

“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 1. Identificarea tehnicilor moleculare de evaluare genetică și proiectarea unui model experimental de creștere și monitorizare a sturionilor în acvacultură în scopul îmbunătățirii performanțelor productive.

Activitatea 1. Evaluarea statusului actual al populațiilor de sturioni din România în mediul natural și în sistemele de acvacultură.

Activitatea 2. Descrierea metodelor experimentale pentru studiul diversității genetice folosind microsateți și markeri mitocondriali.

Activitatea 3. Selectarea markerilor moleculari de interes pentru identificarea speciilor de sturioni și hibridilor interspecifici.

Activitatea 4. Identificarea stadiului actual de cunoaștere privind implicarea mecanismelor moleculare de răspuns la stres în condițiile de creștere în acvacultură a sturionilor.

Activitatea 5. Descrierea metodologiilor de lucru pentru analiza genelor *hsp* și a proteinelor codificate de acestea.

Activitatea 6. Adaptarea facilităților tehnologice experimentale de producere și creștere a sturionilor de Dunăre de la sistemul de creștere intensiv deschis la sistemul de creștere intensiv recirculant pentru realizarea unui model experimental care să asigure monitorizarea sturionilor din acvacultură în vederea îmbunătățirii performanțelor productive.

Activitatea 7. Estimarea capacității portante a sistemelor recirculante experimentale destinat creșterii intensive a sturionilor.

Activitatea 8. Analiza bilanțului de masă a sistemelor recirculante experimentale în conformitate cu ipotezele asumate.

Activitatea 9. Elaborarea unor standarde minime de management tehnologic și operațional pentru sistemele recirculante experimentale.

Activitatea 10. Elaborarea modelului tehnologic experimental de producere, creștere și monitorizare a sturionilor de cultură și stabilirea variantelor de testare a ipotezelor asumate.

Activitate 11. Elaborarea protocolului experimental, stabilirea parametrilor de calitate a apei și a indicatorilor performanței de creștere care vor fi monitorizați la speciile de păstrugă, morun și cegă de Dunăre.

Activitatea 12. Organizare workshop pentru diseminarea rezultatelor.

Activitatea 13. Conceperea și inițierea paginii Web destinate proiectului.

Activitatea 14. Diseminarea rezultatelor la conferințe naționale și internaționale și publicare de articole științifice.

Evaluarea statusului actual al populațiilor de sturioni din România

Din aprilie 1998 toate speciile de sturioni au fost considerate ca fiind amenințate cu dispariția datorită comerțului exterior și au fost incluse în Anexa II a Convenției privind Comerțul Internațional cu Specii Amenințate de Faună și Flora Sălbatică (Washington 1973, țara depozitară a Convenției este Elveția). Această Convenție adoptă cu ocazia Conferințelor Părților (o dată la doi ani, ultimele au fost la Santiago de Chile și Bangkok) prin votul a 2/3 din țările Parte (există 166 țări Parte la CITES) Decizii și Rezoluții care sunt obligatorii pentru toate Țările Parte la Convenție care vor să facă comerț exterior cu specii din Anexa II a CITES.

Administrarea națională a speciilor de sturioni protejate de CITES se face prin:

- Autoritatea Națională de Management CITES (Direcția de Biodiversitate din MMP)
- Autoritatea Științifică CITES (din anul 2003 INCDPM Subunitatea - INCDDD Tulcea a fost desemnat de MAPM ca Autoritate Științifică pentru sturioni a României)
- Administrațiile pescăriilor din Romania (ANPA București, ARBDD Tulcea).

În România, producția actuală de pește de consum se realizează în principal în exploatații de tip extensiv și semiintensiv în care se practică, în special, creșterea în policultură a crapului și a ciprinidelor asiatice. Producțiile obținute variază între 300–1.200 kg/ha, în funcție de tehnologiile aplicate, de productivitatea biologică naturală a bazinelor piscicole și de disponibilitățile financiare ale agenților economici.

În secolul trecut, România reprezenta a treia țară din lume producătoare și exportatoare de sturioni și icre negre. La începutul secolului XX, capturile de sturioni înregistrau aproximativ 1000 t/an comparativ cu anul 1992 când s-a raportat o cantitate de circa 20 t/an, (Năvodaru, 1991).

Regresul capturilor totale de sturioni se datorează îndeosebi reducerii capturilor de morun. Barajele hidroelectrice Porțile de Fier I și II împiedică migrația sturionilor spre locurile naturale de reproducere. Încă din anii 1970, specialiștii au propus repopularea Dunării cu puiet pentru refacerea stocurilor de sturioni (Manea, 1980).

Se impune reconstruirea habitatelor naturale pentru creșterea stocurilor de sturioni din Dunăre. Protejarea și îmbogățirea fondului de sturioni din Dunăre se poate realiza printr-un program de repopulare cu puiet, obținut prin reproducere artificială, la care să participe toate țările riverane (Cristea et al., 2011).

Din cele aproximativ 27 de specii de sturioni existente, pe teritoriul României populațiile de sturioni sunt constituite de 4 specii din 6, se presupune că *Șipul și viza* sunt specii extirpate. Exploatarea intensivă în vederea aprovizionării pieței cu caviar a făcut ca populațiile de sturioni să fie în declin. Numai câteva specii mai prezintă populații numeroase și nu sunt periclitare sau în declin. Continuarea pescuitului intensiv și distrugerea habitatelor lor naturale ar putea transforma existența acestor specii în legende. (Patriche N., 2002)

Dezvoltarea producției de acvacultură a avut un efect pozitiv asupra pescuitului de sturioni din habitatele naturale. Ca urmare a repopulării bazinelor hidrografice endemice sturionilor se indică o ușoară creștere în multe țări, de exemplu, în Ungaria captura totală de la cegă a atins o valoare de vârf de aproximativ 30 t (Andras, 1995).

În România, programele de repopulare a Dunării cu sturioni autohtoni pentru protecția și conservarea speciilor aflate în diferite categorii de suprimare au fost implementate începând cu anul 2006 de către Ministerul Agriculturii și Dezvoltării Rural (MADR) și cel al Mediului și Padurilor: (MMP). Categoriile de risc ale speciilor de sturioni din bazinul hidrografic al Dunării sunt următoarele: *Acipenser nudiiventris* - pe cale de dispariție/dispariție; *Huso huso*, *Acipenser gueldenstaedti* și *Acipenser stellatus* - pe cale de dispariție, *Acipenser ruthenus* - specie vulnerabilă, (Cristea et al., 2005).

Cu o lungime de 2857 km, Dunărea este al doilea fluviu ca mărime din Europa. Fluviul este divizat în trei regiuni: Dunărea superioară (de la izvoare până la Viena) – 890 km, Dunărea mijlocie (de la Viena până la Barajul Porțile de Fier I) – 993 km și Dunărea inferioară (de la Porțile de Fier I până la vărsarea în Marea Neagră) – 942 km.

Construirea și punerea în funcțiune în anul 1974 a barajului de la Porțile de Fier I a reprezentat o grea lovitură pentru toate speciile de sturioni care se reproduceau în bazinul Dunării. Practic, din acel moment, migrația acestor pești a fost limitată până în acea zonă. Toate locurile și habitatele de reproducere situate în amonte de baraj au devenit inaccesibile, devenind pierdute, iar specii precum morunul, nisetrul sau păstruga sunt considerate extinse în amonte de Drobeta Turnu-Severin. Totodată, zona în care a fost construit barajul și lacul de acumulare al acestuia (defileul Dunării din aval de Belgrad și până la Drobeta Turnu-Severin) era un habitat important pentru depunerea icrelor pentru specii precum nisetrul sau morunul, fiind o regiune cu fund pietros, curenți rapizi și adâncimi relativ mari. De asemenea, construcția barajului a afectat puternic și specificul habitatelor de reproducere din Dunărea Inferioară. Astfel, începând cu 1974, cursul inferior al fluviului a fost regularizat prin controlarea debitelor de apă cu ajutorul hidrocentralei Porțile de Fier I. Ciclurile naturale ale inundațiilor de primăvară au fost practic stopate și controlate, la fel și sezoanele secetoase care conduceau la niveluri scăzute ale apelor în lunile august-septembrie. Toate acestea au condus la modificarea și alterarea unor întregi habitate și lanțuri trofice din care speciile de sturioni erau parte componentă. Un efect nociv asupra habitatelor din Dunărea Inferioară l-a avut și politica conducerii României din anii '70 care a decis asanarea salbei de lacuri și a zonei inundabile de pe cursul inferior al fluviului (din județul Dolj până la vărsarea în Marea Neagră) și îndiguirea acestor zone pentru "redarea lor agriculturii". Aceste măsuri au condus la declinul accentuat al multor specii de plante și animale și s-au soldat cu dispariția unor ecosisteme întregi, afectând puternic și sturionii. Nu este de neglijat nici efectul nociv al defrișărilor masive efectuate în ultima sută de ani de-a lungul albiei Dunării, dar și în tot bazinul său hidrografic. Diminuarea continuă a zonelor împădurite din toate țările riverane fluviului a avut drept consecință creșterea aluviunilor și a turbidității apei, afectând astfel situsurile de reproducere ale speciilor de sturioni.

O altă cauză care a afectat dramatic populațiile de sturioni a fost suprapescuitul industrial și braconajul. Datorită dimensiunii lor mari, dar și specificului de migrare previzibil, sturionii sunt ușor de capturat. Pescuitul sturionilor din motive comerciale, pentru carne și caviar, reprezintă o afacere foarte prosperă, având în vedere prețul foarte mare al caviarului. De exemplu, un kilogram de icre de morun se vinde pe piețele occidentale cu preturi foarte mari, fiind considerat o delicatose. Capturarea fiecărei femele adulte, apte de reproducere, în timpul migrării pentru reproducere reprezintă o lovitură puternică dată speciilor respective. Pierderea unor astfel de indivizi adulți nu poate fi susținută la nesfârșit de populație, totul sfârșindu-se în final prin împuștinarea dramatică a exemplarelor reproducătoare urmată de scăderea variabilității genetice și, posibil, chiar de extincție.

Poluarea joacă și ea un rol destul de important în reducerea numărului de sturioni. De exemplu, pentru speciile longevive, cum ar fi morunul (poate trăi până la 100 de ani și peste), a fost pusă în evidență acumularea de pesticide la nivelul organelor interne și a mușchilor. Folosirea abuzivă și necontrolată a acestor substanțe chimice în agricultură poate conduce în viitor la modificări importante în biologia acestei specii. De asemenea, în cazul nisetrilor, poluarea excesivă din zona Mării Negre a condus la dezechilibre hormonale majore și la apariția multor exemplare hermafrodite.

Un alt factor mai nou care a condus la reducerea efectivelor este practica din ce în ce mai răspândită de repopulare a bazinelor naturale cu indivizi reproduși în mediu artificial și crescuți în condiții de acvacultură. Repopularea necontrolată a redus semnificativ diversitatea genetică a speciilor, în special datorită scăderii numărului de indivizi nativi din mediul

natural. De asemenea, o altă practică cu implicații dezastruoase pentru acest grup de pești este reprezentată de repopularea cu hibridi etichetați greșit drept indivizi ai speciilor native.

Pe lângă factorii descriși mai sus se adaugă și unele aspecte particulare legate de biologia speciilor de sturioni. De exemplu, una dintre principalele surse de hrană pentru cegă, pe zona cursului inferior al Dunării, era reprezentată de larvele nevertebratului *Palingenia longicaudata*. La începutul anilor '70, în urma măsurilor de îndiguirire, a poluării și a construcției barajului de la Porțile de Fier, această specie de efemerid a dispărut afectând puternic populația de cegă din zonă.

Din cauza pescuitului intensiv și a braconajului, începând cu secolul al XIX-lea a fost observat un declin al populațiilor de acipenseride. În secolul al XX-lea, capturile de sturioni din România au scăzut dramatic; de exemplu, în 1994 au fost capturate numai 11,5 tone comparativ cu aproximativ 200 tone/an în anii 1960 (Bacalbașa-Dobrovici, 1997). Un impact foarte mare asupra acestor specii l-a avut pe lângă supraexploatarea prin pescuit, construcția barajelor hidroenergetice de pe Dunăre.

După schimbarea regimului comunist, din decembrie 1989, timp de un deceniu a urmat o perioadă de pescuit intens și necontrolat al sturionilor din Dunărea inferioară, datorită lipsei cadrului legislativ care să reglementeze situația acestor specii de pești (Năvodaru *et al.*, 1999a; Năvodaru *et al.*, 1999b; Suci, 2008). Conform datelor prezentate de Oțel, 2007, pentru perioada 1920-2005, capturile de sturioni din România au scăzut dramatic (Figurile 6-10).

Ca urmare a situației critice a efectivelor, în anul 2006, a fost emis Ordinul Nr. 262 al Ministerului Agriculturii, Pădurilor și Dezvoltării Rurale, împreună cu Ministerul Mediului și Gospodării Apelor (Nr. 330), prin care se interzice ferm pescuitul tuturor celor 5 specii de sturioni (cegă, viză, morun, nisetru și păstrugă) pe teritoriul României, pe o durată de 10 ani. Prezentul Ordin permite pescuitul sturionilor numai pentru acvacultură, în scopul reproducerii artificiale și repopulării habitatului natural cu puiet.

O analiză mai amănunțită a speciilor de sturioni din Dunăre a arătat ca *Huso huso* este considerată o specie extinsă în Dunărea superioară, critic periclitată în Dunărea mijlocie și vulnerabilă în Dunărea inferioară (Hensel & Holcick, 1997; CITES, 2000). După alți autori această specie este extinsă în regiunile superioară și de mijloc și rară în Dunărea inferioară (Suci, 2008). *Acipenser gueldenstaedtii* este considerată o specie critic periclitată în toate zonele fluviului, iar *Acipenser stellatus* este considerată o specie dispărută din Dunărea superioară și din prima parte a Dunării de mijloc. În Dunărea inferioară, populația de păstrugă a fost dramatic redusă din punct de vedere numeric, iar efectivele de nisetru se află la limita extincției ca urmare a unui efect „Allee” (Suci *et al.*, 2008). Argumentele care vin în sprijinul acestei afirmații sunt declinul capturilor (Figurile 6-10), structura discontinuă a categoriilor de vârstă, lipsa recrutării naturale sau recrutare naturală scăzută.

Teoria elaborată de Warder Clyde Allee susține că în cazul populațiilor foarte mari, reproducerea și rata de supraviețuire scade cu densitatea populației. Această situație este opusă celei întâlnite în populațiile reduse numeric, unde o densitate redusă încetinește rata de creștere datorită competiției intraspecifice. În cazul sturionilor, densitatea scăzută a populației este corelată cu creșterea negativă și în aceste condiții populația este condamnată la dispariție. Un alt exemplu de efect „Allee” este cel care a condus la dispariția *Acipenser sturio* din fluviile din vestul Europei, proces care s-a petrecut pe durata a numai 10 ani.

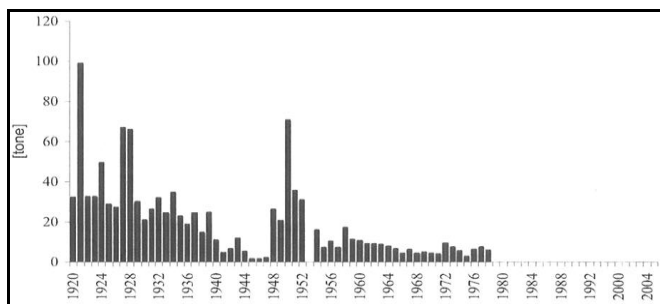


Figura 6. Statistica capturilor de cegă din România în perioada 1920-2005 (Oțel, 2007).

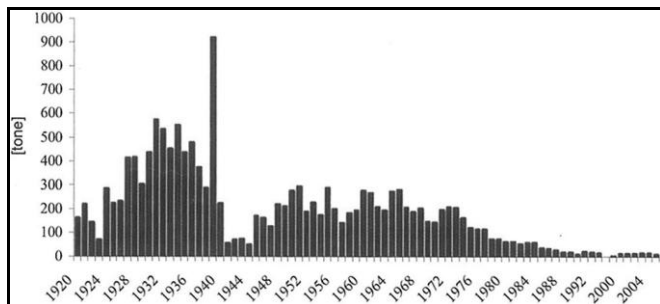


Figura 7. Statistica capturilor de morun din România în perioada 1920-2005 (Oțel, 2007).

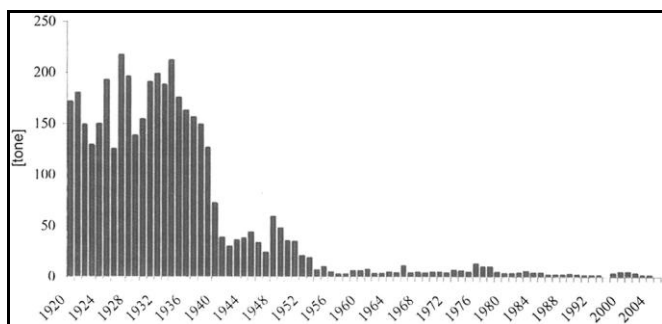


Figura 8. Statistica capturilor de nisetru din România în perioada 1920-2005 (Oțel, 2007).

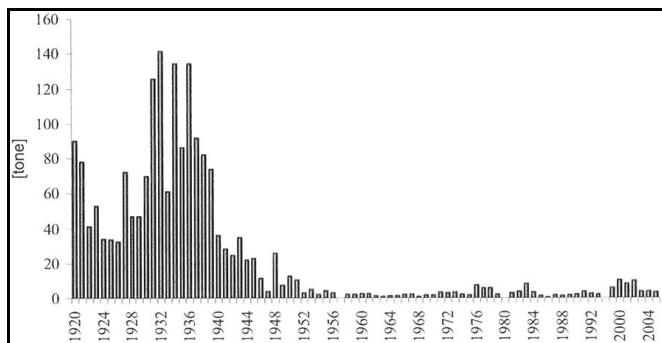


Figura 9. Statistica capturilor de păstrugă din România în perioada 1920-2005 (Oțel, 2007).

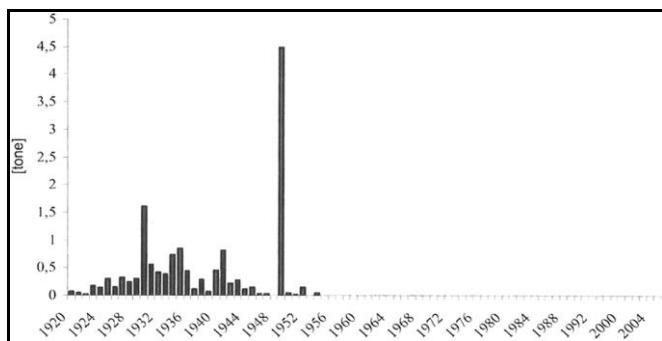


Figura 10. Statistica capturilor de viză din România în perioada 1920-2005 (Oțel, 2007).

Construirea și punerea în funcțiune în 1972 a barajului hidroenergetic Porțile de Fier I a avut un impact devastator asupra tuturor speciilor de sturioni care se reproduc în Dunăre. Acest baraj este localizat la 862 km în amonte de gurile de vărsare ale fluviului în Marea Neagră și împiedică migrația sturionilor către situsurile de reproducere situate în amonte de baraj. Cu câteva sute de ani înainte sturionii de pe Dunăre ajungeau până la Bratislava, Budapesta și Viena, dar astăzi acești pești și-au limitat arealul doar la apele mării și cursului inferior al fluviului (Kiss, 1997).

Câmpiile inundate ale Dunării s-au schimbat semnificativ când barajele și digurile au fost construite. În trecut, zona inundabilă a Dunării reprezenta 573.000 ha și delta fluviului 524.000 ha. La ora actuală aproximativ 85% din zonele inundabile au fost îndiguite. Delta Dunării a fost de asemenea îndiguită, dar într-o proporție mai mică și acest lucru a fost stopat după căderea regimului comunist în 1989 din motive ecologice. Aproximativ 300 de lacuri de acumulare au rezultat în urma îndiguirilor. Aceste lacuri rețin anumite depozite aluviale, în special particule de dimensiuni mari și afectează nivelul apei din Dunăre. Astfel, barajele și digurile construite au determinat modificarea și alterarea unor întregi habitate și lanțuri trofice din care speciile de sturioni erau parte componentă.

Un impact negativ l-au avut și irigațiile din agricultură și excavațiile de materiale din albia fluviului. În România, irigarea celor trei milioane de hectare de teren arabil a condus la scăderea fluxului de apă. Pompele de irigațiiucid larvele și juvenilii. De asemenea, a crescut poluarea cu pesticide și fertilizante folosite în agricultură. Excavațiile de nisip și pietriș din albia fluviului au distrus locurile de reproducere din fluviu din apropiere de Călărași.

Poluarea apei reprezintă un factor cu un impact deosebit asupra tuturor speciilor din întreg ecosistemul Dunării. Poluarea cu metale grele și pesticide este relativ ridicată la nivelul Dunării inferioare (Oksiyuk *et al.*, 1992) și afectează biotopul în totalitate. Nivelul poluării cauzează probleme importante și în Marea Neagră, unde populațiile de sturioni își

desfășoară ciclul trofic. Studiile realizate în această regiune (Zaitsev, 1992, 1993) au arătat că poluarea în această regiune este de câteva zeci până la sute de ori mai mare comparativ cu Oceanele Atlantic și Pacific sau Marea Mediterană. Concentrații mari de toxine din țigări și diferite deșeuri industriale, modifică echilibrul hormonal al peștilor, perturbă metabolismul și provoacă creșterea numărului de pești hermafrodiți.

Eutrofizarea apelor de coastă a avut un impact puternic asupra Mării Negre. În perioada 1950-1980 cantitatea de nutrienți și substanțe organice adusă de principalii afluenți – Dunărea, Nistru și Nipru – a crescut cu 400-500% (Zhuravleva & Grubina, 1993), determinând o creștere accentuată a fitoplanctonului. Biomasa meduzei de apă rece *Aurelia aurita* a crescut enorm de la 1 milion de tone metrice în 1960 la 500 milioane de tone metrice în 1980. Simultan, a avut loc o scădere a crustaceelor planctonice și a peștilor planctofagi, inclusiv a sturionilor (Zaitsev, 1992).

Pentru salvarea speciilor de sturioni din bazinul Dunării au fost adoptate diferite măsuri care vizează monitorizarea populațiilor naturale, demararea unor programe eficiente de repopulare și exploatare durabilă pe termen lung a stocurilor existente. România se numără printre cei 167 de semnetari ai convenției și împreună cu țări din regiunea Mării Negre, sub patronajul CITES, a pus bazele în 2001 a BSSMAG (Black Sea Sturgeon Management Action Group). În 2003, specialiști din România, Bulgaria, Serbia și Ucraina au pus la punct o strategie regională pentru protecția acestor specii, urmărind anumite aspecte cum ar fi: menținerea diversității genetice în cadrul populațiilor, refacerea populațiilor sănătoase, apte de reproducere, reconstruirea habitatelor de reproducere și dezvoltarea fermelor piscicole care să crească sturionii pentru consum și icre, saturând piața și eliminând astfel braconajul și pescuitul din mediul natural al acestora. În dezvoltarea unor programe eficiente de management al acestor resurse naturale deosebit de valoroase s-au implicat și diferite organizații non-guvernamentale. Astfel, „International Association for Danube Research” a adoptat în 2006 un plan de acțiune pentru conservarea speciilor de acipenseride din bazinul Dunării („Action Plan for the Conservation of the Sturgeons (*Acipenseridae*) in the Danube River Basin”).

Selectarea markerilor moleculari de interes pentru identificarea speciilor de sturioni și hibrizilor interspecifici. Descrierea metodelor experimentale pentru studiul diversității genetice la sturioni.

Dezvoltarea markerilor ADN a avut un impact puternic asupra geneticii animalelor. Tehnologiile bazate pe markeri ADN au revoluționat modul în care sunt conduse cercetările asupra peștilor, și implicit asupra sturionilor. Cu ajutorul markerilor moleculari este posibil să observăm și să exploatăm corespunzător variația genetică la nivelul întregului genom. În cazul geneticii peștilor, în general, au fost și sunt utilizați cu succes mai multe tipuri de markeri moleculari, precum ADN mitocondrial, RFLP, RAPD, AFLP, microsateliți sau EST. Markerii moleculari au permis progrese rapide în studiile de acvacultură asupra variabilității genetice și încrucișărilor selective, identificării speciilor, populațiilor și subpopulațiilor.

Tipuri de markeri ADN

Toate organismele sunt supuse mutațiilor ca rezultat al proceselor celulare normale sau a interacțiilor cu mediul, fapt ce conduce la variația genetică. Împreună cu selecția și driftul genetic, mutațiile determină variația genetică intra- și inter-indivizi, specii sau ordine taxonomice superioare. Pentru ca această variație să fie utilă geneticienilor, trebuie să manifeste proprietățile de a fi moștenită și identificabilă, fie ca o variație fenotipică ușor de recunoscut, fie ca o mutație ce poate fi identificată prin tehnici moleculare. La nivelul ADN, tipurile de variație genetică se referă la substituția unei baze, numită și SNP (Single Nucleotide Polymorphism), inserții sau deleții de secvențe nucleotidice la nivelul unui locus și rearanjamentul segmentelor de ADN la locusul respectiv. Prin acumularea lor în cursul evoluției, mutații de diverse tipuri există în diferite specii și numărul și gradul acestor mutații definește variația genetică în cadrul speciei. Tehnologia bazată pe markeri ADN se aplică cu scopul de a evidenția aceste mutații.

Markerii moleculari pot fi clasificați în markeri de tip I, asociați cu gene cu funcție cunoscută și markeri de tip II asociați cu segmente genomice necunoscute (O'Brien, 1991). Markerii de tipul I nu au fost inițial apreciați în studiile de genetică la pești, dar în timp a devenit foarte clar că acești markeri sunt foarte importanți atât în ceea ce privește studiile la populațiile sălbatice, cât și la cele de acvacultură. În plus, față de rolul lor în studiile populaționale, markerii de tip I au devenit foarte importanți pentru studierea linkage-ului și pentru cartarea QTL (Quantitative Trait Loci). Astfel, acest tip de markeri poate fi utilizat în studii de genomică comparativă, evoluția genomului sau identificarea de gene candidate pentru dezvoltarea unor programe de acvacultură la diferite specii.

Comparații interspecifice se pot face și cu ajutorul markerilor de tip II, dar acestea sunt limitate la taxoni foarte apropiați, o cerință foarte importantă în cazul acestor comparații constând în conservarea secvențelor. Tipul II de markeri s-a dovedit util în identificarea speciilor, populațiilor și subpopulațiilor, dar și a hibrizilor obținuți între diferite specii de sturioni, iar, mai recent, acest markeri pot fi corelați cu studiul QTL.

ADN mitocondrial (ADNmt)

Studiile de la vertebrate au arătat că divergența de secvență se acumulează mai rapid în ADN mitocondrial decât în cel nuclear (Brown, 1985). Acest fenomen a fost atribuit unei rate a mutațiilor mai rapidă în ADN mitocondrial care poate fi rezultatul lipsei mecanismelor de reparare în timpul replicării. Totodată constituie un avantaj, faptul că genomul mitocondrial haploid se moștenește exclusiv pe linie maternă, este mai mic și astfel poate fi mai ușor de manipulat, este uniform ca mărime (15–18 kb la pești). Datorită moștenirii pe cale maternă, secvența ADN mitocondrial este înalt conservată și astfel este posibilă identificarea relațiilor de paternitate în cadrul unei populații de interes (Ferris & Berg,

1982). Molecula de ADN mitocondrial este transcrisă aproape în întregime, cu excepția unei regiuni de control de aproximativ 1 kb (D-loop), la nivelul căreia se inițiază replicarea și transcrierea moleculei. În general, segmente necodante de tipul D-loop manifestă un nivel crescut de variație comparativ cu secvențele codificatoare, de exemplu, gena pentru citocromul b, posibil datorită reducerii constrângerilor funcționale și unei presiuni de selecție mai mici. Analiza ADNmt a fost utilizată intensiv pentru a investiga structura populațiilor și relațiile filogenetice dintre speciile de sturioni.

ADN mitocondrial conține informație genetică care permite cercetătorilor să deducă relațiile între speciile înrudite și istoria unei specii. Majoritatea studiilor de polimorfism a ADNmt la sturioni au arătat nivele mici de divergență moleculară între speciile analizate comparativ. Totodată este posibilă folosirea ADNmt ca marker pentru identificarea speciilor de sturioni, de aici rezultând și importanța practică în identificarea provenienței diferitelor loturi de caviar. Metoda utilizată în acest sens se bazează pe diferențele nucleotidice existente la nivelul secvenței nucleotidice și care constituie o caracteristică de specie (Birstein *et al.*, 1998). În aceste studii, apariția unui produs amplificat prin PCR cu un set de primeri specifici speciei se consideră concludentă pentru diagnosticul molecular al speciei respective. Neajunsul metodei constă în faptul că uneori pot fi necesare până la 25 de reacții PCR diferite pentru o identificare exactă a speciei de proveniență a unei probe. Cu toate acestea, metoda prezintă avantajul de a fi ieftină și destul de simplă în identificarea celor mai importante trei specii de sturioni producătoare de caviar (*H. huso*, *A. gueldenstaedtii* și *A. stellatus*). Deși această tehnică se bazează pe diferențele nucleotidice interspecifice, pot apărea rezultate fals pozitive, deoarece, în principiu ultimul nucleotid al unui primer este responsabil cu identificarea speciei. Pentru a exclude rezultatele fals pozitive este necesară includerea unor probe standard în fiecare analiză. Astfel, substituțiile nucleotidice folosite pentru diferențierea speciilor *A. gueldenstaedtii* și *A. persicus* (Birstein *et al.*, 1998) nu au fost susținute de studii ulterioare (Ludwig *et al.*, 2002). Cu toate acestea, metoda de identificare a speciilor de sturioni folosind ADNmt poate fi utilă și de încredere dacă reacția PCR se desfășoară corect.

Microsateliții

Microsateliții (VNTR - Variable Number of Tandem Repeats) sunt secvențe repetitive scurte, de 2-9 pb, dispersate în întregul genom și cu un înalt grad de polimorfism. Microsateliții reprezintă markeri moleculari de tip II (necodanți și cu o capacitate de selecție) cu o lungime totală variind între 20 și câteva sute de perechi de baze (O'Brien, 1991).

Acești markeri sunt numeroși la toate speciile de vertebrate, iar la pești apar la fiecare aproximativ 10 kpb (Wright, 1993). Microsateliții sunt distribuiți omogen în genom pe toți cromozomii și pe toate regiunile cromozomale. Astfel, markerii de acest tip au fost identificați în interiorul unor regiuni codante (Liu *et al.*, 2001), în introni sau în regiuni necodificatoare. La eucariote motivele di- și tetranucleotidice sunt organizate în clustere în regiunile necodante.

Majoritatea locilor microsatelitari sunt relativ mici și acest aspect este foarte important pentru amplificarea cu ușurință prin reacția PCR. Majoritatea microsateliților (30–67%) sunt repetiții dinucleotidice. Trăsătura caracteristică a microsateliților este gradul de hipervariabilitate în cadrul speciilor și populațiilor. Se consideră că, în general, microsateliții care prezintă un număr mare de repetiții au și un grad ridicat de polimorfism, deși această regulă nu se respectă întotdeauna. Polimorfismul acestor markeri este bazat pe diferența de mărime datorată numărului variabil de repetiții la un anumit locus. Acești markeri prezintă o evoluție extrem de rapidă, cu o rată a mutațiilor 10^{-2} – 10^{-6} mutații/generație (Goldstein *et al.*, 1995; Ellegren, 2000), rată ce este cu câteva ordine de mărime mai mare decât cea pentru markeri nerepetitivi (10^{-9}) (Li, 1997). Se presupune că aceste mutații sunt datorate “alunecării” polimerazei de pe catena matriță în timpul replicării ADN, fapt care determină apariția unor diferențe în ceea ce privește numărul de repetiții (Tautz, 1989). Analiza microsateliților de tipul (AC)_n la 5 clase de vertebrate (mamifere, păsări, reptile, amfibieni și pești) au arătat că lungimea este factorul major care influențează rata mutațiilor. Totuși, la anumite specii de pești au fost observate alele cu mari diferențe în ceea ce privește numărul de repetiții care corespund unui model. Indiferent de mecanismul specific, modificările care afectează numărul de unități repetitive conduc la apariția într-o populație a unui număr mai mare de alele pentru fiecare locus microsatelitar.

Prin anumite caracteristici pe care le posedă cum ar mărimea relativ redusă, ușurința cu care pot fi amplificați prin PCR, modul de moștenire codominant și gradul înalt de polimorfism, microsateliții se dovedesc markeri utili și pot fi utilizați într-un număr mare de studii în domenii variate ale biologiei moleculare, incluzând epidemiologia moleculară, genetica populațiilor și cartarea genetică. În studiile de acvacultură și genetica peștilor, microsateliții sunt utilizați pentru caracterizarea genetică a stocurilor, selecția indivizilor în vederea reproducerii, construirea harților de linkage, cartarea și identificarea genelor pentru QTL și aplicații în programele de reproducere asistată.

Prin analiza microsateliților se realizează profilul genetic individual (amprenta genetică), se pot stabili interrelațiile dintre diferiți indivizi și se evaluează frecvența alelică a acestora în cadrul populațiilor. Luând în considerare metodele moleculare disponibile la ora actuală este posibilă evaluarea polimorfismelor de lungime la un număr mare de indivizi pentru analize genetice intra- și interpopulaționale. Unii microsateliți posedă un număr foarte ridicat de alele pentru un locus și sunt foarte potriviți pentru identificare genitorilor, respectiv descendenților acestora în populațiile mixte, în timp ce alții au un număr mai mic de alele și sunt recomandați în studiile de genetică a populațiilor și filogenie (Estoup & Angers, 1998). Primerii dezvoltati pentru amplificarea locilor microsatelitari la o specie pot conduce de cele mai multe ori la amplificarea locilor similari de la specii strâns înrudite (Estoup & Angers, 1998), acesta reprezentând un avantaj în special în analiza populațiilor reduse numeric sau aflate în pragul extincției.

În ciuda numeroaselor avantaje pe care le oferă în studii moleculare diverse, microsateliții prezintă însă și unele neajunsuri. Una dintre problemele cele mai importante legate de acești markeri este prezența “alelelor nule” (O'Reilly & Wright, 1995; Dakin & Avise, 2004). O alelă nulă este o alelă care deși este prezentă la un individ/populație nu poate fi

detectată. Acest tip de alele apar când se produc mutații în zona de hibridizare a primerilor (localizată înaintea repetițiilor or în tandem) și nu la nivelul microsateleților propriu-zis. Prezența alelelor nule la un locus poate determina apariția unor rezultate eronate, mai ales dacă este vorba de analiza unui individ din punct de vedere al paternității și, astfel, majoritatea cercetătorilor preferă să renunțe la analiza unor astfel de loci (Hansen, 2003).

La sturioni studiile bazate pe analiza markerilor microsateleitari au fost inițiate la speciile nord-americane și în prezent, fiecare dintre aceste specii au fost studiate din punct de vedere al diversității genetice, în ciuda dificultăților de colectare a probelor biologice reflectate în numărul redus de indivizi analizați. O altă aplicație a microsateleților la sturioni a urmărit utilizarea acestor markeri pentru identificarea provenienței caviarului. Jenneckens *et al.* (2001) a demonstrat că locusul LS39 prezintă o alelă unică în cazul speciei *A. stellatus* care nu a fost identificată și la celelalte specii de sturioni.

Implicarea mecanismelor moleculare de răspuns la stres în condițiile de creștere în acvacultură a sturionilor

Organismele răspund la o varietate de factori de stres prin sinteza rapidă a unui set de proteine de șoc termic (Heat Shock Proteins – hsp). Funcțiile precise ale proteinelor hsp sunt încă necunoscute, dar există o serie de dovezi că aceste proteine sunt esențiale pentru supraviețuirea în condițiile variațiilor de temperatură, jucând un rol esențial în dezvoltarea termotoleranței. Proteinele de șoc termic sunt ubiquitare, fiind întâlnite la o serie largă de organisme, de la bacterii și drojdii, la mamifere. Proteinele Hsp sunt sintetizate în organism ca răspuns la o varietate de factori de stres (Deng *et al.*, 2009). Există mai multe tipuri de proteine hsp, clasificate pe baza greutatei lor moleculare în proteine de tip Hsp90, Hsp70, Hsp60 și proteine Hsp cu greutate moleculară mai mică. Aceste familii de proteine sunt constituite din mai multe izoforme exprimate constitutiv sau induse. Printre funcțiile exercitate de aceste proteine la nivel celular se numără: repararea, împachetarea corectă și translocarea proteinelor intracelulare, supresia agregării proteinelor și reactivarea proteinelor denaturate (Feige *et al.*, 1996). De asemenea, joacă un rol esențial în activarea receptorilor hormonilor nucleari și a diferitelor componente ale sistemului imunitar și interacționează cu molecule de semnalizare din ciclul celular și diverse căi prin care se declanșează moartea celulară.

Dintre proteinele de șoc termic, Hsp70 este cel mai mult conservată, fiind distribuită în special în citoplasmă, dar fiind întâlnită și la nivelul altor componente celulare. Proteinele Hsp60 prezintă funcții similare cu Hsp70, fiind implicate în translocarea și asamblarea proteinelor și prevenirea formării de agregate proteice (Hartl & Hayer-Hartl, 2002). Forma indusă a Hsp60 este localizată, în principal, în matricea mitocondrială. La pești, nivelul de expresie a proteinelor de tip Hsp a fost corelat cu expunerea la diferiți factori de stres întâlniți în mod obișnuit în cadrul unui sistem ecologic, iar rezultatele obținute au sugerat că răspunsul la stres la nivel celular poate juca un rol important în creșterea ratei de supraviețuire a indivizilor (Iwama *et al.*, 1998). Astfel, proteinele Hsp au fost propuse ca biomarkeri ai stresului celular sau ca indicatori nespecifici ai expunerii la diferiți factori cu efect toxic asupra organismului.

În condiții de acvacultură, peștii sunt supuși diferitor factori de stres care pot afecta creșterea și starea de sănătate a acestora (Iwama *et al.*, 1997). Majoritatea cercetărilor asupra efectului diferiților factori de stres au fost efectuate pe specii de pești telosteeni, existând mult mai puține date cu privire la răspunsul sturionilor la stres. Informații despre modul în care sturionii răspund la factori de stres similari celor întâlniți în condiții de acvacultură sunt esențiale pentru a înțelege cum anumite practici din crescătorii le afectează performanțele de creștere și starea de sănătate, atât în condiții de acvacultură cât și după eliberarea acestora în fluviu în cadrul unor programe de repopulare.

Cunoașterea mecanismelor ce stau la baza adaptării fiziologice a sturionilor la condițiile de mediu este foarte importantă, în special în stadiile timpurii de dezvoltare. Pentru ca dezvoltarea și creșterea sturionilor în acvacultură să se desfășoare cu rezultate optime se impune respectarea unor condiții referitoare la calitatea apei, substratului, bazinului, hranei, etc. Toți factorii enumerați anterior trebuie să se găsească între anumite limite preferate de anumite specii de sturioni. Din acest motiv cunoașterea unor metode de evaluare a efectelor pe care anumiți factori de stres le produc în special asupra stării de sănătate și a performanțelor de creștere în captivitate este indispensabilă pentru dezvoltarea sturioniculturii.

Răspunsurile peștilor la stresul din mediu de viață au fost grupate într-un sens larg în primare și secundare. În cazul răspunsurilor primare, axa hipotalamică-pituitară-suprarenală este stimulată conducând la un răspuns hormonal manifestat prin secreția de hormoni corticosteroizi în circulație (Iwama *et al.*, 2006). Sinteza de cortizol și eliberarea acestuia de la nivelul corticosuprarenalelor durează câteva minute, în timp ce eliberarea de catecolamine se produce foarte rapid, într-un interval de ordinul secundelor (Barton, 2002). Astfel, concentrația plasmatică sau serică a cortizolului reprezintă un indicator al stresului suferit de indivizi în diferite condiții de mediu (Lankford *et al.*, 2005; Webb *et al.*, 2007). Eliberarea imediată a catecolaminelor conduce la transformarea rezervelor de glicogen în glucoză în cadrul glicogenolizei și determină o creștere a concentrației de glucoză circulantă. Astfel, modificările serice sau plasmatică ale glucozei reprezintă de asemenea un indicator util în evaluarea stresului la pești (Wedemeyer *et al.*, 1990). Răspunsurile secundare includ modificări ale concentrațiilor ionilor în plasmă și în țesuturi, dar și a nivelului anumitor metaboliți, proteinelor stres de tip Hsp, modificări hematologice, etc. Corelate, aceste răspunsuri secundare conduc la modificări ale metabolismului, respirației, echilibrului acido-bazic și mineral, funcției imune și răspunsurilor la nivel celular. În plus, se produc răspunsuri terțiare la stres care se referă la perturbări ale creșterii, rezistenței la boli sau comportamentului (Wedemeyer *et al.*, 1990).

La sturioni există puține studii care urmăresc răspunsul la stres prin monitorizarea nivelului seric al cortizolului sau au unor metaboliți. Falahatkar *et al.* (2009) au evaluat răspunsul fiziologic al speciei *H. huso* la plasarea în bazine speciale

la densități diferite. Un studiu similar, a fost efectuat pentru a monitoriza stresul rezultat în urma transportului timp de 7,5 ore între două ferme piscicole a unor indivizi aparținând speciei nord-americane, *Scaphirhynchus albus* și pentru hibridului acesteia cu *S. platyrhynchus* (*S. albus* X *platyrhynchus*) (Barton et al., 2000). Ca și indicatori de stres, au fost monitorizate variațiile concentrației cortizolului, glucozei, lactatului și ionului de Cl⁻, fiind înregistrate creșteri semnificative ale acestora.

În ceea ce privește temperatura apei, sturionii sunt specii mai puțin sensibile comparativ cu alte specii de acvacultură, suportând un spectru larg al temperaturii apei, însă pentru a obține performanțe de creștere trebuie respectate anumite limite care depind de specie și de stadiul dezvoltării acesteia. Limitele de temperatură compatibile cu supraviețuirea speciilor de sturioni sunt situate între 0°C și 32°C, însă se hrănesc în general între limitele de 6°C și 26°C. Optimum de creștere este diferit pentru fiecare specie și variază în general între 16 și 24°C. La ora actuală, deși numărul de studii vizând acest subiect este în creștere, există un număr limitat de informații în ceea ce privește răspunsul acestor specii la creșterea temperaturii, în special în timpul primelor stadii de viață, când expunerea și vulnerabilitatea la influențele mediului este crescută (Parsley et al. 2002).

Majoritatea studiilor au fost realizate la speciile de sturioni nord-americane, printre care *Acipenser medirostris*. Astfel, Van Eenennaam et al., 2005 au studiat impactul variațiilor de temperatură a mediului asupra dezvoltării embrionare a acestei specii și au apreciat că limita superioară a temperaturii optime este de 17-18°C. Embriogeneza și dezvoltarea normală nu sunt afectate dacă au loc în ape cu o temperatură mai mică decât cea optimă. Temperaturile cuprinse în intervalul 17.5-22°C au împiedicat dezvoltarea normală a embrionilor, iar în cazul unor temperaturi mai mari de 23°C supraviețuirea embrionilor a încetat în stadiul de gastrulă. De asemenea, în cazul aceleiași specii a fost studiat impactul temperaturilor constante de 18, 20, 22, 24 și 28°C asupra supraviețuirii larvelor (Linares-Casenave et al., 2005). Temperatura a avut o influență semnificativă asupra larvelor, în sensul că expunerea la temperaturi cuprinse între 22-28°C a crescut riscul apariției unor defecte, cum ar fi lordoza notocordului, iar temperaturile mai mari de 26°C sunt letale.

Stresul termic a fost monitorizat pe baza expresiei proteinelor Hsp în cazul larvelor de sturioni expuse la temperaturi variind între 18 și 28°C. Expresia Hsp a crescut semnificativ la temperaturi mai mari de 22°C. În general, în cazul larvelor care au prezentat un nivel de expresie ridicat pentru Hsp a crescut mortalitatea și riscul apariției unor defecte în cursul dezvoltării.

Descrierea metodologiilor pentru analiza genelor *hsp* și a proteinelor codificate de acestea

Tehnica Real-Time PCR

Prin tehnica PCR are loc copierea și amplificarea unor secvențe specifice de ADN sau ADNc obținându-se sute sau chiar mii de copii. În cazul unei reacții PCR clasice, detecția și cuantificarea produșilor amplificați se realizează la finalul reacției PCR, prin metode clasice de identificare a produșilor amplificați cum este electroforeza în sistem submers.

Într-o reacție Real-Time PCR cantitatea de produs PCR format este stabilită în timpul fiecărui ciclu, prin utilizarea unor molecule fluorocrom numite molecule raportor. Aceste molecule raportor pot fi, în general, de două tipuri: fluorocromi raportor care se intercalează la nivelul ADN dublu catenar (ex.: SYBR Green) și fluorocromi care sunt atașați de sonde specifice (sonde TaqMan[®], Molecular Beacons, etc.).

Moleculele de tip SYBR Green prezintă o fluorescență scăzută când se găsesc liberi în soluție dar emit un semnal puternic fluorescent după legarea la ADN dublu-catenar. Astfel, creșterea semnalului fluorescent este direct proporțională cu numărul de molecule de ADN formate în timpul fiecărui ciclu al reacției. Sondele TaqMan[®] sunt sonde oligonucleotidice de 18-22pb, complementare cu secvența ADN țintă, care au atașat la capătul 5' o moleculă raportor iar la capătul 3' un „quencher”. Fluorescența moleculei raportor este foarte slabă deoarece se află în proximitatea moleculei „quencher” care îi anulează fluorescența. În timpul reacției PCR sonda se atașează specific la molecula de ADN, între primerul sens și cel antisens. În timpul amplificării, ADN polimeraza (care prezintă activitate 5' exonucleazică) scindează sonda TaqMan[®] și eliberează molecula raportor și molecula „quencher”. Astfel, are loc separarea moleculei raportor de molecula „quencher”, ceea ce determină creșterea fluorescenței raportorului, proporțional cu cantitatea de produs PCR.

Modificarea fluorescenței în timpul reacției PCR (atât în cazul utilizării moleculelor de SYBR Green cât și a sondelor TaqMan[®]) este evaluată de un detector care măsoară intensitatea fluorescenței. Prin reprezentarea intensității fluorescenței în funcție de numărul cicluri PCR, se obține un grafic de amplificare care reprezintă acumularea ampliconilor în timpul fiecărui ciclu al reacției PCR. În cazul tehnici Real-Time RT-PCR se realizează o etapă adițională de revers-transcriere, în care se sintetizează ADNc din ARN deoarece moleculele de ADN sunt mai stabile decât cele de ARN.

Tehnica Western-blotting

Western-blotting sau immunoblotting este o metodă de identificare și cuantificare a unor proteine specifice dintr-un extract proteic total. Proteina de interes este separată dintr-un extract proteic total prin electroforeză, este imobilizată pe un suport (membrană) iar apoi membrana este incubată cu un anticorp specific. Complexul anticorp-proteină format este în continuare incubat cu un anticorp secundar ce prezintă un sistem de detecție.

După obținerea extractului proteic total se realizează o separare a proteinelor din extract prin electroforeză în gel de poliacrilamidă în prezență de sodiu dodecil sulfat (SDS-PAGE). După separare, proteinele sunt transferate pe o membrană de nitroceluloză, fluorură de poliviniliden sau nylon; iar, pentru a evita interacțiile nespecifice, membrana este blocată cu proteine neutre (albumină serică bovină). După blocare, membrana este incubată cu anticorp (mono- sau policlonal) specific

proteinei de interes, numit anticorp primar. După spălarea cu o soluție neionică de detergenți, membrana ce conține complexul proteină-anticorp primar, este incubată cu un anticorp secundar. Anticorpul secundar, cuplat cu o enzimă (peroxidaza din hrean - HRPO sau fosfataza alcalină - AP), interacționează cu anticorpul primar. În final membrana este incubată cu substratul enzimei, iar proteina de interes se vizualizează sub forma unei benzi direct pe membrană.

Adaptarea facilităților tehnologice experimentale de producere și creștere a sturionilor de Dunăre de la sistemul de creștere intensiv deschis la sistemul de creștere intensiv recirculant. Estimarea capacității portante a sistemelor recirculante experimentale destinat creșterii intensive a sturionilor.

Descrierea sistemului recirculant intensiv de tip acvariu: sistemul recirculant cu unități de creștere tip acvariu va fi utilizat pentru creșterea stadiilor timpurii până la talia de 100 g. Configurația acestui sistem recirculant constă în conectarea unităților de creștere la echipamente de condiționare a calității mediului de cultură, corespunzător dimensionate pentru a menține în ecart optim parametrii mediali critici.

Modulul de creștere este reprezentat de 12 acvarii realizate din sticlă. Numărul unităților de creștere asigură o flexibilitate corespunzătoare în ceea ce privește indicatorii biotehnologici urmăriți, precum și posibilitatea efectuării repetițiilor necesare experimentării tehnologiei. *Unitatea de condiționare a calității apei* are drept scop controlarea și menținerea în domeniul optim, a principalilor parametri fizico-chimici ai apei: conținutul în oxigen dizolvat, concentrația în azot amoniacal, concentrația în particule solide, valoarea de pH și dioxidul de carbon.

Pentru controlul particulelor solide sistemul de creștere este prevăzut cu un *filtru cu nisip sub presiune*, pentru controlul concentrației de azot amoniacal sistemul este prevăzut cu o *unitate de filtrare biologică – tip trickling* alcătuită dintr-o succesiune de materiale filtrante, în care se realizează nitrificarea apei, iar pentru sterilizarea și dezinfectarea apei pe circuitul principal de alimentare cu apă condiționată a acvariilor a fost montată o instalație cu *lampă UV*. Caracteristica funcțională de bază a instalației este puterea nominală care asigură cantitatea de radiații în gama de lungimi de undă optime pentru procesul tehnologic. Pentru asigurarea concentrației de oxigen dizolvat la nivelul impus de gradul de intensitate al populației s-a prevăzut o *unitate de aerare-oxigenare*, formată din compresoare Hagen cu debitul de 1,5 mc/h, montate la nivelul fiecărui acvariu. *Instalația de distribuție a apei și aerului* la modulul de creștere este alcătuită dintr-un sistem de pompe, tuburi și armături ce asigură debitul tehnologic necesar pentru fiecare din unitățile modului. Modul de distribuție al apei la fiecare compartiment al sistemului de creștere, precum și evacuarea apei din acestea asigură o circulație optimă a apei în fiecare acvariu, aspect deosebit de important în condiții de intensitate când este necesar să fie valorificat integral volumul de creștere.

Descrierea sistemului recirculant intensiv pilot: din punct de vedere constructiv și funcțional un sistem recirculant din acvacultură poate fi asimilat, la modul principal, cu un sistem clasic de tratare a apei, de mici dimensiuni, particularizat sub aspect funcțional la cerințele tehnologice pentru creșterea intensivă a unor specii de pești de cultură în spații limitate. Configurația sistemului recirculant pilot de creștere intensivă a presupus integrarea unor echipamente de tratare a apei tehnologice cu unitățile de creștere, corespunzător dimensionate în raport cu tehnologia abordată.

Unitățile de creștere ale sistemului sunt reprezentate de 4 bazine octogonale, a căror geometrie și hidraulică satisfac exigența tehnologică în ceea ce privește randamentul eliminării rapide a solidelor. Bazinele octogonale funcționează prin injectarea tangențială a apei la nivelul peretelui bazinului. Modul specific de admisie a apei în bazin determină o mișcare generală a masei de apă în jurul axului vertical al acestuia sub forma unui așa numit *curent primar de rotație*. Debitul de recirculare, în funcție de care s-au dimensionat componentele sistemului recirculant, este 6m³/h, acesta asigurând preschimbarea întregului volum de apă, dintr-un bazin de creștere, la fiecare ½ h.

Modulul de condiționare a apei are următoarea componență: *filtru mecanic cu tambur* care are rolul de a realiza o primă separare a solidelor reziduale pe baza procesului de filtrare mecanică. Filtrul axial cu sită rotativă este alcătuit din două camere, la nivelul septului de compartimentare fiind amplasată sita. Fluidul, reprezentat de apa uzată, pătrunde în prima cameră, trece axial prin sită și ajunge, sub formă filtrată, în cea de-a doua cameră, de unde este prelevat. Mișcarea de rotație a sitei determină ca partea parțial imersată a acesteia să treacă intermitent prin fața unui mecanism de spălare, unde, un jet de apă pulverizat sub presiune pe fața aval a sitei, spală particulele solide reținute. Apa încărcată cu material spălat este preluată de un jgheab dispus pe fața amonte a sitei și evacuată.

Estimarea capacității portante în funcție de conținutul în oxigen dizolvat

Estimarea capacității portante, în ipoteza funcționării sistemului în regim stabil, presupune determinarea ratei consumului de oxigen în sistem (R_O) în baza ecuației următoare:

$$R_O = Q \cdot (C_{O_i} - C_{O_o}) + P_O$$

Ecuația definește rata consumului de oxigen în cadrul sistemului ca sumă a oxigenului necesar pentru respirația peștilor, descompunerea deșeurilor carbonatice și nitrificarea compușilor azotului ($R_O = R_r + R_{BOD} + R_{NOD}$). În realitate, nivelul fiecăruia din acești parametri (exceptând rata respirației biomasei de cultură) este direct proporțional cu cantitatea de hrană intrată în sistem într-o anumită perioadă de timp. În aceste condiții, se poate simplifica și redefini rata consumului de oxigen, sub forma:

$$R_O = FOC \cdot FR$$

unde: FOC = consumul de oxigen pe unitatea de masă de hrană; FR = rata hrănirii [masă/timp], unde:

$$FR = \frac{FA}{t}$$

unde, FA reprezintă cantitatea de hrană administrată în perioada de timp t [masă/timp].

Combinând ecuațiile se poate estima rata maximă a hranei suplimentare (FR_{mO}):

$$FR_{mO} = \frac{Q \cdot (C_{O_i} - C_{O_o}) + P_o}{FOC}$$

În sistemele de producție din acvacultură, pentru o anumită clasă de mărime a unei specii de pește, rația furajeră într-o unitate de timp se exprimă procentual din masa corporală a materialului de cultură (% BW). Din acest considerent, valoarea ratei hrănirii (FR) poate fi definită astfel:

$$FR = \frac{SBM \cdot \% BW}{100}$$

unde, SBM = biomasa de cultură din sistem [masă]; %BW = rația furajeră [masă furaj/masă pește x timp]

Capacitatea portantă maximă a sistemului în funcție de consumul de oxigen se determină deci, cu relația:

$$SBM = \frac{FR_{mO}}{\% BW}$$

Estimarea capacității portante în funcție de concentrația admisibilă în azot amoniacal total

Estimarea capacității portante în funcție de concentrația admisibilă în azot amoniacal total (TAN) presupune, în primul rând, determinarea ratei de producere a azotului amoniacal (P_{TAN}), folosind ecuația:

$$P_{TAN} = (A_{TAN} \cdot Q_f \cdot E) + Q \cdot (C_{TAN} - C_{TAN_i})$$

Rata maximă a hrănirii stabilită în funcție de conținutul optim de TAN (FR_{mTAN}) se determină astfel:

$$FR_{mTAN} = \frac{(A_{TAN} \cdot Q_f \cdot E) + Q \cdot (C_{TAN} - C_{TAN_i})}{K \cdot PC}$$

Cunoscând corelația dintre rata hrănirii și biomasa din sistemul de cultură, exprimată prin ecuația $FR = SBM \times \% BW$, se poate estima capacitatea portantă maximă a sistemului în funcție de conținutul în TAN (SBM_{mTAN}), cu relația:

$$SBM_{mTAN} = \frac{FR_{mTAN}}{\% BW}$$

Analiza bilanțului de masă al sistemelor recirculante experimentale în conformitate cu ipotezele asumate

În sistemele recirculante este necesar să se realizeze o corelație optimă între capacitatea portantă și cea de producție a sistemului. În caz contrar, sistemul devine ineficient sub următoarele aspecte: ritm redus de creștere, conversie scăzută a hranei, incidența crescută a îmbolnăvirilor și mortalități ridicate. De asemenea, subdimensionarea capacității portante a unui sistem determină exploatarea incompletă, respectiv ineficientă, a acestuia. Din aceste considerente, pentru a se evita supradimensionarea sau subdimensionarea capacității portante, primul pas în proiectarea unui sistem recirculant constă în optimizarea bilanțului material (bilanț de masă). Metoda de rezolvare a problemelor tehnologice și tehnice cu ajutorul analizei bilanțului de masă se bazează pe legea conservării masei, în sensul că masa în cadrul unui sistem închis nu poate fi creată sau distrusă, ci doar transformată.

Efectuarea bilanțului de masă în cadrul unui sistem recirculant din acvacultură presupune parcurgerea următoarelor etape conceptuale: definirea limitelor sistemului; izolarea și identificarea debitelor afluate (input) și a celor efluate de materie la nivelul sistemului; identificarea materiilor ce intră în bilanțul de masă; identificarea proceselor de transformare care au loc în interiorul limitelor sistemului cu efect asupra bilanțului de masă.

În cazul de față, pentru atingerea obiectivelor proiectului, se întocmește bilanțul de masă pentru speciile *H. huso*, *A. stellatus* și *A. ruthenus*, în contextul creșterii intensive în cadrul facilităților tehnologice existente, deținute de partenerii industriali, care vor fi completate astfel încât să fie utilizate la maximă capacitate. Analiza critică a intrărilor și ieșirilor va permite estimarea debitelor de operare a sistemului recirculant precum și dimensionarea echipamentelor de filtrare prin operarea cărora, parametrii limitativi sunt menținuți în ecartul impus tehnologic. Pentru studiul experimental se propune realizarea unui sistem recirculant închis de acvacultură al cărui volum recirculant reprezintă 90% din volumul inițial de apă.

Analiza bilanțului de masă pentru sistemul recirculant destinat creșterii intensive a sturionilor

Dintre cele trei specii de sturioni care fac obiectul cercetărilor, morunul este specia cea mai robustă, cu cel mai mare ritm de creștere și potențial economic, acesta atingând talia de comercializare după doi ani. De asemenea, toleranța mai

ridicată a acestei specii la diferenții factori tehnologici permite practicarea unor densități de stocare de până la 60-70kg/m³ (Steven D., 2002). Din aceste considerente, dar și datorită faptului că morunul va fi monitorizat pe întregul ciclu de producție, bilanțul de masă a fost întocmit luând ca model tehnologic, tehnologia pentru creșterea intensivă a speciei *H. huso*.

Întocmirea bilanțului de masă pentru sistemul recirculant destinat creșterii în condiții de maximă densitate a morunului implică, pe lângă parcurgerea etapelor conceptuale amintite, întocmirea unui plan de producție detaliat pentru a se evita fluctuațiile în ceea ce privește inputul de hrană și, deci, indirect, producția de reziduuri generate care afectează performanța echipamentelor de tratare a apei, în special eficiența filtrului biologic. De asemenea, planul de producție care, în cazul de față, este conceput pentru a asigura cadrul optim de desfășurare a experimentărilor pe parcursul celor 2 ani, stă la baza dimensionării judicioase a echipamentelor de filtrare în scopul reducerii la minimum a costurilor de operare.

Schema tehnologică a fost întocmită cunoscând indicatorii tehnologici specifici, obținuți experimental în cadrul unor cercetări desfășurate anterior de către departamentul de Acvacultură, Știința Mediului și Cadastru în colaborare cu parteneri industriali. De asemenea, menționăm faptul că analiza lotului propriu deținut de fiecare dintre cei doi parteneri, Caviar House și Osetra, prin evaluarea fenotipică și meristică la populațiile de acvacultură a stat la baza întocmirii atât a bilanțului de masă, cât și a proiecției tehnologice pe cei doi ani de experimentări.

Popularea sistemului recirculant se face cu 40.000 larve de morun, acestea fiind rezultatul însumării loturilor experimentale care vor fi monitorizate pe parcursul celor doi ani de experimentări. Pentru a atinge obiectivele științifice ale proiectului, sistemul recirculant va fi populat primăvara, după reproducerea artificială a morunului, atât în primul an, cât și în cel de-al doilea an de experimentări. În această situație operarea sistemului la maxima capacitate va fi posibilă numai la finalul anului II, când practic se cumulează producția de reziduuri generate de o biomasă de morun cu vârsta de 1 an și a celei cu vârsta de 2 ani. Pentru obținerea materialului biologic de păstrugă și cegă, se vor urmări schemele de încrucișare stabilite, larvele obținute fiind populate în sistemul recirculant unde vor fi menținute timp de 9 luni.

Pentru efectuarea bilanțului de masă din cadrul sistemului recirculant destinat creșterii intensive a sturionilor este necesară definirea limitelor sistemului. Deoarece exigența tehnologică precum și cerințele privind calitatea mediului de cultură sunt similare la cele trei specii de sturioni, se vor defini un singur set de limite care, prin designul sistemului recirculant, vor permite creșterea atât simultan cât și alternativ a speciilor de sturioni autohtoni.

Bilanțul producției de reziduuri din sistemul recirculant destinat creșterii intensive a morunului

Sintetic, principalele procese care au loc în sistemele recirculante de acvacultură sunt reprezentate de generarea de reziduuri și tratarea sau purificarea apei tehnologice în vederea reutilizării acesteia. Dacă reziduurile produse de biomasa de cultură s-ar acumula în sistem, mediul de susținere al acesteia, apa, s-ar transforma rapid într-un concentrat de metaboliți nocivi chiar și pentru cele mai rezistente specii de cultură. Pentru ca apa tehnologică să poată fi reutilizată, metaboliții trebuie să fie eliminați, fie convertiți în produși mai puțin toxici prin intermediul proceselor de tratare a apei. Virtual, toate reziduurile formate într-un sistem recirculant provin din hrană. Presupunând o rată de conversie a hranei ce variază între 1:1 și 2:1, circa 80 % din hrana consumată (greutate uscată) va fi eliminată sub formă lichidă, solidă sau gazoasă, fracțiunea solidă (TSS) având ponderea cea mai mare (Cristea *et al.*, 2002). Producția de suspensii solide dintr-un sistem de creștere din acvacultură poate fi evaluată luând în considerare excreția peștilor, hrana neconsumată și biomasa bacteriană.

Rata producerii excrementelor este determinată de rata hrănirii și diferă în funcție de specia de cultură. Astfel, pentru acipenseride, se estimează că excrementele solide reprezintă 25÷30% din hrana consumată. O a doua sursă importantă de particule solide în suspensie este reprezentată de hrana neconsumată. Indiferent de modul de prezentare (granule, făinuri, etc.), de mărimea particulelor constituente și de gradul de umiditate, se apreciază că, chiar după 4 ore de la distribuire, doar o mică parte (15÷25%) din hrana în stare uscată s-a dizolvat, restul rămânând sub formă de particule individuale. Dezintegrarea acestora se realizează cu dificultate de la sine, fără a se interveni cu procedee mecanice sau biologice (Cristea *et al.*, 2002). În sistemele intensive de acvacultură, aproximativ 20 până la 40% din materia uscată administrată biomasei de cultură este incorporată în corpul peștilor, restul regăsindu-se sub formă de reziduuri a căror cantitate depinde de numeroși factori precum specia de cultură, compoziția furajului, temperatură, caracteristicile granulelor. Pentru menținerea în ecart optim a principalilor parametri limitativi pentru speciile de sturioni luate în studiu este necesar să se estimeze debitul de recirculare și a ratei zilnice de împropătare. Această estimare este posibilă după o cuantificare a principalelor fracții reziduale pentru fiecare etapă de creștere.

Elaborarea unor standarde minime de management tehnologic și operațional pentru sistemele recirculante experimentale

Un sistem recirculant de acvacultură (RAS) poate fi definit drept un sistem acvacol ce încorporează tratarea și reutilizarea apei, în condițiile în care este înlocuit zilnic un procent de maxim 10% din volumul total al apei. Conceptul de sistem recirculant de acvacultură constă în reutilizarea unui volum de apă prin tratarea continuă a acesteia. Componentelor de tratare a apei utilizate într-un sistem recirculant de acvacultură trebuie să fie calibrate în raport cu cantitățile de hrană administrate, pentru a susține rate de creștere și densități de stocare foarte mari, necesare pentru creșterea eficienței financiare.

Sistemele recirculante de producție trebuie să fie proiectate astfel încât să cuprindă un număr de procese fundamentale de tratare a apei. Aceste procese, denumite și "procesele unitare" includ: eliminarea deșeurilor solide (atât fecale cât și hrana neconsumată), conversia amoniacului și a nitriților, adaosul de oxigen dizolvat în masa apei, precum și eliminarea dioxidului de carbon din apă. În cazul unor specii mai puțin robuste și în funcție de volumul de apă folosit, un proces de eliminare a solidelor fine și a celor dizolvate, precum și un proces de control din punct de vedere bacterian, a populațiilor piscicole, pot reprezenta o necesitate.

Standarde minime privind proiectarea unui RAS

Analiza bilanțului de masă: în proiectarea sistemelor moderne de acvacultură se folosesc, în general, calculele de bilanț masic care identifică și totodată cuantifică intrările, ieșirile și modificările interne (conversii și consumuri) ale sistemului. Astfel, în procesul de proiectare a acestor sisteme, trebuie luat ca reper nivelul maxim de încărcare (rata de stocare, rata de hrană, etc.), presupunând că sistemul va opera într-o "starea de echilibru" în care biomasa stocată nu variază considerabil în timp (Losordo și Westers, 1994).

În scopul de a duce la bun sfârșit o analiză de bilanț masic, capacitatea de producție a sistemului trebuie să fie bine definită, fapt ce conduce la determinarea cantității maxime de furaj care poate intra în sistem, la un moment dat. Valorile nitraților (NO_3), ale azotului amoniacal total ($\text{TAN} = \text{NH}_3 + \text{NH}_4$), ale oxigenul dizolvat (DO) și ale bilanțului masic al solidelor pot fi deduse din sistem, cu scopul de a estima:

- ✓ nivelurile oxigenului dizolvat necesare pentru creșterea materialului piscicol, pentru procesele biologice de filtrare și pentru degradarea deșeurilor
- ✓ cerințele legate de debitul de curgere a apei, unitățile de creștere și totalitatea componentelor de tratare a apelor
- ✓ specificațiile de performanță exacte pentru toate componentele de tratare a apei.

Estimarea capacității portante în funcție de concentrația admisibilă în azot amoniacal total

Azotul amoniacal total este generat atunci când se administrează peștelui un furaj cu un conținut ridicat de proteină, dar și atunci când are loc degradarea deșeurilor și a resturilor de hrană neconsumată. TAN generat în cadrul unui sistem recirculant este o funcție a cantității de hrană care intră în sistem (1-5% biomasă/zi) și a conținutului în proteină al acesteia (30-60%). Eficiența filtrului biologic și de generare de TAN pot fi utilizate pentru a determina debitul zilnic de apă necesar, astfel încât filtrul biologic să poată menține un nivel de dorit al TAN. În plus, poate fi calculat și schimbul zilnic de apă necesar pentru a menține un nivel acceptabil al nitraților, în cadrul sistemului.

Estimarea capacității portante în funcție de conținutul de oxigen dizolvat (DO)

Componente esențiale în cadrul RAS trebuie să furnizeze o cantitate de oxigen necesară pentru:

- ✓ Creșterea materialului piscicol: consumul de oxigen de către peștele crescut în RAS depinde de o multitudine de factori precum mărimea materialului piscicol sau temperatura apei. Oxigenul se consumată în timpul digestiei hranei și cantitatea de oxigen necesară poate fi calculată în funcție de cantitatea de hrană introdusă în sistem. Biomasa materialului piscicol, rata de administrare a hranei (% biomasă/zi) și consumul de oxigen pe un kilogram de furaj (în general 200-500g O_2 /kg hrană) sunt utilizate pentru a calcula consumul de oxigen al materialului piscicol în cadrul RAS.
- ✓ Procesul de nitrificare al amoniacului: acest proces consumă oxigen la o rată de 4,57 grame pe gram de TAN oxidat în nitrat. Producția de TAN poate fi calculată în funcție de biomasa piscicolă și de rata de administrare a furajului și folosită pentru a determina cantitatea de oxigen consumată în urma procesului de nitrificare.
- ✓ Degradarea dejecțiilor și a cantității de hrană neconsumată: materia organică consumă oxigenul pe măsură ce carbonul se divide (cererea de oxigen-carbon), în timpul proceselor biologice. Prin urmare, deșeurile reținute în cadrul sistemului contribuie la determinarea conținutului total de oxigen, în cazul în care nu sunt îndepărtate eficient. Această cerere de oxigen biologic (BOD) poate fi semnificativ mai mare decât cea atribuită materialului piscicol din cadrul sistemului. Eficiența filtrării mecanice poate minimaliza sursa consumului de oxigen.

Componentele unui RAS

- Componente esențiale: în aceasta categorie sunt incluse mecanismele de alimentare și filtrare a apei, mecanismele de filtrare biologică, UV, unitățile de creștere, pompele, fittingurile, elementele legate de controlul mediului, elementele ce asigură managementul gazelor dizolvate (oxigen și dioxid de carbon) și sistem electric de back-up.
- Suport infrastructură și echipament: Această categorie include hala, echipamentele de monitorizare a apei, sistemul de alarmă, sistemul automate de administrare a hranei, zonele destinate depozitării, zonele destinate cazării personalului și zona de lucru.
- Sistemele adiționale necesare creșterii producției: Aceasta categorie poate include sistemele destinate carantinei, sistemele de dezinfecție, sistemele de automonitorizare și de control.

Managementul gazelor dizolvate

a) Oxigenul. În general, sistemele acvacoale intensive încearcă să mențină un nivelul al oxigenului dizolvat aproape saturație (100%), pentru a optimiza creșterea și performanța acestuia. La nivele mai ridicate decât cel de saturație, pierderea în atmosferă a oxigenului dizolvat poate fi semnificativă (Parker *et al.*, 2002). Un avantaj al folosirii oxigenului pur este reducerea costurilor legate de pompare, prin introducerea apei în sistem, la nivele de saturație mai mari de 100%.

RAS sunt divizate în două nivele de intensificare bazate pe metodele de aprovizionare cu oxigen:

✓ Sisteme cu o densitate mică (<30-40 Kg/Kl) sunt oxigenate prin aerare, asigurată de către suflante/compressoare și componente de reerare.

✓ Sisteme cu o densitate mare (>60 – 100+ Kg/Kl) primesc oxigen în formă pură.

Necesarul de oxigen al peștilor variază în funcție de rata metabolică (fiind oarecum influențat de consumul de hrană), talia peștilor și condițiile de mediu. Alte informații necesare a fi luate în seamă includ biomasa totală la capacitate maximă de stocare, debitul apei, concentrația dorită de oxigen dizolvat, concentrația minimă de oxigen dizolvat la evacuare (de obicei 80-100% saturație) și eficiența echipamentului de transfer al oxigenului.

Filtrarea biologică și descompunerea deșeurilor și a hranei neconsumate au un impact asupra nivelului oxigenului dizolvat și trebuie luate în seamă în calculul bugetului de oxigen al oricărui sistem. O regulă relativă stabilește faptul că pentru fiecare kilogram de hrană, aproximativ 0,5–0,56 kg de oxigen vor fi consumate de către pești și bacterii (Parker *et al.*, 2002). Oxigenul produs de generatoare conține aproximativ 10% azot. Acest fapt limitează selecția de echipamente de transfer folosite împreună cu generatoarele de oxigen, din cauza posibilității atingerii unui nivel de supra-saturație în azot.

Rata cu care se face admisia de oxigen în sistem definește intensitatea acvaculturii practice (kg pește/m³ unitate creștere). Termenul de „aerare” se referă la adăugarea de oxigen atmosferic în apă (aerul are 21% oxigen). Termenul de oxigenare se referă la adăugarea de oxigen gazos (95-100% oxigen). Oricare dintre aceste metode poate fi folosită, însă pot exista mai multe riscuri asociate acestui proces de aerare, deoarece nivelele de oxigen dizolvat nu pot fi la fel de mari ca în cazul folosirii sistemelor de oxigenare. Aerarea se realizează, de obicei, prin intermediul unor difuzoare de aer. Sistemele formate din difuzoare de aer oferă o presiune scăzută de la un ventilator la un anumit tip de difuzor de aer situat pe fundul unui bazin de creștere. Aceste difuzoare produc mici bule de aer care se ridică în unitatea de creștere. Cu cât bulele sunt mai mici și unitatea de creștere mai adâncă, cu atât mai mult oxigen este transferat. Din acest motiv, majoritatea unităților de creștere au cel puțin un metru adâncime. Cele mai eficiente difuzoare sunt cele cu membrane.

În sistemele intensive de producție, rata consumului de oxigen de către pești și bacterii depășește posibilitățile de oxigenare ale instalației de aerare. La densități mari de stocare, se folosește oxigen pur. Folosirea acestuia oferă posibilitatea oxigenării rapide a apei, chiar și atunci când concentrațiile în oxigen dizolvat ale unității de creștere se apropie de saturație (cca. 7mg/l). În cazul folosirii de oxigen gazos, pur, un echipament de oxigenare trebuie să transfere între 80 și 95% oxigen în apă, pe când echipamentul de oxigenare cu difuzoare de aer poate atinge o eficiență maximă de 30%.

b) Dioxidul de carbon. Dioxidul de carbon este un produs secundar al procesului de respirație al peștilor și bacteriilor din cadrul RAS și cantitatea produsă este direct proporțională cu cantitatea de oxigen consumat astfel: pentru fiecare gram de O₂ consumat, se produce 1,27g CO₂. Dioxidul de carbon reacționează cu apa, formând acid carbonic, care reduce valoarea de pH în interiorul unui sistem recirculant. Nivele înalte de CO₂ circulând conduc la o scădere a pH-ului sângelui peștilor, reducând abilitatea hemoglobinei de a transporta oxigenul, chiar și în cazul unor saturații ridicate.

Dioxidul de carbon nu se acumulează în sistemele cu densități mici de stocare, deoarece acestea folosesc o rată de schimb a apei și de asemenea o rată de aerare ridicată. Acumularea are loc în cazul sistemelor unde se găsesc densități mari de populare și care folosesc injecție de oxigen. În aceste sisteme, dioxidul de carbon trebuie monitorizat atent, astfel încât nivelul acestuia să nu depășească 20mg/l.

Dioxidul de carbon este de multe ori mai solubil în apă decât oxigenul, în consecință, este mult mai greu de îndepărtat. Astfel, echipamentele tip „gas-stripping” trebuie să ofere un flux de aer foarte ridicat, de 3 până la 10 ori mai mult volum de aer decât volumul de apă tratat. Acest lucru se reușește folosind o turbină care forțează circulația aerului prin coloanele pline de medii plastice, degazoare. Aceste instalații au nevoie de spații bine ventilate sau au nevoie să fie conectate cu exteriorul clădirii.

Dioxidul de carbon este îndepărtat din apă printr-o formă sau alta de schimb de gaze. Fie apa este expusă aerului printr-un echipament de tip cascadă, fie se introduce aer în apă prin intermediul difuzoarelor de aer, pentru a se elimina excesul de CO₂. O metodă des întâlnită de îndepărtare a CO₂ în cadrul sistemelor recirculante de acvacultură este cea care presupune folosirea coloanelor de aerare. Aceste dispozitive sunt similare unui biofiltru trickling și constau într-un mediu plastic și un sistem de distribuire a apei montat deasupra reactorului. Un aerator de mică presiune este folosit pentru a introduce aer în partea de jos a coloanei, îndepărtând astfel CO₂ din acesta.

Sisteme adiționale pentru sporirea producției

Sisteme de carantină și tratament: este prudent ca peștii noi sosiți să fie izolați de sistemul recirculant principal până când starea lor de sănătate poate fi determinată. Unul sau mai multe sisteme mici pot fi instalate în acest scop, fiecare având echipamente diferite de dirijare și testare. Facilități și protocoale de igienizare a personalului care intră în contact direct cu peștii, trebuie de asemenea implementate. Dacă este posibil, aceste structuri trebuie amplasate într-o încăpere separată de cea în care se află unitățile de creștere. Sunt necesare de asemenea și zone pentru stocarea chimicalelor și a deșeurilor biologice.

Sisteme de triere: trierea este o etapă importantă în a obține un gust bun al produsului finit (o parte importantă a procesului de asigurare a calității produsului finit) și în consecință, în mărirea profitului. Sistemul trebuie să aibă capacitatea necesară de a stoca cantitățile estimate de material piscicol, în special dacă peștii vor fi înfomețați înainte de vânzare, pentru a micșora cantitatea de grăsime și a asigura un țesut muscular ferm, potrivit pentru comercializare.

Distribuitoare de hrană: în cazul sistemelor recirculante de acvacultură se folosesc două tipuri de hrănitore:

- Hrănitorele mecanice, care pot fi programate pentru a asigura administrarea unor cantități prestabilite de hrană, pe durate de timp variabile, determinate, de un număr de ori pe zi.
- Hrănitorele automate oferă avantajul de a permite un număr des de hrăniri, asigurând o încărcare mult mai constantă a proceselor de filtrare mecanică și biologică.

Controlul valorii de pH: dacă alcalinitatea nu este restituită, valoarea de pH apei va scădea. O metodă pentru a-l ridica este adăugarea de bicarbonat de sodiu în sistem, în doze de 250g pentru fiecare kilogram de hrană administrat (Wheaton *et al.*, 2002). Unele sisteme folosesc sonde de pH și injectează soluții alcaline pentru menținerea pH-ului între limitele normale. Apa care este puternic alcalină tinde să se opună schimbărilor de pH, ceea ce este un lucru de dorit. Procesul de nitrificare produce acizi și scade alcalinitatea.

Sisteme de alarmă, monitorizare și control: experiența generală în domeniul sistemelor recirculante de acvacultură industrială arată că sistemele de alarmă vor alerta operatorul în aproximativ 50% din cazurile în care se prezintă o problemă (Timmons, 2002). În mod obișnuit, aceste sisteme utilizează robinete electrice, senzori de control a nivelului apei, senzori de presiune, echipamente de control al sursei de energie și a cantității de oxigen dizolvat precum și a temperaturii, cu scopul transmiterii informațiilor către sistemele de monitorizare și control.

Configurarea facilităților: configurația, din punct de vedere fizic, a unui sistem recirculant de acvacultură trebuie integrată cât mai bine în regimul de întreținere al fermei. Astfel, se va asigura folosirea sistemului la capacitate maximă și evitarea suprapopulării cu exemplare în perioada premergătoare atingerii dimensiunii de comercializare.

Folosirea unui singur sistem recirculant de acvacultură pentru a susține economic întreaga întreprindere, prezintă un risc foarte mare. Se recomandă folosirea a cel puțin patru astfel de sisteme, independente unul de altul, astfel încât în caz de pierdere totală, doar 25% din producție să fie afectată.

Managementul producției

Există diferite căi de creștere a materialului piscicol, fiecare cu avantaje și dezavantaje, create de limitările unui sistem recirculant de acvacultură industrială. Dacă sistemul este populat peste capacitatea optimă și peștii sunt hrăniți cu un necesar optim de hrană, sistemele de tratare a apei vor fi depășite și peștii vor avea un ritm scăzut de creștere din cauza calității scăzute a apei. În același timp, în condițiile acelorași densități de stocare, dacă operatorul este limitat de capacitățile sistemelor de tratare a apei și administrează o cantitate de hrană sub cerințele minime ale respectivei specii, ei vor avea din nou un ritm de creștere lent, până la atingerea dimensiunii propice comercializării.

Densitatea de stocare: densitatea de stocare a materialului piscicol (pești/m³) și densitatea absolută (kg/m³) trebuie să fie stabilite în concordanță cu rata maximă de hrănire (kg hrană/oră sau zi) pe care sistemul o poate suporta, fără pierderi semnificative de hrană sau suprasolicitarea sistemelor de tratare a apei. Aceasta este în funcție de designul sistemului, speciile de pești și tipul de hrană administrată.

Managementul tehnologiei de producție: în mod normal, peștii sunt crescuți până la o talie medie, după care sunt recoltați din unitățile de creștere, de cele mai multe ori gradați, sortați și depozitați din nou în aceeași unitate de creștere sau în unele cazuri, în mai multe. Separarea pe mărime a materialului piscicol, aflat la vârste fragede, previne dominația peștilor mai mari în lupta pentru hrană. De asemenea, implementarea unui sistem de carantină este obligatorie.

Sisteme de administrare a hranei: folosirea unei diete de înaltă calitate, care să confere pierderi minime, poate îmbunătăți calitatea apei și rata maximă de hrănire pe care sistemul de tratare a apei o poate suporta. Hrănirea peștilor de două-trei ori pe zi, timp de 15-20 de minute, va oferi un ritm de creștere excelent. Cu toate acestea, acest stil de hrănire poate suprasolicita sistemul de tratare a apei și poate reduce cantitatea de oxigen din apă. Este de preferat ca administrarea hranei să se realizeze pe o perioadă mai îndelungată de timp, în doze mai mici. Acest lucru devine realizabil, de obicei, prin folosirea aparatelor automate de administrare a hranei.

Elaborarea modelului tehnologic experimental de producere, creștere și monitorizare a sturionilor de cultură și stabilirea variantelor de testare a ipotezelor asumate

Indiferent de scopul pentru care se aplică programul de reproducere artificială (repopulare sau comercial), obiectivul principal ce se impune este cel de conservare a diversității genetice la nivelul progeniturilor deoarece ei constituie viitorul lot de remonți și reproducători propriu al fermei, ceea ce ar permite, pe termen lung, consecințele genetice ale consangvinității cu afectarea valorilor caracterelor și însușirilor cantitative, adică acele însușiri morfoproductive urmărite în practica tehnologică.

În vederea obținerii unor loturi utile pentru atingerea obiectivelor proiectului privind monitorizarea atât a factorilor biomoleculari cât și a celor biotehnologici cu potențial de influențare a performanțelor productive la sturioni ne propunem să ținem cont de recomandările făcute de ordinul MO nr. 385/04.05.2006 privind folosirea reproducătorilor de sturioni utilizați la reproducerea artificială corelat, însă, și cu posibilitățile reale de capturare a reproducătorilor.

În funcție de numărul de reproducători capturați (♀/♂) pentru fiecare specie se va realiza o schemă multifactorială de încrucișare astfel încât rata de consangvinizare/generație să fie cât mai mică (preferabil $\Delta F \leq 0,5\%$) ceea ce îi va permite

partenerului Kaviar House să își realizeze în pe termen lung lotul necesar de remonți și reproducători cu o diversitate genetică adecvată. Din perspectiva bazei materiale existente la nivelul stației de reproducere a partenerului Kaviar House este posibilă realizarea unei combinații minime de de 2x2 factorial atât pentru morun, cât și pentru păstrugă.

Succesiunea fazelor pentru modelul tehnologic experimental de producere, creștere și monitorizare a sturionilor de cultură

Verificarea calității reproducătorilor: în cazul sturionilor migratori anadromi există două ecotipuri fiziologice sau poate două variații genetice intrapopulaționale cu cerințe diferite pentru atingerea maturității definitive, ceea ce îi determină să migreze fie toamna, fie primăvara. De regulă, reproducătorii diferitelor specii de sturioni sunt procurați în perioada de maximă migrație spre locurile de reproducere, când gonadele se află în faze premergătoare stadiului de maturare ceea ce determină, de cele mai multe ori, să fie favorizate la reproducere formele de primăvara.

În acest scop se prevede pescuirea timpurie a reproducătorilor (înainte ca apa să atingă temperatura optimă pentru reproducere) sănătoși, bine dezvoltati și fără nici un fel de traumatisme. Bazinele în care vor fi parcați reproducătorii, separați pe specii și sexe, trebuie să asigure o bună oxigenare a apei, un debit de primenire a apei de 0,02 l/s/mp și menținerea unor condiții de temperatură cu 2-4 grade sub cea normală de reproducere, în cazul în care se impune păstrarea lor pe o perioadă mai mare (2 săptămâni).

Caracteristicile pe care trebuie să le avem în vedere la alegerea reproducătorilor sunt:

- în cazul femelelor - abdomenul mare, moale la apăsare, botul mai ascuțit decât de obicei, spinii, mai ales cei laterali și ventrali, mai puțin proeminenți, pe suprafața corpului o mare cantitate de mucus și porul genital roșiatic;
- în cazul masculilor, care au corpul mai suplu și mai alungit decât femelele, abdomenul apare de asemenea moale la palpare și porul genital mai colorat.

Stimularea maturării gameților: Metoda unanim folosită în stimularea și declanșarea procesului de maturare a celulelor sexuale este cea a administrării de doze suplimentare de hormon gonadotrop.

Prelevarea/colectarea gameților: Femelele sunt anesteziate prin introducerea lor într-o soluție tranchilizantă și se extrag ovulele fie prin mulgere, fie prin practicarea intervenției chirurgicale. Reproducătorii folosiți sunt păstrați într-un bazin în cadrul stației de incubație pentru a putea fi urmărită evoluția lor.

Fecundarea: Dacă procesul de maturare a ovocitelor decurge normal, icrele posedă mari posibilități de fecundare. După ovulație, durata în care icrele pot fi fecundate depinde direct de mediul în care se păstrează. Pentru fecundarea icrelor de sturioni pe cale artificială s-au folosit diferite metode, dintre care, metoda semiuscată s-a dovedit a fi cea mai eficientă.

Incubația: În prezent instalațiile cu cele mai bune rezultate în procesul de incubare sunt incubatoarele Zug-Weiss. În mod curent pentru incubarea icrelor de sturioni, se introduc 200-250 g de icre. În incubatoare, icrele trebuiesc antrenate în masa apei, dar curentul nu trebuie să fie prea mare pentru a nu traumatiza icrele sau pentru a nu fi evacuate o dată cu apa. Debitul de alimentare trebuie să fie cam 6-8 l/min. Durata de incubare este dependentă de temperatură și variază și cu specia dar nu foarte mult. În general timpul de incubare este cam 3 zile. Un alt factor important pentru procesul de incubație este oxigenul din apă. Cea mai mică cantitate admisibilă este de 5-6 mg/l, de aceea se impune un control permanent al circuitului apei și al purității ei. Pe perioada incubației vor fi monitorizate aspectele calitative ale dezvoltării embrionare în următoarele momente: fecundarea, segmentarea, gastrulația, neurulația.

Eclozarea: Cum eliberarea embrionilor se face treptat și este influențată de condițiile de temperatură, procesul se realizează într-un interval de timp variabil (circa 1-2 zile). Eclozarea se va face în incubatoarele Zug-Weiss iar transvazarea larvelor eclozate se va face separat pe loturi (provenind de la diferiții reproducători) în bazinele din incinta stației de reproducere care funcționează în sistem deschis.

Creșterea larvelor în perioada de hrănire endogenă: Asigurarea dezvoltării normale a larvelor în primele stadii de dezvoltare postembrionară și în special în etapa de trecere la hrănirea activă s-a dovedit a fi o perioadă dificilă, esențială în reproducerea artificială a sturionilor. Prima etapă (care durează circa 3 zile) începe cu eclozarea și continuă până la trecerea larvei la stadiul în care respirația se face prin branhiile externe. Această etapă se caracterizează prin: slaba diferențiere a tuturor sistemelor și organelor și în special a tubului digestiv; hrănirea este endogenă, cu vitelus; slaba intensitate a folosirii oxigenului. Datorită acestor trăsături care îi oferă o rezistență mare la condițiile nefavorabile de mediu se recomandă transportul larvelor către stația de creștere intensivă cu apă recirculată (sistemul recirculant) acesta făcându-se cu pierderi minime.

Popularea bazinelor sistemului recirculant de acvacultură: Cea de-a doua etapă de dezvoltare larvară durează până la 9 zile, aproape de sfârșitul perioadei de hrănire endogenă. Caracteristic pentru această etapă sunt: formarea primordiilor înotoare dorsale și anale, formarea primordiilor spinilor dorsali, dezvoltarea rețelei de vase sanguine în franjuri branhiilor, respirația prin branhiile externe, fapt ce determină creșterea necesarului de oxigen, dezvoltarea ochilor; activitate intensă a tiroidei și continuarea dezvoltării tubului digestiv. Hrănirea este endogenă și se realizează prin fagocitarea vitelusului, funcție îndeplinită de toate părțile componente ale tubului digestiv. Funcția primitivă a fagocitării vitelusului îngreunează procesul histogenetic al aparatului digestiv, viteza de dezvoltare fiind mai mare în zona valvulei spirale decât în direcția sacului vitelin.

Creșterea larvelor în perioada de hrănire exogenă: Următoarea etapă începe cu momentul în care larvele folosesc hrana exogenă, paralel cu cea endogenă (hrănire mixtă) și durează cca 5-7 zile. Comportamentul larvelor în etapa de trecere

la hrănirea activă este diferit. Paralel cu dezvoltarea aparatului digestiv este grăbită simțitor și dezvoltarea sistemelor nervos, circulator și respirator. Larvele de morun încep să se deplaseze rapid în căutarea hranei, fără a mai atinge substratul. La fel ca și celelalte specii, larvele de morun se hrănesc în prima etapă cu microplancton dar pentru puțin timp, deoarece ele devin repede capabile să prindă organisme mult mai mari. În același timp ele apucă cu plăcere larvele altor specii de pești și chiar larvele aceleiași specii, de dimensiuni mai mici, fapt care face imposibilă popularea combinată în bazinele de creștere. Când sunt total lipsite de hrană, larvele înoată continuu în masa apei, de-a lungul pereților bazinului sau a juvelnicului și se întorc pe spate. Morunul are deci un comportament diferit, manifestându-se ca un tip răpitor, din cele mai timpurii stadii.

Larvele de păstrugă și cegă se află tot timpul în mișcare. Ele înoată la suprafața substratului și a pereților bazinului, manifestând însă preferință față de substrat. Pot, de asemenea, să se ridice cu ușurință în straturile superioare ale apei pentru a vâna plancton. În perioadele ulterioare, larvele de păstrugă și cegă se deosebesc de celelalte specii prin faptul că petrec din ce în ce mai multă vreme în masa apei. Trecerea la hrănirea exogenă este o perioadă foarte critică pentru sturioni deoarece au nevoie de o hrană adecvată care să corespundă cerințelor lor biologice. În primele etape de hrănire se administrează nauplii de *Artemia* care se distribuie din trei în trei ore, având în vedere faptul că acest crustaceu rezistă în apă dulce cam trei ore. Cantitatea administrată este în funcție de specie și de densitatea de populare.

Până la conturarea caracterelor exterioare asemănătoare adulților mai trec 20-25 de zile ajungând la perioada de pui. În această perioadă larvele sunt capabile să consume o hrană mult mai variată și devin polifage. Trăsăturile comportamentului larvelor de sturioni se mențin aceleași și în etapele următoare ale dezvoltării ontogenetice - perioada de pui. În această perioadă se acordă o atenție deosebită calității și cantității de hrană, a apei și a oxigenului din apă. Pe măsură ce aceștia cresc se pot distribui exemplare mai mari de *Artemia* sau o pastă de *Tubifex*. S-au obținut rezultate bune și utilizând furaje de o calitate superioară cu un conținut ridicat de proteine 52-57%.

Creșterea puilor de sturioni 0+ (I an de viață): Puii de sturioni la vârsta de 40-60 de zile prezintă caracterele generale ale peștelui adult, au capacitatea de a alege condițiile de viață specifice stabilite în cursul evoluției și se pot salva de urmărirea răpitorilor. În principiu ajung la o masă corporală de 1,5-3 g, moment în care pot fi repartizați și în alte sisteme de creștere.

Creșterea puilor de sturioni 1+ (al II lea an de viață): Trăsăturile comportamentului puilor de sturioni se mențin aceleași și în etapele următoare ale dezvoltării ontogenetice.

Elaborarea protocolului experimental, stabilirea parametrilor de calitate ai apei și a indicatorilor performanței de creștere care vor fi monitorizați la speciile de păstruga, morun și cega de Dunăre

Pe modelul tehnologic propus se grefează, în succesiunea fazelor, monitorizarea unor parametri fiziologici, tehnologici, fizico-chimici de calitate ai apei, monitorizare ce se va face fie continuu pentru unii, fie vor fi determinați pentru o anumită fază tehnologică. Așa cum este sugerat la nivelul modelului experimental propunem parcurgerea următorilor pași:

Anestezierea peștilor: este necesară în cazul manipulărilor la reproducere. Dintre anestezicele folosite în acvacultură se poate menționa MS 222 (20-25 mg/l apa), propiscin (1 ml/l apa) sau clove oil (25-30mg/l apă). Se verifică constant reproducătorii pe parcursul anestezierii pentru a menține starea optimă de narcoză.

Sexarea și aprecierea maturității sexuale la pești: Metoda cea mai folosită este biopsia gonadelor cu ajutorul unei sonde special concepută pentru extragerea ovocitelor sau spermei, prin penetrarea laterală a peretelui abdominal, spre zona posterioară (se ține cont de poziționarea anatomică a gonadelor). O altă metodă propusă este cea de a extrage celulele sexuale prin inserarea în papila genitală a unui cateter cu diametrul adecvat taliei pestelui (diametrul extern variază între 13,8 ± 10 mm la femele, 5 mm la masculi) urmată de o ușoară aspirare sau masare pe abdomenul reproducătorului.

a) Pe ovocitele extrase putem realiza o serie de analize, cum ar fi:

- determinarea diametrului mediu al ovocitelor aflate în stadii avansate de maturare;
- determinarea indicelui de polarizare al ovocitelor.

În ceea ce privește determinarea gradului de maturare al ovocitelor în vederea utilizării reproducătorilor la reproducere, se vor face următoarele determinări:

- observații privitoare la omogenitatea, dimensiunea, culoarea și forma ovocitelor;
- determinarea diametrului mediu al ovocitelor prin măsurarea ovocitelor imediat prelevate sau fierte ușor (2-4 minute) la micrometrul ocular al unei lupe binoculare; diametrul mediu se determină la min. 30 ovocite pentru fiecare exemplar femelă studiat;
- determinarea indicelui de polarizare al ovocitelor (IP). Specialiștii apreciază că la valori mai mici de 0,1 ale indicelui de polarizare, femelele pot fi supuse reproducerii artificiale fiind necesare doar una sau două injecții de stimulare hormonală pentru atingerea ovulației.
- competența la maturarea *in vitro* –incubarea unui număr de ovocite prelevat prin biopsie într-o soluție salină la care se adaugă progesteron (P) sau 17 α ,20 β -dihidroxiprogesteron (DP) (10 μ g/ml soluție) la o temperatură constantă, egală cu temperatura din care provin peștii eșantionați. Dacă 24 h mai târziu ovocitele sunt mature într-un procent mai mare de 90% atunci femela de sturion este aptă de ovulație.

b) Pe proba de fluid seminal se determină:

- calitatea după aspect și culoare: optimă dacă aspectul este consistent și culoarea albă - crem; apoasă, cu tentă albăstrui, conține puțini spermatozoizi și este de proastă calitate.

- motilitatea la microscop (50-100x), înregistrarea și cronometrarea dinamicii spermatozoizilor în apă și aprecierea calității după o scară în 5 trepte propusă de Persov (1975). La contactul cu apa, spermatozoizii se activează, apar (15 sec) mișcări active, orientate, care treptat (după 60 sec) se încetinesc și sunt înlocuite de mișcări oscilatorii ale cozii spermatozoidului, din ce în ce mai slabe până la oprire.

- densitatea spermatozoizilor /mm³ după metoda clasică de numărare a celulelor

Este foarte important ca prelevarea lichidului seminal de la masculi să se facă fără orice urmă de apă, mai ales în cazul folosirii lui ulterioare (prin păstrare în seringile de prelevare la 4°C, pentru 12 ore, și în atmosferă de oxigen dacă se dorește stocarea ei pe o perioadă mai lungă, cca 2 săptămâni) deoarece o picătură de apă va compromite întregul lot extras.

Realizarea măsurătorilor fenotipice și meristice: Se fac măsurătorile de lungime, se înregistrează greutatea, se extrage prima radie din înotătoarea pectorală pentru determinarea vârstei. Se numără scuturile pe cele cinci rânduri (dorsal, ventrale, pectorale), se numără radiile din înotătoarele pereche. Cu ajutorul lor se vor determina:

- indicatori statistici (media, deviația, varianța, coeficientul de variație, etc.) pentru caracterile măsurate;
- indici și coeficienți tehnologici: indici de profil, circumferință, coeficient de îngășare, coeficient de fertilitate, raport gonosomatic (în anumite situații);

- asimetria fluctuantă – este o metodă care se bazează pe determinarea diferențelor fenotipice între structurile simetrice omoloage (diferențele dintre stânga și dreapta a structurilor bilaterale) ceea ce indică răspunsul dezvoltării indivizilor (care au același genotip) la condiții particulare de mediu.

Stimularea hormonală a maturării celulelor sexuale: Administrarea hormonilor gonadotropi se va face atunci când temperatura apei este optimă pentru reproducere, pentru fiecare specie în parte (12-14°C–morun, 17-23°C–păstrugă, 13-21°C–cegă).

- hipofiza de crap: 3,5-7 mg hipofiză de crap/kg masă corporală femelă (funcție de calitatea hipofizei);
- administrarea de hormon sintetic LH-RH_a 0,1 mg/kg masă corporală femelă.

Doza practică pentru stimularea femelelor este administrată, de regulă, în două trepte. Doza se stabilește în funcție de gradul de maturare al femelelor și de temperatura apei. Prima doză reprezintă 5-10% din cantitatea totală de hormon care trebuie administrat. Cu cât temperatura este mai ridicată cu atât se reduce doza. Intervalul dintre cele două injecții este de 12-24 de ore, în funcție de temperatura apei. După 500 grade ore controlul femelelor se face din 30 în 30 minute, minuțios (Patriche, 2001). În momentul când sunt verificate primele icre se verifică și intervalul de timp după care devin lipicioase după expunerea la apă. Un interval de 6-12 minute este acceptat pentru păstrugă indicând maturarea completă a icrelor. Dacă timpul este mai lung atunci poate fi o indicație a întârzierii ovulației, dacă este mai scurt – indică supramaturarea lor. La masculi cantitatea de hormon reprezintă 1/2 sau 1/3 din doza administrată femelelor, într-o singură doză, odată cu prima doză a femelelor.

Prelevarea/Colectarea gameților: Se realizează prin două proceduri.

- Procedura prin mulgere: se masează abdomenul femelelor în sens antero-posterior iar ovulele mature „curg” în recipientii de colectare. Sperma se colectează prin masarea abdomenului sau curbarea corpului masculului. Această metodă se practică în special la exemplarele de dimensiuni mai mici. Pentru exemplare mari colectarea spermei se realizează cu ajutorul unui tub, care se introduce 5 - 10 cm pe orificiul.

- Procedura prin practicarea intervenției chirurgicale: se practică o incizie locală în partea posterioară a abdomenului de la porul genital, de cca 5-7 cm (în funcție de talia exemplarului). Icrele sunt colectate progresiv, prin masarea ușoară a reproducătorului pe abdomen. După colectarea icrelor se realizează sutura incizei și se face tratament cu antibiotice.

Se va aprecia/estima prolificitatea absolută și relativă pentru fiecare femelă, prin numărarea ovocitelor dintr-un eșantion de icre cântărit (se va repeta pentru minim 3 eșantioane, obținând o medie), valoarea extrapolându-se la masa totală de icre extrasă și cântărită.

Fecundarea (separat pe specie): Ponta fiecărei femele de sturion se va împărți într-un număr de porții egal cu numărul de masculi și va fi fecundată separat doar cu sperma unui mascul, realizându-se o încrușișare multifactorială a reproducătorilor disponibili și apti pentru reproducere. În funcție de numărul de reproducători capturați (♀/♂) se va realiza o schemă multifactorială de încrușișare astfel încât rata de consangvinizare/generație să fie cât mai mică. Fertilizarea icrelor trebuie să se realizeze în maxim o oră de la colectarea lor.

O metodă folosită la fecundare este metoda semi-uscată care, se apreciază, reduce fenomenul de polispermie. Fiecare porție de ovule extrase de la femele se va fecunda cu sperma unui singur mascul diluată cu apă în proporție 1:200 preparată *extemporaneu* și imediat transvazată peste vasul cu icre, deoarece spermatozoizii au o activitate optimă, activă, pentru scurt timp după adăosul apei. Proporția de amestec recomandată este 1 kg icre la 2 litri de suspensie, în situația în care se folosește spermă de calitate, se amestecă ușor, se lasă timp de 3 -5 minute, după care se trece la desclierea icrelor.

O altă metodă folosită la fecundare este metoda uscată, în care porția de 200g icre se amestecă cu 2 ml spermă, se amestecă ușor adăugând 250ml apă. Se continuă amestecarea până când icrele devin adezive (cca 3 min). Se ia ca reper acest moment, când apar primele icre lipite. Un timp mai lung de pentru manifestarea adezivității icrelor de păstrugă după fertilizare indică o întârziere în ovulație iar unul prea scurt indică supramaturarea femelei.

Descleierea icrelor

Pentru această operație se utilizează o suspensie fină de nămol. Concentrația mълului trebuie să fie de așa natură ca icrele să nu plutească. La 1 kg de icre se adaugă, după scurgerea surplusului de lichid, a 4-5 l de suspensie. Întregul conținut al vasului se amestecă ușor cu mâna de 3-4 ori/minut. Treptat, la suprafața icrelor se atașează particule fine de nămol, care împiedică lipirea acestora de substrat sau între ele. Procesul de descleiere durează 20-30 de minute. Pentru îndepărtarea particulelor de nămol se adaugă treptat apă curată și se scurge surplusul, prin înclinarea vasului. Operațiunea de spălare se realizează până când se îndepărtează întreaga cantitate de nămol și o dată cu aceasta și substanțele cleioase de pe suprafața icrelor. În acest moment icrelor pot fi introduse în incubator. Operația este foarte importantă, descleierea insuficientă afectând succesul embriogenezei și obținerea unei rate mici a supraviețuirii.

Fecundare: Evaluarea succesului la fecundare se realizează după introducerea diferitelor loturilor de icre în incubatoare, la cca 8 ore după fecundare (stadiul cu 4 blastomere). Se extrag câte 100 de icre și se analizează la binocular procesul de embriogeneză, se numără icrele fecundate, nefecundate și polispermate și se determină procentul de fecundare.

Anomaliile cele mai frecvente sunt cauzate de:

- a. polispermia - segmentarea atipică a oului care determină o dezvoltare anormală sau moarte la eclozare;
- b. dereglarea procesului de gastrulație – apare în condiții neprielnice de temperatură sau la icrele de slabă calitate.

Monitorizarea parametrilor tehnologici

La sfârșitul experimentelor după ce peștii sunt evaluați biometric se calculează următorii parametri:

Sporul real de creștere [Sr] se calculează ca diferență între biomasa finală și biomasa inițială.

[Sr] = (Bf) – (Bi) [g], unde Bf - Biomasa finală; Bi - Biomasa inițială.

Ritmul zilnic de creștere [GR] – se determină prin raportarea diferenței dintre biomasa finală (Bf) și biomasa inițială (Bi) la timpul de creștere (t) exprimat în număr de zile.

[GR] = (Bf - Bi)/t [g/zi], unde t – număr de zile.

Factorul de conversie al hranei [FCR] – se calculează prin raportarea cantității de furaje distribuite la sporul de creștere al peștelui.

[FCR] = Q/Sr [g furaj/g spor biomasa], unde FCR – coeficient de conversie; Q – cantitate de furaje administrate; Sr – sporul real de creștere.

Rata specifică de creștere [SGR] – se determină conform relației:

[SGR] = 100 x (ln Bf - ln Bi)/t [%/zi]

Factorul de conversie al proteinei [PER] – se calculează cu ajutorul relației:

[PER] = Sr/F* Pb [g/g], unde Sr- spor de creștere (g); F – cantitatea de furaje ingerate (g);

Monitorizarea parametrilor hidrochimici

Deși mediul acvatic reprezintă un complex sistem de variabile, numai o parte din acestea joacă un rol decisiv în menținerea echilibrului fizico-chimic al apei de cultură. Parametrii critici sunt reprezentați de temperatură, solidele în suspensie, pH, concentrația oxigenului dizolvat, amoniac, nitriți, CO₂ și alcalinitate. Evoluția fiecărui parametru din lista celor enumerați anterior este importantă dar, în cele mai multe cazuri, interdependența dintre ei este cea care influențează starea de sănătate și ritmul de creștere a peștilor.

Aceste reacții afectează fiecare aspect al tehnologiei acvicole, de la rata de supraviețuire și rata de creștere până la performanța filtrării biologice și de eliminare a solidelor. Cunoașterea acestor reacții este esențială pentru succesul oricărei producții intensive. Pe parcursul experimentărilor, monitorizarea parametrilor fizico-chimici ai apei din sistemele recirculante se va face cu o frecvență variabilă în funcție de parametrul urmărit și, în situații limită, de condițiile tehnologice specifice.

Monitorizarea parametrilor fiziologici: Datele examenului hematologic sunt utilizate corelativ, pentru evaluarea stării fiziologice a organismului dar și pentru diagnosticul unor boli ale organelor hematopoietice. Examinarea seriei eritrocitare și leucocitare presupune recoltarea probelor biologice de sânge (cca. 0,5-2 ml, în funcție de talia peștelui). La pești există mai multe metode de recoltare a sângelui: puncție cardiacă – la pești de dimensiuni mari, puncție din vena caudală – la pești de diferite dimensiuni, tăierea pedunculului caudal – la pești de dimensiuni mici.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- Andras, R.L. (1995). Production of aquatic animals. World Animal Science, C8, Chapter 5, 95-108.
- Bacalbasa-Dobrovici N. (1997) Endangered migratory sturgeons of the lower Danube River and its Delta. In: (Edit.E.K. Balon) Environmental Biology of Fishes, 48 (1 – 4): 201- 207.
- Bharadwaj S., Pangle K.L., Sutton T.M., Brown P.B., 2008. Nitrogen Excretion in Fed and Fasted Lake Sturgeon, North American Journal of Aquaculture, 70:2,132-137

- Birstein V.J. & DeSalle R. (1998). Molecular phylogeny of Acipenserinae. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 9, 141-155.
- Brown W.M. (1985). The mitochondrial genome of animals. In: MacIntyre, R.J. (Ed.), *Molecular Evolutionary Genetics*. Plenum, New York, NY, pp. 95–130.
- Chen, S., Timmons, M.B., Aneshansley, D.J., Bisogni, Jr., J.J., 1993. "Suspended solids characteristics from recirculating aquacultural systems and design implications". *Aquaculture*, 112, 143-155.
- Ciolac A., Patriche N. 2004. Biological aspects of main marine migratory sturgeons in Romanian Danube River migration of fishes in Romania Danube River, *Applied Ecological and Environmental Research* 3 (2), pp. 101–106.
- Cristea V., Iorga V. (2011). State of the Sturgeon Stocks in the Danube River" *Journal of environmental protection and ecology (JEPE)*. 12 No4.
- Cristea V., Talpes M. *et al.* (2005). Creșterea sturionilor în sistem superintensiv recirculant. Ed. Didactica și Pedagogică, București, p. 287.
- Cristea, V., Grecu, I., Ceapă, C., 2002. „Ingenieria sistemelor recirculante din acvacultura”, Editura Didactica și Pedagogica, București; 342
- Dakin E.E. & Avise J.C. (2004). Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity* 93: 504–509.
- Ellegren H. (2000). Heterogeneous mutation processes in human microsatellite DNA sequences. *Nat. Genet.* 24: 400–402.
- Estoup A. & Angers B. (1998). Microsatellites and minisatellites for molecular ecology: theoretical and empirical considerations. In: Carvalho G, editor. *Advances in molecular ecology*. Amsterdam: IOS Press. p. 55–86.
- Gershanovich, A.D., Pototskij I.V., 1995. The peculiarities of non-faecal nitrogen excretion in sturgeons (Pisces; Acipenseridae) - Effects of water temperature, salinity and pH, *Comp. Biochem. Physiol.* 111A, 2, 313-317.
- Ghomi M., Shahriari R., Langroudi H, Mehdi N., Eric von Elert. 2012. Effects of exogenous dietary enzyme on growth, body composition, and fatty acid profiles of cultured great sturgeon *Huso huso* fingerlings *Aquacult Int.* 20:249–254
- Goldstein D.B., A.R. Linares, L.L. Cavalli-Sforza, M.W. Feldman. (1995). An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci. *Genetics* 139:463-471.
- Hansen M.M. (2003). Application of molecular markers in aquaculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 13: 405-413.
- Hensel K. & Holčík J. (1997): Past and current status of sturgeons in the upper and middle Danube. *Sturgeon biodiversity and conservation*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Jenneckens I., Meyer J.N., Hörstgen-Schwark G., May B. (2001). A fixed allele at microsatellite LS-39 is characteristic for the black caviar producer *Acipenser stellatus*. *Journal of Applied Ichthyology* 17: 39-42.
- Kamler E., 1992. Early life history of fish. An energetic approach. Chapman & Hall, Londra, pp. 266.
- Kapuscinski, A.R. & Miller, L.M. 2007. Genetic guidelines for fisheries management [online]. 2nd Edition. The University of Minnesota Sea Grant Program. www.seagrant.umn.edu/downloads/f22.pdf
- Kieffer J. D., Wakefield A. M., Litvak M.K., 2001. Juvenile sturgeon exhibit reduced physiological responses to exercise. *The Journal of Experimental Biology* 204, 4281–4289.
- Kiss J.B. (1997) *Cartea Deltei*. Editura Fundatiei Aves, Odorheiu Secuiesc.
- Kynard, B., Suci, R., Horgan, M. 2002. Migration and habitats of diadromous Danube River sturgeons in Romania: 1998-2000. *Proceedings of The 4th International Symposium on Sturgeon*, Oshkosh, WI, *J. Appl. Ichthyol.* 18: 529 - 535
- Lawson, T.B., 1995. *Fundamentals of Aquaculture Engineering*, Chapman & Hall, New York, pp. 355.
- Li W. (1997). *Molecular Evolution*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland MA.
- Liu V.W., Shi H.H., Cheung A.N., Chiu P.M., Leung T.W., Nagley P., Wong L.C., Ngan H.Y. (2001). High incidence of somatic mitochondrial DNA mutations in human ovarian carcinomas. *Cancer Res* 61: 5998–6001.
- Losordo, T. M., Masser, M., Rakocy, J., 1992. Recirculating aquaculture tank production systems: An overview of critical considerations, *Southern Regional Aquaculture Centre Publication* 451.
- Losordo, T.M. 2003, *Recirculating Aquaculture Systems: Planning and Managing for a Sustainable Future*. *Proceedings of a workshop at Deakin University, Warrnambool, 14-15 June, 2003*.
- Losordo, T.M., Hobbs, A.O. 2000, Using computer spreadsheets for water flow and biological filter sizing in recirculating aquaculture production systems. *Aquaculture Engineering* 23, pp. 95-102.
- Losordo, T.M., Westers H. 1994. System carrying capacity and flow estimation. In Timmons, M.B., Losordo, T.M. (Eds.), *Aquaculture Water Systems: Engineering Design and Management*. Elsevier, New York: 9-60
- Ludwig A., Debus L., Jenneckens I. (2002) A molecular approach for trading control of black caviar. *International Review of Hydrobiology* 87: 661-674.
- Manea, G. (1980). Sturionii (Acipenseridae) Taxonomie, Biologie, Sturionicultură și Amenajări sturionicole. *Ceres*.
- Năvodaru I., A. Constantinescu, I. Munteanu (1999). Reproducerea speciilor comerciale de pești de apă dulce în zona Deltei Dunării. *Analele Științifice ale Institutului Național de Cercetare-Dezvoltare Delta Dunării*, VII, pp. 159-164.
- Navodaru I., M. Staras & R. Banks (1999). Management of sturgeon stocks of the lower Danube River system. In: "The Delta's: State-of art protection and management". *Conference Proceedings, Tulcea, Romania 26-31 July 1999: 229-237*.
- Năvodaru I., Staras, M. & Banks, R. 1999. Management of sturgeon stocks of the lower Danube River system. In: Știucă & Nichersu (ed.): *The Deltas: State of art, protection and management*. *Conference Proceedings, Tulcea, 26-31 July 1999: 229-237*.

O'Brien S.J. (1991). Molecular genome mapping: lessons and prospects. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1, 105– 111.

O'Reilly P. & Wright J.M. (1995). The evolving technology of DNA fingerprinting and its application to fisheries and aquaculture. *J. Fish Biol.*, 47 (SupplA.): 29-55.

Oksiyuk, O. P., L. A. Zhuravlev, A. V. Lyashenko, I. Kh. Bashmakova, Yu. I. Karpezo, A. I. Ivanov (1992). Water pollution of the Danube River in the Ukraine: general indices. *Gidrobiologicheskii Zhurnal* 28: 3–11. (in Russian; English translation: *Hydrobiol. J.* 29: 1–10 (1993)).

P Jatteau, 1997. Daily patterns of ammonia nitrogen output of Siberian sturgeon *Acipenser baeri* (Brandt) of different body weights. *Aquaculture Research* Volume 28, Issue 7, pages 551–557,

Paraschiv, M., Suci, R., Suci, M. 2006. Present state of sturgeon stocks in the lower Danube River, Romania. In: *Proceedings 36th International Conference of IAD.Austrian Committee Danube Research / IAD, Vienna: 152 – 158*

Parker, E., Couturier, M., Benfey, T., 2002. Oxygen management at a commercial aquaculture farm producing Atlantic Salmon (*Salmo salar*) smolts. In: *Proceedings of the third International conference on recirculating aquaculture* (Editors) Libey, G.S., Timmons, M.B., Flick, G.J., Rakestraw, T.T., Sea Grant Publication VSG 00 09.

Patriche N., Gessner J., Wirth M., Kirschbaum F., Krüger A., (2002). Caviar composition in wild and cultured sturgeons – impact of food sources on fatty acid composition and contaminant load, *Journal of Applied Ichthyology* Volume 18, Issue 4-6, pages 665–672, 2002.

Randall D.J., Wright P.A., 1987. Ammonia distribution and excretion in fish. *Fish. Physiology and Biochemistry* vol. 3 no. 3 pp 107-120.

Secor, D., Gunderson T., 1998. Effects of hypoxia and temperature on survival, growth and respiration of juvenile Atlantic sturgeon, *Acipenser oxyrinchus*. *Fishery Bulletin* 96 : 603-613.

Steven D. Mims, Andrew Lazur, William L. Shelton, Boris Gomelsky, Frank Chapman, 2002, *Production of Sturgeon*, Southern Regional Aquaculture Centre Publication.

Suci R. (2008). Sturgeons of the NW Black Sea and Lower Danube River countries. At: *International Expert Workshop on CITES Non-Detriment Findings 17-22 November 2008, Cancun, Mexico.*

Suci Radu, Onăra Dalia, Paraschiv Marian, Holostenco Daniela, Iani Marian, Taflan Elena, Honț Stefan. 2011. Anadromous sturgeons species of the Lower Danube River system: status, monitoring and management. Oral presentation in „International Conference -Deltas and Wetlands”, Tulcea, 14–16 Sept 2011, <http://deltanet-project.eu/filemanagermodule/file/id/202/src/documents/>.

Summerfelt, S.T., Hochheimer, J.N., 1997. Review of ozone processes and applications as an oxidizing agent in aquaculture. *The Progressive Fish Culturalist* 59, pp. 94 – 105.

Tautz D. (1989). Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nuc. Acids Res.* 17: 6463-6471.

Thomas S.L., Piedrahita R.H., 1998. Apparent ammonia-nitrogen production rates of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) in commercial aquaculture systems. *Aquacultural Engineering* 17, 45-55

Timmons M., Thomas M. Losordo, 1994. *Aquaculture Water Reuse Systems: Engineering design and management. Developments in Aquaculture and Fisheries Science*, Elsevier, Vol. 27. 346 p.

Wright, J.M. 1993. DNA fingerprinting in fishes. In: *Biochemistry and Biology of Fishes*, Vol. 2 (ed. P.W. Hochachka, T.Mommsen), pp. 57-91. Elsevier, Amsterdam.

Zaitsev Yu.P. (1993) Impact of eutrophication on the Black Sea fauna. pp. 63–86. In: *Studies and Reviews* 64, Part 2. General Fisheries Council for the Mediterranean.

Zaitsev Yu. P. (1992) Ecological status of the Ukrainian zone of the Black Sea shelf: a survey. *Gidrobiologicheskii Zhurnal* 28: 3– 18 (in Russian; English translation: *Hydrobiol. J.* 29: 4–22 (1993)).

Zhuravleva L.A. & N.A. Grubina (1993). Phosphorus regime of the lower Danube and addition of phosphorus to the Black Sea. *Gidrobiologicheskii Zhurnal* 29: 81–88 (in Russian; English translation: *Hydrobiol. J.* 31: 92–101 (1995)).

OM MAPDR/MMGA nr. 262/330/2006 (MO nr. 385/04.05.2006) privind conservarea populațiilor de sturioni din apele naturale și dezvoltarea acvaculturii de sturioni din România <http://www.mmediu.ro/legislatie/biodiversitate.htm>

***WWF-Save the Danube Sturgeons. An action plan for the recovery, protection and conservation of endangered sturgeons in the Danube River Basin. 2011. http://wwf.panda.org/what_we_do/where_we_work/black_sea_basin/danube_carpathian/our_solutions/freshwater/danube_sturgeon/

***WWF-The sturgeons Danube's endangered flagship species. 2011. http://awsassets.panda.org/downloads/wwf_factsheet_sturgeons.pdf

PUBLICAȚII

ARTICOLE ISI

Andreea Dudu, Sergiu Emil Georgescu, Patrick Berrebi, Marieta Costache, 2012. Site heteroplasmy in the mitochondrial cytochrome b gene of the sterlet sturgeon *Acipenser ruthenus*. *Genetics and Molecular Biology*, Vol. 35(4), *in press*, <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-47572012005000058>.

L. Dediu, V. Cristea, A. Docan, 2012. Bioremediation of Recirculating Systems Effluents as a Method to Obtain High-quality Aquaculture Products. *Journal of Environmental Protection and Ecology*, Vol. 13(1), pp. 275-288.

ARTICOLE BDI

V. Cristea, Maria Desimira Dicu, Lorena Dediu, Marilena Măreanu, M.T. Coadă, 2012. The influence of feeding intensity on growth performance of *Acipenser stellatus* (Pallas 1771) juvenils. *Lucrări științifice – Seria Zootehnie*, Vol. 58(2), pp. 219-224.

Angelica Docan, Victor Cristea, Lorena Dediu, 2012. Effect of feeding with different dietary protein level on leukocytes population in juvenile Siberian sturgeon, *Acipenser baeri*, Brandt, *in press*, *Arhiva Zootehnică*.

PARTICIPĂRI LA CONFERINȚE

Andreea Dudu, Sergiu Emil Georgescu, Alexandru Burcea, Neculai Patriche, Marieta Costache – „Microsatellite DNA variation in the Russian Sturgeon, *Acipenser gueldenstaedtii* from the Lower Danube”, Annual Zoological Congress of “Grigore Antipa” Museum, Book of Abstracts, București, 21-23 Noiembrie 2012, p. 208.

Sergiu Emil Georgescu, Andreea Dudu, Iulia Elena Florescu, Neculai Patriche, Marieta Costache – „Analysis of the microsatellite variation in the Beluga sturgeon, *Huso huso* from the Lower Danube”, Annual Zoological Congress of “Grigore Antipa” Museum, Book of Abstracts, București, 21-23 Noiembrie 2012, p. 209.