partenerului P2.

Astfel, cele 300 exemplare au fost distribuite în cele 4 unități de creștere ale sistemului recirculant astfel încât să se creeze 4 densități de stocare diferite (30, 45, 90 și respectiv 135 ex/bazin), respectiv 4 variante experimentale (V1:DS_30, V2:DS_45, V3:DS_90, V4:DS_135). Peștii au fost hrăniți cu furaj TROCO PRE GROWER cu un conținut de 50% proteină și 18% lipide. Frecvența hrănirii a fost de trei ori pe zi (9:00, 13:00, 17:00), iar rația zilnică a variat între 1 și 2% din masa corporală. Principalii parametri fizico-chimici ai apei (temperatura și oxigenul dizolvat) au fost măsurați zilnic cu ajutorul echipamentului WTW Multi 3410, iar pH-ul cu ajutorul echipamentului WTW model 340. Compușii azotului au fost determinați săptămânal cu ajutorul spectrofotometrului Spectroquant Nova 400, folosind kituri compatibile Merk.

La finalul experimentului după ce peștii au fost cântăriți și măsurați s-au calculat următorii parametrii: sporul de creștere (W) = Masa finală (W_t) – Masa inițială (W_0) (g), Factorul de conversie a hranei (FCR) = Cantitatea totală de furaj (F) / Spor de creștere (W) (g/g), rata specifică de creștere (SGR) = $100 \times (\ln W_t - \ln W_0) / t$ (% BW/zi), Factorul alometric de condiție s-a calculat conform ecuației: $K = W * 100 / L^b$ unde b este un coeficient estimat cu ajutorul ecuației de regresie lungime/masă: $W = a * L^b$, coeficientul de variație (CV) = deviația standard/media masei corporale. De asemenea, la debutul experimentului cât și la finalul acestuia au fost efectuate măsurători biometrice individuale (± 1 mm) pentru toți peștii din unitățile de creștere. Analiza statistică a datelor obținute și înregistrate a fost realizată cu ajutorul programului SPSS versiunea 17. Normalitatea distribuției a fost verificată cu ajutorul testului Kolmogorov-Smirnov Z. Diferențele statistice între variabile au fost analizate prin folosirea testelor ANOVA și T-paired test. Omogenitatea varianței a fost testată cu ajutorul testului Levene. Testarea post-hoc pentru stabilirea subseturilor s-a realizat cu ajutorul testelor Duncan și Tukey's-B.

Calitatea apei. Pe parcursul experimentului parametrii de calitate ai apei au fost situați în ecartul optim pentru creșterea sturionilor. Temperatura apei ($20.75 \pm 0.70^\circ\text{C}$), oxigenul dizolvat (7.46 ± 0.30 mg/l) și pH-ul (7.54 ± 0.04 unit.pH) au înregistrat valori constante, fără diferențe semnificative între cele patru variante experimentale. De asemenea, compușii azotului au fost menținuți în ecartul optim creșterii sturionilor, valorile medii ale nitriților, amoniului și nitraților fiind de 0.14 ± 0.03 mg/l, 0.52 ± 0.33 mg/l, 33.38 ± 0.21 mg/l.

Performanța creșterii. În tabelul 11 sunt prezentate măsurătorile biometrice realizate la momentul inițial și final al experimentului. Analiza statistică a parametrilor biometrici a evidențiat diferențe nesemnificative între cele patru loturi experimentale (Anova, $p > 0.05$; $p = 0.918$). Omogenitatea loturilor a fost verificată și confirmată cu ajutorul testului Levene ($p > 0.05$, $p = 0.748$).

Tabel 9. Caracteristici somatice la debutul și la finalul experimentului.

Etapa	Densitate de stocare		N	Minim	Maxim	Media	Ab.std.
Initial	DS_30	G	30	46	116	74.47	18.649
		Ls	30	17	24	20.82	1.732
		Lf	30	19.5	27.4	23.687	1.9765
		Lt	30	22.2	31.0	27.287	2.1373
	DS_45	G	45	38	114	70.91	16.096
		Ls	45	17	24	20.63	1.610
		Lf	45	20.0	27.5	23.573	1.6993
		Lt	45	23.2	31.3	27.138	1.9784
	DS_90	G	90	36	140	83.56	22.583
		Ls	90	17	27	21.74	2.101
		Lf	90	19.0	29.6	24.921	2.2497
		Lt	90	21.4	34.5	28.668	2.7598
	DS_135	G	135	36	170	77.50	21.232

Final	DS_30	Ls	135	17	27	21.21	1.938
		Lf	134	18.6	30.2	24.235	2.0740
		Lt	135	21.9	34.8	27.826	2.4888
		G	29	46	160	114.90	31.594
	DS_45	Ls	29	20	34	24.36	2.794
		Lf	29	21.3	29.8	26.424	2.3712
		Lt	29	24.5	34.1	30.217	2.7147
		G	43	42	182	111.44	31.756
	DS_90	Ls	43	3	29	23.58	3.987
		Lf	43	21.6	31.5	26.405	2.5023
		Lt	43	24.2	35.9	30.298	2.7821
		G	86	54	250	130.28	44.757
	DS_135	Ls	86	18	31	25.31	2.837
		Lf	86	20.0	34.1	27.843	3.0389
		Lt	86	22.8	39.5	31.745	3.5732
		G	124	50	282	122.40	40.555
	DS_135	Ls	124	17	31	24.28	2.534
		Lf	124	20.6	33.6	27.048	2.6678
		Lt	124	23.5	38.2	31.062	3.1815

Unde: G-masa individuală medie; Lt-lungimea totală; Lf-lungimea la furcă; Ls-lungimea standard.

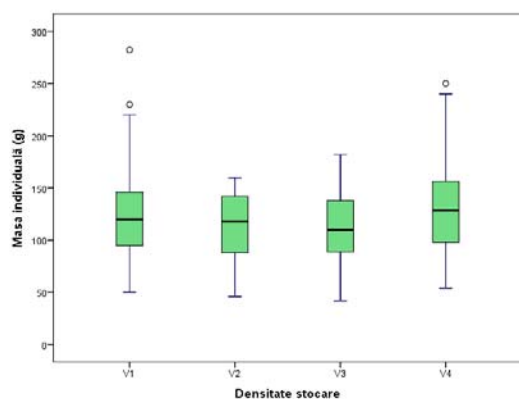


Figura 9. Masa finală a puietului.

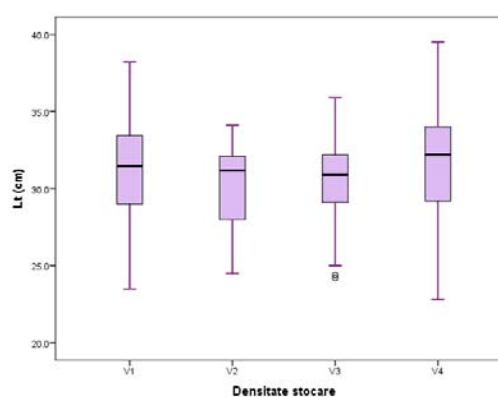


Figura 10. Lungimea finală a puietului.

După perioada experimentală, analiza statistică a masei individuale nu a evidențiat diferențe notabile. Masa corporală a peștilor în cele patru loturi experimentale a fost de 114.90 ± 31.59 g (DS_30), 111.44 ± 31.75 g (DS_45), 130.28 ± 44.75 g (DS_90), respectiv de 122.40 ± 40.55 g (DS_135), fără diferențe semnificative pentru pragul de 5% (Anova, $p > 0.05$, $p = 0.057$) (Figura 9). Se remarcă însă că între variantele DS_45 și DS_90 există cea mai mare distanță între masele corporale medii, respectiv de aproximativ 18 g/exemplar. Aceste diferențe, ce au condus la obținerea unei valori p aproape de pragul de semnificație, sunt datorate unor diferențe semnificative obținute la comparația între mediile variabilei "masa individuală" din cadrul celor două loturi. De asemenea, și în ceea ce privește lungimea finală, s-au înregistrat diferențe semnificative între cele patru loturi experimentale (ANOVA, $p < 0.05$, $p = 0.018$) (Figura 10).

La debutul experimentului, coeficientul de variație (CV) pentru variabila masă corporală a înregistrat o valoare de 25,12% în V1, 23,33% în V2, 27,27% în V3, respectiv 27,25% în V3. La finalul perioadei experimentale, se observă o accentuare a heterogenității loturilor experimentale, coeficientul de variație înregistrând o creștere în toate cele patru variante, astfel: 27,49 % în V1, 28,49% în V2, 34,35% în V3, respectiv 33,13% în varianta V4, aspect subliniat grafic și prin intermediul histogramelor (Figura 11).

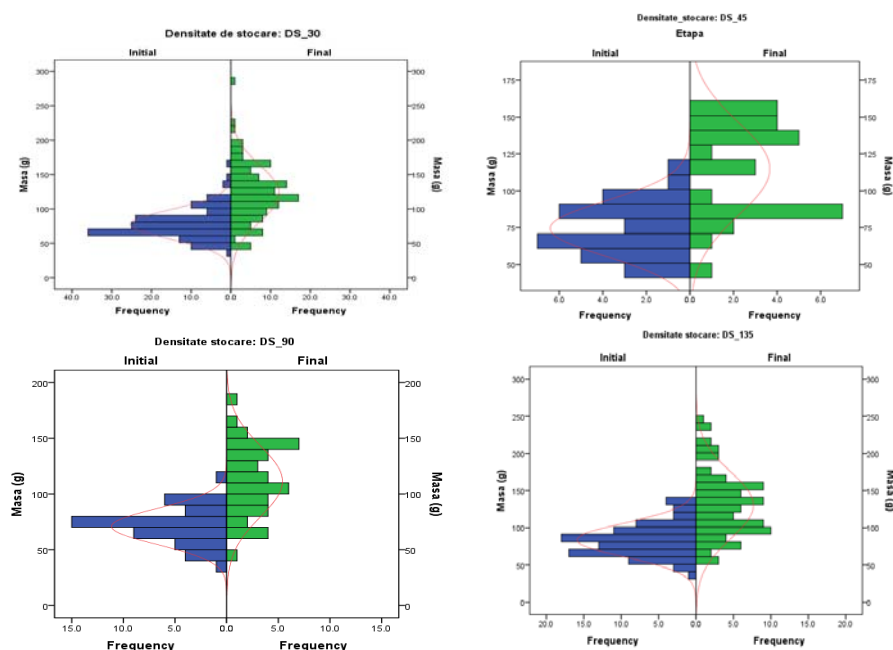


Figura 11. Histogramele claselor de masă inițiale și finale.

În tabelul 10 este redat sintetic tabloul indicatorilor de performanță tehnologică calculați pentru întreaga perioadă experimentală prin prelucrarea datelor inițiale și finale obținute. Din analiza indicatorilor tehnologici, se poate observa faptul că densitatea de populare nu a constituit un factor decisiv de influență asupra reținerii nutrienților și a conversiei hranei, acest aspect fiind reliefat de valorile apropiate ale principalilor indicatori de eficiență: FCR și PER. Rezultatele obținute evidențiază, totodată, faptul că rata specifică de creștere a înregistrat cele mai bune valori în densitățile mai ridicate, ceea ce conduce la concluzia că, densitățile ridicate practicate nu pot fi considerate, pe termen scurt, limitative pentru performanța tehnologică. Rata de mortalitate a înregistrat însă valori cuprinse între 3,33 (V1) și 6,67 % (V4), fapt ce impune reluare/continuarea experimentelor în condiții de densitate mai ridicată coroborat cu prelungirea duratei experimentale.

Tabel 10. Indicatorii de performanță tehnologică obținuți la sfârșitul experimentului.

Indicatorul Variantele experimentale	V_1	V_2	V_3	V_4
Numărul inițial de pești	30.00	45.00	90.00	135.00
Biomasa inițială (g)	2234.00	3191.00	7520.00	10462.00
Masa inițială medie (g/ex)	74.46	70.91	83.55	77.49
Numărul final de pești	29.00	43.00	86.00	126.00
Biomasa finală (g)	3332.00	4510.00	11204.00	15178.00
Masa finală medie (g/ex)	114.90	104.88	130.28	120.46
Sporul individual de creștere (g)	40.44	33.97	46.73	42.97
Sporul total de creștere (g)	1098.00	1319.00	3684.00	4716.00
Rata specific de creștere (SGR) (%/zi)	1.55	1.40	1.59	1.58
Rata zilnică de creștere - (g/kg/zi)	1.44	1.21	1.67	1.53
Factorul de conversie al hranei FCR (g/g)	0.95	1.13	0.95	1.04
Factorul de conversie al proteinei PER (g/g)	2.11	1.78	2.10	1.93
Mortalitate (%)	3.33	4.44	4.44	6.67

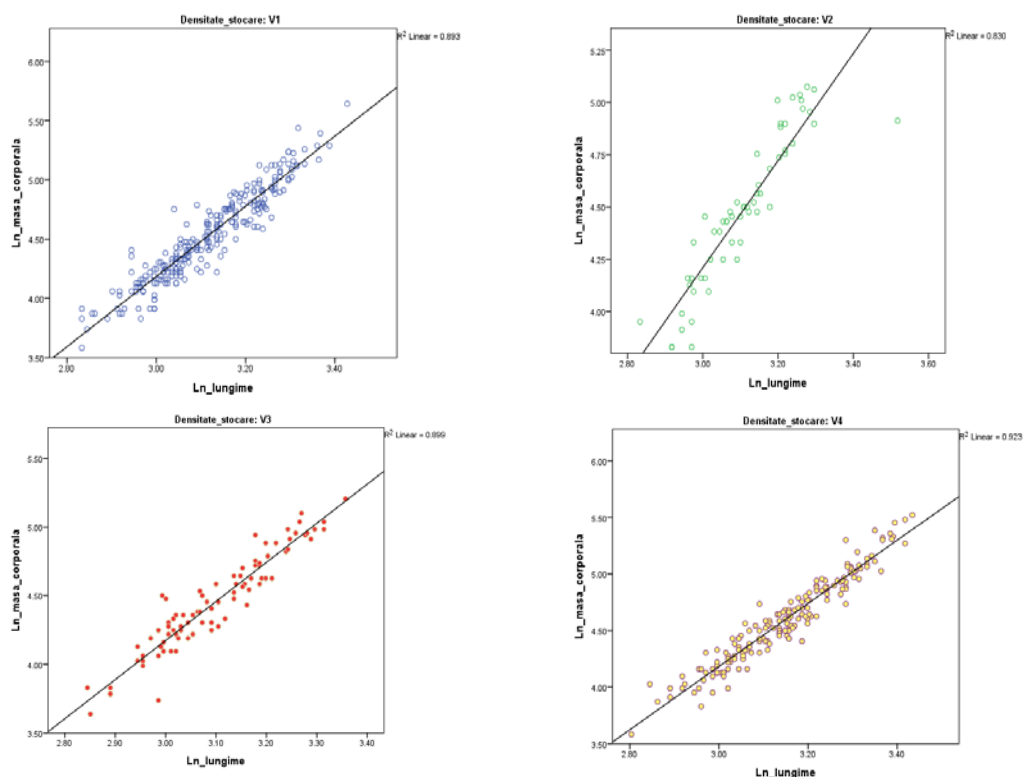


Figura 12. Regresia lungime-masă corporală.

Determinarea corelației dintre lungimea totală (cm) și masa corporală (g) (Lt-M) s-a realizat în baza datelor obținute în urma biometriei efectuate la finalul experimentului, pentru peștii din fiecare lot experimental. Astfel, datele obținute au fost procesate în scopul elaborării unui model de creștere și determinării ecuațiilor de creștere. Estimarea creșterii s-a realizat cu ajutorul regresiei liniare și a ecuației logaritmice.

În urma analizei coeficientului de determinare R^2 , s-a constatat o bună corelație între lungimea totală și masa corporală a exemplarelor, respectiv a proporției în care creșterea masei corporale poate fi pusă pe seama creșterii în lungime. Din analiza coeficientului alometric se poate observa o alometrie negativă ($b < 3$) pentru toate variantele experimentale, cohorta menținută în condiții de mică densitate înregistrând un coeficient alometric de aproximativ 3, ceea ce indică o creștere aproape izometrică pentru exemplarele din acest lot.

Bibliografie selectivă

- Adham, K.G., Hashem, H.O., Abu-Shabana, M.B., Kame, A.H., Vitamin C deficiency in the catfish (*Clarias gariepinus*), Aquacult Nut., 2000, Volume 6, p. 129– 139.
- Aebi H., Catalase. In *Methods of Enzymatic Analysis*, vol.3., Bergmeyer, H.U., Ed., Academic Press Inc., New York, NY, USA, 673–677, 1974.
- Akrami R., et al., 2013 Age and sex specific variation in hematologic and serum biochemical parametrs of Beluga (*Huso huso*, 1758). International Journal of Aquatic Biologi 1(3):132 – 137.
- AL-Kassie G. A. M.2009. Influence of two plant extracts derived from Thyme and Cinnamon on broiler performance; Pakistan Vet. J, 29(4): 169-173.
- Andreeva A., 1999. Structural and Functional Organization of the Blood Albumin System in Fish. Vopr.Ikhtirol. 39:825-832.
- Antache, A., V. Cristea, I. Grecu, L. Dediu, A. Docan, M. (Cretu) Mocanu, S. (Ion) Placintă and M.T. Coadă, 2013 The Influence of some Phytobiotics On Oxidative Stress At *Oreochromis Niloticus* Grown in an Intensive Recirculating Aquaculture System. Scientific papers Animal Science - vol. 59, pp 253-257.
- Anthony P. Farrell Encyclopedia of Fish Physiology, 2011 Elsevier, ISBN 0123745454, 9780123745453.
- Anver C.E. 2004. Blood chemistry (electrolytes, lipoprotein and enzymes) values of black scorpion fish (*Scorpaena porcus*, 1758) in the Dardanelles, Turkey. J. Biol. Sci. 4: 716–719.
- Asadi F., et al. 2006. Serum biochemical parameters of *Acipenser persicus*. Fish Physiology and Biochemistry (2006) 32: 43–47.
- Bahareh Mehrad, and Mohammad Sudagar, Dietary vitamin E requirement, fish performance and reproduction of guppy (*Poecilia reticulata*), AACL Bioflux, 2010, Volume 3, Issue 3. <http://www.bioflux.com.ro/aac1>.

Baker, M.E. (2002) Albumin, steroid hormones and the origin of vertebrates. *Journal of Endocrinology* 175: 121–127

Baker, R.T., Davies S.J., 1996 Changes in tissue α -tocopherol status and degree of lipid peroxidation with varying α -tocopheryl acetate inclusion in diets for African catfish. *Aquaculture Nutr.*, 2, pp 71–79.

Bao, M., Lou, Y., Flavonoids from seabuckthorn protect endothelial cells (EA.hy926) from oxidized low-density lipoprotein induced injuries via regulation of LOX-1 and eNOS expression, *J Cardiovasc Pharmacol.*, 2006, Volume 48(1), p. 834–841.

Barton B.A. & Iwama G.K. (1991) Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Review of Fish Diseases* 1:3–26.

Belkhir K., Borsa P., Chikhi L., Raufaste N., Bonhomme F. (2002). GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5171, Université de Montpellier II, Montpellier (France).

Beutler E., *Glutathione Peroxidase in Red Cell Metabolism*, A Manual of Biochemical Methods, Grune and Stratton, Orlando, 74 – 76, 1984.

Birstein V. J., R. Hanner, R. DeSalle (1997). Phylogeny of the Acipenseriformes: cytogenetic and molecular approaches, pp. 127–155 in *Sturgeon Biodiversity and Conservation*, edited by V. J. Birstein, J. R. Waldman and W. E. Bemis. Kluwer Academic Publishing, Dordrecht, The Netherlands.

Birstein V.J. & V. P. Vasiliev. (1987). Tetraploid-octoploid relationships and karyological evolution in the order Acipenseriformes. Karyotypes, nucleoli, and nucleolus-organiser regions in four acipenserid species. *Genetica* 72:3–12.

Blaxhall P. C., Daisley K. W., 1973 Routine hematological methods for use fish blood. *J Fish Biol* 5(6), pp 771–781.

Boyer T.D., *The glutathione S-transferases: an update*. *Hepatology* 9 (3): 486–96, 1989.

Bronzi P, Rosenthal H, Arlati G, Williot P (1999). A brief overview on the status and prospects of sturgeon farming in Western and Central Europe. *J. Appl. Ichthyol.* 15:224–227.

Charoo S. Q., et al., 2013. Sexual differentiation in blood biochemistry of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *International Journal of Advanced Fisheries and Aquatic Science*, Vol. 1(1): 32–38

Chebanov M, Billard R (2001). The culture of sturgeons in Russia: production of juveniles for stocking and meat for human consumption. *Aquat. Living Resour.* 14:375–381.

Chebanov M. S., Karnaukhov G. I., Galich E. V., Chmir Yu. N. (2002). Hatchery stock enhancement and conservation of sturgeon, with an emphasis on the Sea of Azov populations. *J. Appl. Ichthyol.* 18, 463–469.

Citarășu, T. Herbal biomedicines: a new opportunity for aquaculture industry, *Aqua. Int.*, 2010, Volume 18, p. 403–414.

Dicu Maria Desimira (Stroe), V. Cristea, Angelica Docan, Iulia Rodica Grecu, Lorena Dediu, M.T. Coadă, 2013 The influence of feeding frequency on the hematological profile of *A. stellatus* (Pallas 1771), reared in a recirculating aquaculture system, *Scientific papers Animal Science Iași*, vol. 59, pp 242–246.

Docan, A., Cristea, V., Dediu, L. (2011). Effect of feeding with different dietary protein level on hematological indices of juvenile Siberian sturgeon, *Acipenser baeri* reared under recirculating systems condition, *AACL Bioflux* 4(2), pp 180–186.

Dorman, H. J. D. and Deans, S. G. (2000). Antimicrobial activity of plant volatile oils. *J Appl. Microbiol* 88:308 – 316. Doi: 10.1046/j. 1365-2672. 2000.

Douglas K.T., *Mechanism of action of glutathione-dependent enzymes*. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 59: 103–67, 1987.

Falahatkar B, Poursaeid S, Shakoorian M, Barton B (2009) Responses to handling and confinement stressors in juvenile great sturgeon (*Huso huso*). *J Fish Biol* 75: 784–796.

Fontana F., Tagliavini J., Congiu L., Lanfredi M., Chicca M., Laurenti C., Rossi R. (1998). Karyotypic characterization of the great sturgeon, *Huso huso*, by multiple staining techniques and fluorescent in situ hybridization. *Mar.Biol.* 132:495–501.

Forlani A., Fontana F., Congiu L. (2008). Isolation of microsatellite loci from the endemic and endangered Adriatic sturgeon (*Acipenser naccarii*). *Conserv Genet* 9:461–463.

Ghergariu S., Pop A. Kadar L., 1985 Veterinary clinical laboratory guide, pp 82–90.

Ghittino P., (1983) Technology and Pathology in Aquaculture, vol. 1.

Ghomi MR, Nazari RM, Poorbagher H, Sohrabnejad M, Jamalzadeh HR, et al. (2010) Effect of photoperiod on blood parameters of young beluga sturgeon (*Huso huso* Linnaeus, 1758). *Comp Clin Path* 20: 647–651.

Goldberg D.M. Spooner R.J. *Glutathione Reductase. In Methods of Enzymatic Analysis*; Bergmeyer, H.U., Ed.; Verlag Chemie: Weinheim, Germany, 111, 258–265, 1983.

Habig W.H., Pabst M.J., Jakoby W.B., Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation, *J. Biol. Chem.*, 249, 7130–7139. 1974.

Henderson-Arzapalo A., King T.L. (2002) Novel microsatellite markers for Atlantic sturgeon (*Acipenser oxyrinchus*) population delineation and broodstock management. *Mol Ecol Notes* 2:437–439.

Jennekens I., Meyer J.N., Debus L., Pitra C., Ludwig A. (2000). Evidence of mitochondrial DNA clones of Siberian sturgeon, *Acipenser baeri*, within Russian sturgeon, *Acipenser gueldenstaedtii*, caught in the River Volga. *Ecol. Lett.* 3: 503–508.

Kavadias, S., Castritsi-Catharios, J., Dessypris, A.: Annual cycles of growth rate, feeding rate, food conversion, plasma glucose and plasma lipids in a population of European sea bass *Dicentrarchus labrax* L. farmed in floating marine cages. *J. Appl. Ichthyol.*, 2003; 19: 29–34.

Kiron, V., Puangkaew, J., Ishizka, K., Satoh, S., Watanabe, T., Antioxidant status and nonspecific immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed two levels of vitamin E along with three lipid sources, *Aquaculture*, 2004, Volume 234, p. 361–379.

Knowles, S., Hrubec TC., Smith SA., Bakal RS., 2006 Hematology and plasma chemistry reference intervals for cultured shortnose sturgeon (*Acipenser brevirostrum*). *Veterinary Clinical Pathology* (35)4:pp 434 - 440.

Lall, SP., 2002 The minerals. In fish nutrition(ed. By J.E. Halver and RW Hardy), 3rd edition: 181–257

Leaver M.J, George S.G., A piscine glutathione S-transferase which efficiently conjugates the end-products of lipid peroxidation. *Marine Environmental Research* 46 (1–5): 71–74, 1998.

- Lee K.J., Dabrowski K., Sandoval M. and M.J.S. Miller, 2005. Activity-guided fractionation of phytochemicals of maca meal, their antioxidant activities and effects on growth, feed utilization and survival in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles. *Aquaculture*, 244(1-4): 293-301.
- Lee K.W., Everts H.J., Kappert H., Frehner R., Losa R., Beynen A.C., 2003. Effects of dietary essential oil components on growth performance, digestive enzymes and lipid metabolism in female broiler chickens. *Brit. Poultry Sci.* 44, 450-457.
- Lee, M.h., H.J. Lee and P.D. Ryu, 2001. Publichealth risks: Chemical and antibiotic residues. *Rev.Asi.Aust.J. Anim.Sci.*,14:402-413.
- Leonard, J.B. McCormick, S.D., 1999. Changes in haematology during upstream migration in American shad. *J. Fish Biol.*, 1999; 54: 1218–1230.
- Ludwig A., Belfiore N.M., C. Pitra, V. Svirsky, I. Jenneckens (2001). Genome Duplication Events and Functional Reduction of Ploidy Levels in Sturgeon (Acipenser, Huso and Scaphirhynchus). *Genetics* 158: 1203–1215.
- Mangor-Jensen A., 1993. Broodstock nutrition in cod *Gadus morhua* effect of dietary fatty acids. *Fiskeridir Skr. Ser. Ernaer*, 6: 11 -19
- Mannervik B., The *enzymes of glutathione metabolism: an overview*. *Biochem. Soc. Trans.* 15 (4): 717–8, 1987
- Maqsood, S., Singh, P., Samoon, M. H., Munir, K. 2011. Emerging role of immunostimulants in combating the disease outbreak in aquaculture. *Int. Aquat. Res. Volume 3*, p. 147-163.
- May B., Krueger C. C., Kincaid H. L. (1997). Genetic variation at microsatellite loci in sturgeon: primer sequence homology in Acipenser and Scaphirhynchus. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 54, 1542– 1547.
- Mocanu Elena Eugenia. 2011.Tehnologii inovative de obținere a produselor piscicole cu siguranță maximă pentru sănătatea consumatorului, Teză de doctorat, Universitatea Dunărea de Jos, Galați.
- Morar R.,2003 [Eridiarom, Erisol, Polivitarom or Herbal Alternatives]. Editura Toderescu, Cluj-Napoca. [In Romanian]
- Ohno S., J. Muramoto, C. Stenius., L. Christian, W.A. Kitterell (1969). Microchromosomes in holocephalian, condrosteian and holosteian fishes. *Chromosoma* 226: 35 – 40.
- Oprea Lucian,Rodica Georgescu. 2000., Nutriția și alimentația peștilor, Editura Tehnică, București.
- Paoletti F.; Mocali A., Determination of superoxide dismutase activity by purely chemical system based on NADP(H) oxidation. *Methods Enzymol.*, 186, 209–221, 1990.
- Patriche T., 2008, Fish Imunity,Didactic and pedagogical, ISBN: 978-973-30-2070-7.
- Patriche T., Patriche N., Bocioc E., 2011a Determination of some normal serum parameters in juvenile Sevruga sturgeons *Acipenser stellatus* (Pallas, 1771), *Archiva Zootechnica*, 14(1), pp 49-54.
- Patriche Tanti, Patriche Neculai, Bocioc Elena, and Coadă Marian Tiberiu, 2011c Serum biochemical parameters of farmed carp (*Cyprinus carpio*), *AACL Bioflux*, Volume 4, Issue 2.
- Pickering A.D. & Pottinger T.G. (1989.) Stress responses and disease resistance in salmonid fish: effects of chronic elevation of plasma cortisol. *Fish Physiology and Biochemistry* 7: 253-258.
- Puangkaew, J., V. Kiron, T. Somamoto, N. Okamoto, S. Satoh, T. Takeuchi, and T. Watanabe, 2004 Non-specific immune response of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*, Walbaum) in relation to different status of vitamin E and highly unsaturated fatty acids. *Fish Shellfish Immun* 16:pp 25-39.
- Reshetnikov, Yu.S. (ed.) 2002. Atlas of freshwater fishes in Russia. Vol.1. Moscow, Izdatel'stvo "Nauka". 379 pp.
- Ruchin A (2007) Effect of photoperiod on growth, physiological and hematological indices of juvenile Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*). *Biol Bull* 34: 583-589.
- Rurangwa E., et al., 2004 The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in fish. *Aquaculture* 234:1-28.
- Sakamoto K, Lewbart GA, Smith TM., 2001 Blood chemistry values of juvenile Red Pacu (*Piaractus brachipomus*). 3 *Vet Clin Pathol* 30:pp 50-52.
- Seung-Cheol J., Takaoka O., Jeong G.S., Lee S.W., Ishimaru K., Seoka M., Takii K. : Dietary medicinal herbs improve growth and some non-specific immunity of red sea bream *Pagrus major*, *Fisheries Science*, 2007, 73: p. 63–69.
- Shahsavani Davar & H. R. Kazerani & Samira Kaveh & Hosna Gholipour-Kanani, 2010a Determination of some normal serum parameters in starry sturgeon (*Acipenser stellatus* Pallas, 1771) during spring season, *Comp Clin Pathol* 19:57-61.
- Shahsavani Davar, M. Mohri, H. Gholipour Kanani, 2010b Determination of normal values of some blood serum enzymes in *Acipenser stellatus* Pallas, *Fish Physiol Biochem* 36:39-43.
- Svobodova Z, Vykusova B, Modra H, Jarkovsky J, Smutna M (2006) Haematological and biochemical profile of harvest-size carp during harvest and post-harvest storage. *Aquac Res* 37: 959-965.
- Svobodova Z., 2001 Stress in fishes (a review). *Bull VURH Vodnany*,pp 169-191.
- Vijayan MM, Ballantyne JS, Leatherland JF (1990) High stocking density alters the energy metabolism of brook charr, *Salvelinus fontinalis*. *Aquaculture* 88: 371-381.
- Wedemeyer, G.A., Barton, B.A. and McLeay, D.J. (1990). Stress and acclimation. In: C.B. Schreck, P.B. Moyle (Eds.), *Methods for fish biology*. American Fisheries Society Bethesda, Maryland: 451-489.
- Yousefian M., et al. Serum Biochemical Parameter of Male, Immature and Female Persian Sturgeon (*Acipenser persicus*) 2011 *Australian Journal of Basic and Applied Research*. (5) 476.
- Zarejabad AM, Sudagar M, Pouralimotlagh S, Bastami KD (2009) Effects of rearing temperature on hematological and biochemical parameters of great sturgeon (*Huso huso* Linnaeus, 1758) juvenile. *Comp Clin Pathol*19: 367-371.
- Zhang L, Fan QX, Zhao ZG, Yu M, Xiong DM, et al. (2007) The effects of chronic crowding stress on growth and blood biochemical indexes in common carp *Cyprinus carpio*. *Journal of Dalian Fisheries University* 22: 465-469.