



UNIUNEA EUROPEANA



**IOSUD – UNIVERSITATEA „DUNĂREA DE JOS” DIN GALAȚI**

**Școala doctorală de Științe fundamentale și ingineresti**

**Proiect cofinanțat din Fondul Social European Operațional Capital Uman 2014-2020**

## **TEZĂ DE DOCTORAT**

**INFLUENȚA COMPUȘILOR BIOACTIVI DIN SUPLIMENTELE ALIMENTARE ASUPRA PROCESELOR METABOLICE ALE ORGANISMELOR ACVATICE**

**Doctorand,  
NĂSTAC (GRĂDINARIU) Lăcrămioara**

**Conducător științific,  
Prof. dr. ing. VIZIREANU Camelia**

**Lucrare realizată în cadrul proiectului  
„Program pentru creșterea performanței și inovării în  
cercetarea doctorală și postdoctorală de excelență -  
PROINVENT”  
Contract nr: 62487/03.06.2022 POCU/993/6/13 - Cod SMIS:  
153299**

**Seria I 1 Biotehnologii Nr. 17**

**GALAȚI**

**2023**

**Lider: Parteneri:**





„Program pentru creșterea performanței și inovării în cercetarea doctorală și postdoctorală de excelență - PROINVENT”

IOSUD – UNIVERSITATEA „DUNĂREA DE JOS” DIN GALAȚI

Școala doctorală de Științe Fundamentale și Inginerești



# TEZĂ DE DOCTORAT

## INFLUENȚA COMPUȘILOR BIOACTIVI DIN SUPLIMENTELE ALIMENTARE ASUPRA PROCESELOR METABOLICE ALE ORGANISMELOR ACVATICE

Doctorand

NĂSTAC (GRĂDINARIU) Lăcrămioara

Președinte	Prof univ.dr.ing. Gabriela Elena BHRIM
Conducător științific,	Prof univ.dr.ing. Camelia VIZIREANU
Referenți științifici	Prof univ.dr.ing. Mona Elena POPA
	Prof univ.dr.ing. Adrian RIVIȘ
	Prof. univ. dr. ing. Lorena DEDIU

Seria I 1 Nr. 17

GALAȚI

2023

Lider:



Parteneri:



Seriile tezelor de doctorat susținute public în UDJG începând cu 1 octombrie 2013 sunt:

Domeniul fundamental ȘTIINȚE INGINERESTI

- Seria I 1: Biotehnologii
- Seria I 2: Calculatoare și tehnologia informației
- Seria I 3: Inginerie electrică
- Seria I 4: Inginerie industrială
- Seria I 5: Ingineria materialelor
- Seria I 6: Inginerie mecanică
- Seria I 7: Ingineria produselor alimentare
- Seria I 8: Ingineria sistemelor
- Seria I 9: Inginerie și management în agricultură și dezvoltare rurală

Domeniul fundamental ȘTIINȚE SOCIALE

- Seria E 1: Economie
- Seria E 2: Management
- Seria E 3: Marketing
- Seria SSEF: Știința sportului și educației fizice
- Seria SJ: Drept

Domeniul fundamental ȘTIINȚE UMANISTE

- Seria U 1: Filologie- Engleză
- Seria U 2: Filologie- Română
- Seria U 3: Istorie
- Seria U 4: Filologie - Franceză

Domeniul fundamental MATEMATICĂ ȘI ȘTIINȚE ALE NATURII

- Seria C: Chimie

Domeniul fundamental ȘTIINȚE BIOMEDICALE

- Seria M: Medicină
- Seria F: Farmacie

Axa prioritară 6- Educație și competențe

Titlul proiectului: „Program pentru creșterea performanței și inovării în cercetarea doctorală și postdoctorală de excelență - PROINVENT”

Contract nr: 62487/03.06.2022 POCU/993/6/13 - Cod SMIS: 153299

Punctele de vedere exprimate în lucrare aparțin autorului și nu angajează Comisia Europeană și Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați, beneficiara proiectului.

## Mulțumiri

Ar fi fost imposibilă elaborarea și fundamentarea științifică a acestei teze de doctorat fără îndrumarea și sprijinul unor oameni excepționali, admirabili care, prin devotament și competență profesională superioară, au contribuit la pregătirea mea ca cercetător, încurajându-mă, susținându-mă să merg cât mai departe:

**Doamnei Profesor Doctor Inginer CAMELIA VIZIREANU ,  
Conducător științific, Director de departament SAIABA al Facultății  
de Știința și Ingineria Alimentelor**

Aleasă recunoștință și mulțumire pentru profesionalismul desăvârșit, profund respect, siguranța și încrederea oferite, călăuzire, îngăduință deplină pe parcursul întregului stagiul doctoral, susținând considerabil, formarea mea profesională.

Îmi exprim gratitudinea față de membrii comisiei de îndrumare:

**Doamnei Profesor Doctor DANA TUTUNARU ,**  
Întreaga mea grațitudine și mulțumiri pentru îndrumarea și încrederea constantă pe tot parcursul stagiului doctoral, pentru sprijinul profesional și moral acordat pe tot parcursul perioadei de pregătire.

**Doamnei Profesor Doctor Inginer Lorena Dediu,  
Director științific al Centrului MoRAS**  
Aleasă considerație și mulțumiri, întreaga mea recunoștință pentru sprijinul necentenit acordat, îndrumarea constantă și efortul depus pe tot parcursul cercetărilor.

**Doamnelor Conferențiar Doctor Inginer Daniela Istrati, Oana  
Constantin, dr. ing. Mirela Crețu,**

Le mulțumesc pentru colaborarea deschisă, sprijinul și dirijarea oferite cu generozitate, străduința pe tot parcursul studiilor de cercetare, această teză de doctorat nu ar fi fost completă fără ajutorul considerabil acordat.

Mulțumesc distinșilor referenți oficiali:

**Prof.dr.ing. Mona Elena POPA, USAMV București  
Prof.dr.ing. Adrian RIVIȘ, USV Timișoara**

pentru disponibilitate și atenția cu care au analizat rezultatele cercetărilor prezentate în teză.

Cu deosebită dragoste dedic această teză fiicei mele Serena Maria care a fost tot timpul alături de mine , sprijinindu-mă moral, acordându-mi încredere completă și curaj.

Părinților și fraților mei le împărtășesc cu drag această bucurie și le mulțumesc pentru atenția și reazemul acordate în această etapă a vieții mele.

Mulțumesc **Centrului MoRAS** dezvoltat prin Grant POSCEE ID 1815, cod SMIS 48745 ([www.moras.ugal.ro](http://www.moras.ugal.ro)) pentru susținerea tehnică acordată.

Cu aleasă considerație,  
**Chim. Lăcrămioara NĂSTAC (GRĂDINARIU)**

## CUPRINS

Denumire	Pag. teza	Pag. rezum at
Lista abrevierilor	10	-
Introducere	11	7
<b>I. STUDIU DOCUMENTAR</b>	<b>16</b>	
<b>1. Provocări fiziologice ale organismele acvatice în contextul utilizării tratamentelor terapeutice sau expunerii la diferiți poluanți farmaceutici</b>	<b>17</b>	<b>-</b>
1.1.Efectul tratamentelor antihelmintice asupra parametrilor biochimici și a markerilor de stres oxidativ	22	-
1.2.Efectul unor poluanți farmaceutici asupra parametrilor biochimici și a markerilor de stres oxidativ	27	-
<b>2. Strategii nutriționale pentru stimularea imunității organismelor acvatice</b>	<b>33</b>	<b>-</b>
Referințe bibliografice	46	-
<b>II. PARTEA EXPERIMENTALĂ</b>	<b>58</b>	<b>9</b>
<b>3. Materiale și tehnici de lucru utilizate</b>	<b>59</b>	<b>9</b>
3.1. Materialul biologic și infrastructura de cercetare	59	9
3.2. Metodologia privind calculul indicatorilor de performanță creșterii	60	10
3.3. Determinarea indicilor somatici	60	10
3.4. Metode de lucru utilizate pentru evaluarea profilului hematologic	61	10
3.5. Metode de lucru pentru evaluarea parametrilor biochimici ai plasmei sangvine	63	11
3.5.1. Determinarea parametrilor serici	63	11
3.5.2. Determinarea activității lizozimului	63	12
3.6. Metode de analiză pentru determinarea parametrilor de stres oxidativ	64	12
3.6.1. Determinarea concentrației de malondialdehidă (MDA) (Ohkawa, 1979)	64	12
3.6.2. Determinarea capacității antioxidante totale (TAC) (Re, 1999 și Van Den Berg, 1999)	65	12
3.7. Metode de lucru folosite pentru determinarea compoziției biochimice a cărnii de pește	65	13
3.8. Metode de prelucrare statistică a datelor	66	13
Referințe bibliografice	67	13
<b>4. Cercetări privind influența uleiului de krill asupra performanței de creștere a puietului de crap, compoziției biochimice a cărnii și stării de confort tehnologic</b>	<b>68</b>	<b>14</b>
4.1. Introducere	68	14
4.2. Design experimental	70	15
4.3. Rezultate și discuții	71	17
4.3.1. Evaluarea performanței de creștere a puietului de crap	71	17
4.3.2. Evaluarea indicilor somatici și a compoziției biochimice a cărnii	73	19

*Lăcrămioara NĂSTAC (Grădinaru) - Influența compușilor bioactivi din suplimentele alimentare asupra proceselor metabolice ale organismelor acvatice, 2023*

4.3.3. Evaluarea parametrilor hematologici	74	20
4.3.4. Evaluarea parametrilor serici	76	22
4.3.5. Evaluarea stresului oxidativ, a capacității antioxidante și activității lizozimului	80	26
4.4. Concluzii	81	28
Referințe bibliografice	83	29
<b>5. Cercetări privind influența silimarinei și berberinei asupra performanței de creștere a puietului de crap, compoziției biochimice a cărnii și stării de confort tehnologic</b>	89	32
5.1. Introducere	89	32
5.2. Design experimental	90	32
5.3. Rezultate și discuții	91	35
5.3.1. Evaluarea performanței de creștere a puietului de crap	91	35
5.3.2. Evaluarea indicilor somatici și a compoziției biochimice a cărnii	94	38
5.3.3. Evaluarea parametrilor hematologici	95	39
5.3.4. Evaluarea parametrilor serici	100	44
5.3.5. Evaluarea stresului oxidativ, a capacității antioxidante și activității lizozimului	105	49
5.4. Concluzii	108	52
Referințe bibliografice	110	54
<b>Concluzii generale</b>	115	57
<b>Contribuții personale și perspective de continuare a cercetărilor</b>	116	58
<b>Diseminarea rezultatelor cercetărilor</b>	117	59
Anexa 1. Schema sistemului recirculant	119	-
Anexa 2. Listă tabele	120	-
Anexa 3. Listă figuri	121	-
Anexa 4. Listă fotografii originale	122	-

## Introducere

În contextul dezvoltării rapide a industriei acvaculturii, îmbunătățirea stării de imunitate a peștilor și eficiența acestora în combaterea și prevenirea îmbolnăvirilor devin aspecte tot mai importante.

Creșterea peștilor în sisteme intensive, cum este cazul sistemelor recirculante de acvacultură (RAS), favorizează înmulțirea și transmiterea agenților patogeni specifici, cum ar fi bacterii, virusuri, fungi și paraziți, care pot cauza boli grave și chiar mortalitatea în masă a acestora. În același timp, poluanții farmaceutici, cum ar fi antibioticele și substanțele chimice utilizate în tratarea și prevenirea bolilor, pot ajunge în mediul acvatic având un impact negativ asupra peștilor și a ecosistemelor acvatice.

În acest context, suplimentele alimentare reprezintă o soluție promițătoare, oferind o modalitate eficientă de a spori imunitatea peștilor și de a le consolida capacitatea de autoapărare împotriva patologieilor survenite, precum și împotriva efectelor dăunătoare ale poluanților farmaceutici. Prin administrarea acestor suplimente, se poate întări rezistența peștilor la diferiți agenți patogeni și la substanțele chimice dăunătoare, în timp ce se promovează starea generală de sănătate și creșterea optimă a peștilor.

Teza de doctorat intitulată „**Influența compușilor bioactivi din suplimentele alimentare asupra proceselor metabolice ale organismelor acvatice**” a vizat investigarea influenței unor suplimente alimentare asupra organismelor acvatice în contextul îmbunătățirii stării de imunitate și, evaluarea creșterii rezistenței acestor organisme după aplicarea unor tratamente medicamentoase, specifice unor boli parazitare sau după expunerea la anumiți poluanți farmaceutici. Totodată, s-a evaluat și influența suplimentelor alimentare asupra performanței de creștere și calității nutritive ale materialului biologic (Crap- *Cyprinus carpio*, Linnaeus 1758) a cărui hrană a fost suplimentată cu anumite suplimente alimentare.

Această cercetare își propune să ofere soluții practice și aplicabile, cu impact direct asupra performanțelor și eficienței acvaculturii. Astfel, fermierii vor putea implementa strategii mai eficiente și măsuri de prevenție, în vederea maximizării producțiilor finale, în contextul promovării unei acvaculturi durabile, sănătoase și ecologic responsabile.

Pentru atingerea scopului principal al tezei de doctorat, planul de lucru din programul de studiu doctoral a avut următoarele obiective științifice:

- ✚ *Evaluarea performanței de creștere a puietului de crap și a valorii nutritive a cărnii în urma aditivării hranei cu Ulei de Krill;*
- ✚ *Evaluarea stării de confort tehnologic a biomasei de cultură (crap) în urma aditivării hranei puietului de crap cu Ulei de Krill, prin analiza profilului hematologic, analiza biochimică a sângelui și analiza nivelului de stres oxidativ indus de creșterea peștilor în densități ridicate de stocare.*
- ✚ *Evaluarea efectului hepato-protector al uleiului de Krill după aplicarea unui tratament antihelmintic cu albendazol (ABZ).*



- ✚ *Evaluarea performanței de creștere a puietului de crap și a valorii nutritive a cărnii în urma aditivării hranei cu suplimentele alimentare selectate (silimarină și berberină).*
- ✚ *Evaluarea stării de confort tehnologic a biomasei de cultură (crap) în urma aditivării hranei puietului de crap cu silimarină (SM) și berberină (BBR), prin analiza profilului hematologic, analiza biochimică a sângelui și analiza nivelului de stres oxidativ indus de creșterea peștilor în densități ridicate de stocare.*
- ✚ *Evaluarea efectului hepatoprotector al suplimentelor alimentare selectate după aplicarea unui „test challenge” cu paracetamol.*

Teza de doctorat este structurată în două părți:

**I. STUDIUL DOCUMENTAR** format din 2 capitole, în care sunt prezentate informații recente din literatura de specialitate privind provocările fiziologice ale organismelor acvatice în contextul utilizării unor tratamente terapeutice sau al expunerii la diferiți poluanți farmaceutici, precum și strategii nutriționale utilizate în acvacultură pentru stimularea imunității organismelor acvatice.

**II. PARTEA EXPERIMENTALĂ** cuprinde rezultatele experimentelor efectuate în timpul stagiului doctoral și este structurată în 4 capitole, după cum urmează:

Capitolul 3, intitulat „**Materiale și tehnici de lucru utilizate**”, prezintă infrastructura de cercetare, metodologia de lucru, precum și echipamentele utilizate pentru realizarea activității experimentale.

Capitolul 4, intitulat “**Cercetări privind influența uleiului de Krill asupra performanței de creștere, compoziției biochimice și stării de sănătate la *Cyprinus carpio***”, prezintă rezultatele obținute în urma aditivării hranei crapului cu ulei de krill, asupra performanței de creștere și a indicilor organosomatici, a profilului hematologic și a unor markeri de stres oxidativ. Totodată în cadrul capitolului este prezentat și efectul hepatoprotector al uleiului de krill, în condițiile aplicării unui tratament antihelmintic.

Capitolul 5, intitulat “**Cercetări privind influența silimarinei și berberinei asupra performanței de creștere, compoziției biochimice și stării de sănătate la *Cyprinus carpio***”, prezintă rezultatele obținute în urma aditivării hranei crapului cu silimarină și berberină, asupra performanței de creștere și a indicilor organosomatici, a profilului hematologic și a unor markeri de stres oxidativ. Totodată în cadrul capitolului este prezentat și efectul hepatoprotector al aditivilor alimentari selectați în condițiile aplicării unui “test challenge” cu paracetamol.

Capitolul 6, intitulat „**Concluzii generale**”, prezintă principalele concluzii obținute în urma experimentelor care au avut ca scop testarea în hrana puietului de crap a unor suplimente alimentare, în vederea îmbunătățirii performanței de creștere și stării imunitare.

Teza de doctorat cuprinde 122 de pagini, în care sunt incluse 33 de figuri și 25 de tabele. Studiul documentar reprezintă 33% și partea experimentală 67%.

### 3. Materiale și tehnici de lucru utilizate pentru realizarea activităților experimentale

#### 3.1. Materialul biologic și infrastructura de cercetare

Materialul biologic folosit în cadrul experimentelor a fost reprezentat de puiet de crap (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758), ce a fost procurat de la o fermă locală și transportat la Stația pilot de Sisteme Recirculante, Universitatea Dunărea de Jos, Galați. Anterior stocării materialului biologic în unitățile de creștere ale sistemului recirculant, au fost examinate aleatoriu un număr de 7 exemplare sub aspect clinic și anatomopatologic. Scopul examinării a fost acela de a depista prezența eventualilor agenți infecțioși și parazitari care, prin potențialul acestora de declanșare a unor îmbolnăviri, ar fi putut periclita desfășurarea experimentelor.

Cercetările experimentale au fost realizate în cadrul Centrului Român pentru Modelarea Sistemelor Recirculate de Acvacultură (MoRAS, <http://moras.ugal.ro/>), Universitatea "Dunărea de Jos" din Galați, România. Astfel, baza materială a fost compusă din stația pilot sistem recirculant de acvacultură (RAS), precum și de laboratoarele de Fiziologie și Nutriție din cadrul Centrului MoRAS.

Sistemul recirculant (RAS) a fost conceput astfel încât să asigure un tratament adecvat a apei tehnologice și, implicit bunăstarea biomasei piscicole. Schema de flux include o secvență bine gândită de componente repartizate pe două niveluri (subsol, parter). Există *componente principale* (1), precum: unitățile de creștere (24 bazine de 1m<sup>3</sup>, 109 cm diametru), filtru mecanic, filtru biologic, echipamente pentru transferul gazelor dizolvate (degazare dioxid de carbon, injectare oxigen și contactori), sisteme de dezinfecție cu radiații UV, pompe, echipamente de monitorizare și control al calității apei, dar și *componente auxiliare* (2), precum: alimentatoare automate, generator de ozon, un generator electric independent (Anexa 1, Foto 3.1).



**Foto 3.1.** Sistemul recirculant folosit în cadrul derulării experimentelor (foto original)

La finalul fiecărui experiment s-au realizat teste de rezistență. Pentru desfășurarea în bune condiții a testelor, peștii au fost mutați într-un sistem experimental cu 12 acvarii de sticlă de 130 L (Foto 3.2.).



Foto 3.2. Sistemul recirculant folosit pentru aplicarea testelor de rezistență (foto original)

### 3.2. Metodologia privind calculul indicatorilor de performanță a creșterii

La finalul perioadelor experimentale, materialul biologic a fost cântărit în vederea calculării următorilor parametri de creștere:

- **Sporul real de creștere** [Sr],
- **Rata specifică de creștere** [SGR]
- **Factorul de conversie al hranei** [FCR]
- **Factorul de conversie al proteinei** [PER]

### 3.3. Determinarea indicilor somatici

La finalul fiecărei perioade experimentale, șase pești din fiecare bazin au fost eșanționați, cântăriți individual și sacrificați. Organele interne (ficat, viscere, inimă, splină) au fost cântărite pentru calcularea indicilor corporali folosind următoarele formule:

- **Indicele hepatosomatic** (HSI, %)
- **Indicele somatic visceral** (VSI, %)
- **Indicele spleno-somatic** (SSI, %)
- **Indicele cardio-somatic** (CSI, %)

### 3.4. Metode de lucru utilizate pentru evaluarea profilului hematologic

Recoltarea probelor de sânge s-a realizat prin metoda puncției caudale, o tehnică utilizată pe scară largă pentru investigarea sănătății și fiziologiei organismelor acvatice. Anterior prelevării probelor de sânge peștii au fost anesteziați în baie de apă cu 2- phenoxyethanol (0.7 mL/L) (Shualei și colab., 2012).

Sângele a fost prelevat cu seringi sterile și a fost transferat în tuburi Eppendorf. Tuburile cu probele de sânge au fost ținute pe gheață până când au fost transferate în laborator pentru analizele ulterioare. Fiecare probă prelevată a fost împărțită în două tuburi Eppendorf: o parte a fost transferată într-un tub Eppendorf steril de 2 ml cu anticoagulant (Heparină) pentru analizele hematologice, în timp ce a doua parte a fost transferată într-un tub Eppendorf folosit pentru separarea serului. Serul a fost obținut prin centrifugarea sângelui la 3500 rpm, timp de 10 minute și a fost utilizat pentru analize biochimice ulterioare.

*Determinarea concentrației de hemoglobină (Hb, g/dL), s-a realizat prin metoda cianmethemoglobinei folosind reactivul lui Drabkin (DIALAB, Wiener Neudorf, Austria) pentru a transforma hemoglobina din sânge în methemoglobină stabilă (Hesser, 1960). Extincția probelor s-a citit la o lungime de undă de 540 nm față de reactivul Drabkin (martor), folosind spectrofotometrul Specord 210 UV-Vis (Analytic Jena, Jena, Germania).*

*Determinarea hematocritului (Ht, %), s-a realizat folosind metoda microhematocritului. În acest sens, 30  $\mu$ L sânge a fost introdus în capilare de microhematocrit, apoi centrifugate la 12000 rpm timp de 5 minute, cu ajutorul unei microcentrifuge HETTICH MIKRO 120 (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Germania). După centrifugare s-a citit pe nomogramă raportul dintre elementele figurate și plasma sanguină.*

*Determinarea numărului de globule roșii (RBC  $\times 10^6/mm^3$ ) s-a efectuat utilizând lichid de diluție Vulpian, pregătit în laborator din citrat de sodiu, iodură de potasiu și iod metalic (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SUA), camera de numărat Neubauer și pipeta Potain pentru eritrocite. Pentru numărarea eritrocitelor s-a folosit microscopul ZEISS-AXIO IMAGER (Zeiss International, Thornwood, NY, USA) la o magnitudine de 10 oc.  $\times$  40 ob.*

*Determinarea constantelor eritrocitare, reprezentate de volumul eritocitar mediu (VEM,  $\mu m^3$ ), hemoglobina eritocitară medie (HEM, pg) și concentrația în hemoglobină eritocitară medie (CHEM, g Hb/100 mL) s-a realizat folosind formulele de calcul descrise de Ghergariu, 1985.*

*Volumul eritocitar mediu (VEM) reprezintă volumul mediu al eritrocitului*

### **3.5. Metode de lucru pentru evaluarea parametrilor biochimici ai plasmii sanguine**

#### **3.5.1. Determinarea parametrilor serici**

Determinarea parametrilor serici s-a realizat cu ajutorul analizorului chimic VetTest® IDEXX (Foto 3.6.), folosind kituri IDEXX VetTest compatibile (IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, ME, USA).

Astfel, s-a determinat: albumina (ALB, g/dl), globulina (GLOB, g/dl), proteina serică totală (TP, g/dl), glucoza (GLU, mg/dl), alanina aminotransferaza (ALT, U/L), aspartat aminotransferaza (AST, U/L), fosfataza alcalină (ALP, U/L), Gamma glutamiltransferaza (GGT, U/L), concentrațiile de bilirubină directă (BIL D, mg/dL), colesterolul (CHOL, mg/dL), lipoproteinele de înaltă densitate (HDL, mg/dL), lipoproteinele de joasă densitate (LDL, mg/L) și trigliceridele (TG, mg/dL).



**Foto 3.6.** Analizorul chimic VetTest® și kituri compatibile pentru determinarea parametrilor serici (foto original)

### 3.5.2. Determinarea activității lizozimului

Lizozimul (LZM, U/mL) este una dintre numeroasele proteine antimicrobiene asociate cu prima barieră a imunității înăscute la pești. Această enzimă (muramidaza) rupe legătura  $\beta$ -1,4 glicozidică dintre acidul N-acetilmuramic și N-acetilglucozamină din peretele celular al bacteriilor gram pozitive și, în asociere cu componentele complementului, poate afecta și bacteriile gram negative (Paulsen și colab., 2001). Activitatea enzimatică a proteinei poate fi găsită în mucus, ser, icre, splină, ficat, piele, mucus, branhii, mușchi și poate fi afectată de diverși factori stresori (Bowden 2008; Bulut și colab., 2012).

*Principiul metodei.* Activitatea lizozimului s-a determinat din ser folosind protocolul de lucru pentru determinarea enzimatică a lizozimului de la Sigma (Sigma, EC 3.2.1.17).

*Reactivi și aparatură necesare:* i) soluție tampon de fosfat de potasiu; ii) substrat de *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma, M3770); iii) soluția enzimatică de lizozim (Sigma, L6876); iii) pH metru WTW InoLab 7110, Xylem Analytics Germany Sales GmbH & Co. K, Germany; v) agitator magnetic FALC, FALC Instruments, Italy; vi) spectrofotometru UV Vis SPECORD 210 Analytikjena 250.

### 3.6. Metode de analiză pentru determinarea parametrilor de stres oxidativ

#### 3.6.1. Determinarea concentrației de malondialdehidă (MDA)

(Ohkawa, 1979)

Malondialdehida (MDA) reprezintă indicatorul peroxidării lipidelor membranare, și este adesea măsurată prin indicele de peroxidare a lipidelor. Ca și la celelalte organisme vertebrate superioare, peroxidarea lipidelor la pești rezultă din oxidarea acizilor grași nesaturați, fiind cel mai important indicator al stresului oxidativ în componentele celulare (Ateș și colab., 2016).

*Principiul metodei.* În reacția de testare TBA, o moleculă de MDA reacționează cu două molecule de TBA cu producerea unui pigment roz având un maxim de absorbție la 532-535 nm.

*Reactivi și aparatură necesare:* i) soluție de TCA 10%; ii) soluție de TBA 1%; iii) 1 mM stock solution 1,1,3,3, tetraethoxypropane (TEP); iv) acid sulfuric 1 %; eprubete de sticlă de 10 mL, vârfuri și micropipete; v) agitator magnetic FALC, FALC Instruments, Italy vi) baie de apă SONICA®, Soltec, Soluzione, Italy; vii) spectrofotometrul UV Vis SPECORD 210 Analytikjena 250.

#### 3.6.2. Determinarea capacității antioxidante totale (TAC)

Determinarea capacității antioxidante totale (TAC) s-a efectuat prin metoda descrisă de Re, 1999 și Van Den Berg, 1999. Metodă utilizează ABTS (2,2'-azinobis 3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid), ce măsoară abilitatea antioxidantilor de a transforma radicalul cationic colorat ABTSO+

(2,2-azinobis 3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate) în formă neradicalică incoloră.

**Reactivi și aparatură necesare:** i) Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid) (Sigma) – antioxidant standard; ii) ABTS (2,2'-azinobis 3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (Sigma); iii) persulfat de potasiu  $K_2S_2O_8$  (Sigma); iiiii) soluție salină de tampon fosfat PBS, pH 7,4).

### 3.7. Metode de lucru folosite pentru determinarea compoziției biochimice a cărnii de pește

După cântărirea organelor, tegumentul și oasele peștilor au fost îndepărtate, iar din țesutul muscular s-au efectuat determinările biochimice. Analizele compoziției biochimice au fost efectuate utilizând metodele standard AOAC, 1997.

**Substanța uscată** a fost determinată prin uscarea probelor până la o greutate constantă la  $105 \pm 0.5$  °C timp de 24 de ore într-un cuptor cu convecție (Jeio Tech, Jeio Tech Co., Inc, Coreea).

**Conținutul de lipide (%)** a fost analizat prin metoda de extracție Soxhlet folosind eter de petrol ca solvent (Gerhardt GmbH & Co. KG, Germania).

**Conținutul de cenușă (%)** a fost determinat prin calcinarea probelor de țesut muscular la  $525 \pm 25$  °C, până la masă constantă. S-a folosit cuptorul de calcinare tip Nabertherm, Applied Scientific Instruments Co., Ltd. Thailanda).

**Conținutul de proteine brute (%)** a fost determinat folosind metoda Dumas, prin arderea probelor uscate la 1100°C (Primacs SNC 100, Skalar Analytical B.V., Olanda).

**Carbhidrații totali** au fost calculați după cum urmează: carbhidrați totali % = 100 - (Umiditate % + Proteină brută % + Lipide % + Cenușă %).

### 3.8. Metode de prelucrare statistică a datelor

Analizele statistice au fost efectuate cu ajutorul software-ului SPSS pentru Windows, versiunea 21.0 (Statele Unite, Chicago, SPSS Inc.). Datele experimentale au fost analizate prin folosirea *testului t* și ANOVA. Înainte de analizele statistice, atât normalitatea, cât și omogenitatea varianței au fost confirmate prin testele Shapiro-Wilk și, Levene. Analiza ANOVA a fost urmată de un test post-hoc Duncan atunci când au fost detectate diferențe semnificative. Testul dependent *T* a fost utilizat pentru a compara diferența medie. Nivelul de semnificație a fost stabilit la  $p < 0,05$  pentru toate analizele.

**Toate experimentele au fost efectuate cu permisiunea Comitetului de Etică al Universității Dunărea de Jos din Galați (RF2458/25.06.2021).**

### Referințe bibliografice selective capitol

1. Shaluei, F.; Hedayati, A.; Jahanbakhshi, A.; Baghfalaki, M. Physiological Responses of Great Sturgeon (*Huso huso*) to Different Concentrations of 2-Phenoxyethanol as an Anesthetic. *Fish Physiol. Biochem.* **2012**, *38*, 1627.

- Hesser, E.F. Methods for routine fish hematology. *Progress. Fish Cult.* **1960**, 22, 164
- Paulsen SM, Engstad RE, Robertsen B. Enhanced lysozyme production in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) macrophages treated with yeast beta-glucan and bacterial lipopolysaccharide. *Fish Shellfish Immunol.* **2001**, 11(1):23.
- Bowden, T.J. Modulation of the immune system of fish by their environment. *Fish Shellfish Immun.* **2018**, 25(4):373-383. doi: 10.1016/j.fsi.2008.03.017
- Bulut, C., Kubilay, A., Akçimen, U., Ceylan, M. The Effects on Cortisol, Glucose and Lysozyme Activity in Different Concentration of Formaldehyde in Rainbow Trout. *Journal of Fisheries Sciences.* **2012**, 6 (4): 321-330. doi: 10.3153/jfsc.com.akdeniz006
- Ateş, M., Sahilli, Y.C., Korkmaz, V. Determination of the Level of Malondialdehyde Forming as a Result of Oxidative Stress Function in Fish. *International Journal of Science and Research (IJSR)*, **2016**, 133.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Tagi, K. Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction. *Analytical Chemistry*, **1979**, 95: 351.
- Re, R., Pellegrini, R., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., *Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, Free Radical Biology and Medicine*, **1999**, Volume 26, p. 1231.
- Van Den Berg, R., Haenen, G.R., Van Den Berg, H., Bast, A., Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurement of mixtures, *Food Chemistry*, **1999**, Vol. 66, p. 511.
- AOAC Official method 991.36; Fat (Crude) In Meat & Meat products Solvent Extraction (Submersion) Method. 1997.
- <http://moras.ugal.ro/>

#### **4. Cercetări privind influența uleiului de Krill asupra performanței de creștere, compoziției biochimice și stării de sănătate la *Cyprinus carpio***

##### **4.1. Introducere**

În sistemele de acvacultură intensivă, eficiența economică este influențată de producția unitară, ce depinde de performanța de creștere a peștilor și de nivelul densității de populare. Densitățile ridicate de populare reprezintă un factor cronic de stres responsabil pentru reacțiile fiziologice survenite, periclitând astfel homeostazia și sănătatea peștilor (Yarahmadi și colab., 2016). Principalul corticosteroid declanșat de stresul generat de densitățile mari este cortizolul care, la concentrații mari în sânge crește, inducând acțiuni imunosupresoare și catabolice (Barton, 2002). Prin urmare, sunt afectate parametrii imunitari umorali (Liu și colab., 2019), metabolismii serici (valorile osmolarității, albuminei și globulinei), parametrii hepatici, metabolismul lipidic (Jia și colab., 2022).

Așadar, practicarea unor densități prea mari de populare poate conduce la creșterea stresului în rândul biomasei piscicole și, prin urmare, la creșterea



susceptibilității la îmbolnăvire (Montero și colab., 1999; Swain și colab., 2022). În acvacultură, impactul cauzat de apariția bolilor poate fi fatal, conducând la pierderi economice semnificative datorită reducerii eficienței producției cauzate de mortalitățile ridicate. În acest context, determinarea densităților optime de populare pentru fiecare specie reprezintă un aspect important pentru maximizarea producțiilor finale.

Pentru a contracara efectele negative induse de densitățile ridicate practicate în sistemele de producție intensivă, studiile actuale sunt orientate către implementarea de noi soluții pentru a crește răspunsul imunitar al peștilor la diferiți factori de stres.

În acest sens, principala abordare este cea nutrițională, vizând în principal aditivarea hranei cu diverși compuși antioxidanți, cum ar fi plantele medicinale și extracte ale acestora (Sahin și colab., 2014; Adineh și colab., 2021), uleiuri esențiale (De Freitas Souza și colab., 2019; Shourbela și colab., 2021) sau alți aditivi alimentari funcționali (Hoseini și colab., 2021).

În paralel cu preocupările cercetătorilor pentru dezvoltarea unor surse alternative de proteine și lipide continuă să existe un interes deosebit și pentru dezvoltarea unor alternative la mijloacele tradiționale de combatere a bolilor. În acvacultură, bolile provocate de paraziți pot produce daune majore, cauzând la o producție excesivă de mucus la nivelul tegumentului și al branhiilor, hiperplazia, și necroza branhială (Tavares-Dias et al. 2021).

Bolile de origine alimentară care sunt provocate de paraziții helminți ce se transmit prin consumul de produse din pește reprezintă o problemă majoră de sănătate publică.

*În contextul celor expuse anterior, acest studiu și-a propus să evalueze efectele suplimentării hranei puietului de crap cu ulei de krill asupra performanței de creștere, indicilor somatici și compoziției biochimice. Totodată s-a dorit evaluarea posibilului potențial al KO de a atenua stresul impus de densitățile ridicate de populare, cât și acțiunea hepato-protectoare după tratamentul antihelmintic cu ABZ.*

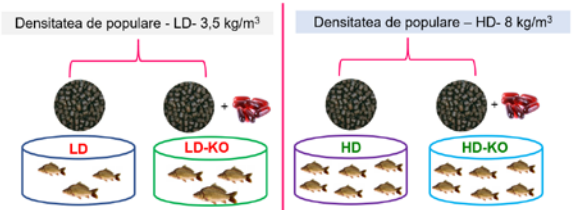
## **4.2. Design experimental**

Puietul de crap (*Cyprinus carpio*) a fost achiziționat de la o fermă locală. Timp de două săptămâni materialul biologic a fost stocat într-un bazin de carantină (bazin Ewos, dimensiuni 1,4×1,4×0,6 m). În această perioadă peștii au fost hrăniți cu un furaj din gama Skretting cu un conținut de 43% proteină brută, 12% lipide, 4% fibre, 6% cenușă (Skretting, Vignetto, Italia).

După perioada de aclimatizare, un număr total de 300 de pești (masa medie individuală de 113,58 ± 11,09 g) au fost repartizați în 12 bazine, cu un volum de apă 500 L, pentru a crea patru grupuri experimentale, în triplicat, astfel (Figura 4.1.):

- LD - densitatea de stocare de 3,5 kg/m<sup>3</sup>;
- LD-KO - densitatea de stocare de 3,5 kg/m<sup>3</sup>;
- HD - densitatea de stocare de 8 kg/m<sup>3</sup>;
- HD-KO - densitatea de stocare 8 kg/m<sup>3</sup>.





**Figura 4.1.** Schema Design-ului experimental

Pentru loturile experimentale LD-KO și HD-KO, hrana a fost suplimentată cu 5 g/kg KO (conținând 500 mg de ulei de krill pur, 200 mg de fosfolipide, 90 mg de acizi grași Omega-3 (EPA/DH) și 400 μg de astaxantină). Pentru încorporarea uleiului, furajul a fost măcinat, apoi amestecat cu uleiul specificat, după care a fost transformat sub formă de pelete (diametrul de 2 mm). După ce au fost uscate, peletele au fost transferate în pungi de plastic și depozitate la frigider până la hrănire. Peștii au fost hrăniți cu dietele menționate mai sus în decurs de 60 de zile. Hrana a fost administrată manual pentru a evita concurența la hrană, intensitatea hrănirii a fost de 2% din biomasa corporală.

Fotoperioada a fost de 16 ore de lumină și 8 ore de întuneric. Biomasa din fiecare unitate de creștere a fost cântărită săptămânal pentru a ajusta cantitatea de hrană.

Pe toată durata cercetărilor experimentale, parametri de calitate ai apei au fost monitorizați zilnic. Temperatura apei, pH-ul, oxigenul dizolvat au fost măsurate automat cu ajutorul sistemului de monitorizare Endress+Hauser (Endress+Hauser AG, Elveția) prin intermediul sondelor plasate în fiecare bazin de creștere, în timp ce concentrațiile compușilor azotului au fost cuantificate săptămânal cu un analizor Skalar SAN++, Skalar Analytical, Olanda.

Astfel, analiza statistică a principalilor parametri fizico-chimici ai apei nu au evidențiat diferențe semnificative ( $p > 0,05$ ) între variantele experimentale descrise, fiind încadrate în ecartul optim recomandat de literatura de specialitate pentru creșterea crapului (Goran și colab., 2016). Astfel, valorile medii înregistrate au fost: temperatura  $22,4 \pm 2,04$  °C; pH =  $7,25 \pm 1,24$ ; oxigenul dizolvat  $7,56 \pm 1,23$  mg L-1; amoniu  $0,16 \pm 0,19$  mg L-1; nitrații < 0,20 mg L-1; și nitriții < 0,010 mg L-1.

După 60 de zile experimentale, 7 pești din fiecare variantă experimentală au fost selectați randomizat pentru tratamentul cu albendazol (ABZ). Prin urmare, peștii au fost mutați într-un sistem experimental cu 12 acvarii de sticlă de 130 L. Pentru tratamentul cu ABZ, s-a folosit soluție de ABZ 10% (100 mg/ml suspensie orală) (Dopharma, România). Doza a fost administrată pe cale orală (5 mg ABZ/kg greutate corporală) cu ajutorul unei seringi la capătul căruia are atașat un furtun. Administrarea tratamentului cu ABZ s-a făcut timp de 7 zile consecutiv.

### 4.3. Rezultate și discuții

#### 4.3.1. Evaluarea performanței de creștere a puietului de crap

La debutul experimentului, masa individuală medie pentru cele patru variante experimentale a fost de  $119,27 \pm 10,22$  g pentru lotul LD,  $117,47 \pm 11,02$  g pentru lotul LD-KO,  $112,97 \pm 12,42$  g pentru lotul HD, respectiv  $114,14 \pm 12,56$  g pentru lotul HD-KO, nefiind înregistrate diferențe statistice între cele patru variante experimentale (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Tabelul 4.1).

La finalul perioadei experimentale, rata de supraviețuire a crapului a fost de 100%, în toate loturile, prin urmare, se poate concluziona că densitățile de populare din experimentul nostru sunt optime pentru creșterea crapului.

**Tabelul 4.1.** Indicatorii de performanță tehnologică ai puietului de crap după 60 de zile experimentale

Parametrii de creștere	Variantele experimentale			
	LD	LD-KO	HD	HD-KO
Biomasa inițială (g)	$1789 \pm 10,41^a$	$1762 \pm 9,96^a$	$3954 \pm 12,15^b$	$3995 \pm 10,42^b$
Biomasa inițială ( $\text{kg}/\text{m}^3$ )	$3,58 \pm 0,52^a$	$3,52 \pm 0,36^a$	$7,91 \pm 0,22^b$	$7,99 \pm 0,31^b$
Numărul inițial de pești	15	15	35	35
Masa medie inițială (g)	$119,27 \pm 10,22^a$	$117,47 \pm 11,02^a$	$112,97 \pm 12,42^a$	$114,14 \pm 12,56^a$
Supraviețuire a (%)	100	100	100	100
Biomasa finală (g)	$3865 \pm 30,16^a$	$3969 \pm 29,23^a$	$7742 \pm 41,17^b$	$7965 \pm 37,65^c$
Biomasa finală ( $\text{kg}/\text{m}^3$ )	$7,73 \pm 0,09^a$	$7,94 \pm 0,06^a$	$15,48 \pm 0,08^b$	$15,93 \pm 0,05^b$
Masa medie finală (g)	$257,67 \pm 28,12^a$	$264,60 \pm 26,70^a$	$221,2 \pm 33,64^b$	$227,57 \pm 34,62^b$
Sporul de creștere al biomasei (g)	$2076 \pm 32,26^a$	$2207 \pm 28,16^b$	$3788 \pm 36,12^c$	$3970 \pm 41,12^d$
Sporul individual de creștere (g)	$138,40 \pm 12,16^a$	$147,13 \pm 15,42^a$	$108,23 \pm 10,56^b$	$113,43 \pm 11,21^b$
SGR (% day <sup>-1</sup> )	$1,28 \pm 0,05^a$	$1,35 \pm 0,05^a$	$1,12 \pm 0,10^a$	$1,15 \pm 0,09^a$
FCR (g/g)	$1,06 \pm 0,02^a$	$0,95 \pm 0,01^a$	$1,32 \pm 0,03^c$	$1,21 \pm 0,04^b$
PER (g)	$2,19 \pm 0,07^b$	$2,44 \pm 0,04^b$	$1,76 \pm 0,11^a$	$1,93 \pm 0,08^a$

Valorile reprezintă media  $\pm$  S.E. ( $n = 3$ ). Valorile cu litere diferite într-un rând indică diferențe semnificative (ANOVA,  $p < 0,05$ ) între variantele experimentale. SGR- Rata specifică de creștere; FCR- Factorul de conversie al hranei; PER -Factorul de conversie al proteinei.

După 60 de zile de hrănire, masa medie finală a peștilor, precum și sporul de creștere individual au fost semnificativ mai mari ( $p < 0,05$ ) pentru

loturile ce au fost stocate la o densitate mai mică, cu valori mai bune în cazul grupurilor LD-KO, în timp ce greutatea finală a peștilor din loturile cu densitate mai mare a fost semnificativ  $p < 0,05$  mai mică.

La finalul experimentului, densitatea de stocare a fost de  $7,73 \pm 0,09$  kg/m<sup>3</sup> în LD și  $7,94 \pm 0,06$  kg/m<sup>3</sup> în LD-KO, și  $7,91 \pm 0,22$  kg/m<sup>3</sup> în HD, respectiv  $7,99 \pm 0,31$  kg/m<sup>3</sup> în HD-KO.

FCR s-a situat în intervalul 0,95-1,32 g/g, prezentând valori semnificativ ( $p < 0,05$ ) mai bune în grupurile cu densități mai mici de populare. În plus, rata de creștere specifică a fost semnificativ mai bună ( $p < 0,05$ ) pentru peștii din loturile experimentale cu densitate mai scăzută și hrăniți cu KO (0,95 g/g) decât pentru peștii stocați în densități mai ridicate. De asemenea, adăugarea de KO în dieta crapului a îmbunătățit valorile raportului de eficiență proteică (PER), valori mai bune fiind înregistrate la peștii din densitatea mai mică de stocare.

În studiul de față, atât densitatea de stocare, cât și aditivarea hranei cu KO au influențat în mod semnificativ eficiența utilizării nutrienților, precum și parametrii de creștere. Performanța de creștere a fost superioară în cazul peștilor din loturile LD-KO, urmată de loturile HD-KO, KO îmbunătățind semnificativ indicatorii tehnologici obținuți.

Rezultatele noastre sunt similare cu cele raportate de alți autori (Yoshitomi și colab., 2006; Hansen și colab., 2011; Kousoulaki și colab., 2013), care au afirmat că suplimentarea sau înlocuirea parțială a uleiului de pește cu făină de krill, conduce la stimularea apetitului, îmbunătățirea indicilor de greutate viscerală și implicit la obținerea unor rezultate superioare în ceea ce privește performanța de creștere a păstrăvului curcubeu (*Oncorhynchus mykiss*) și somonului de Atlantic (*Salmo salar*). Cu toate acestea, există foarte puține informații disponibile în literatura de specialitate referitoare la aditivarea hranei cu KO.

Unii autori au raportat că suplimentarea hranei creveților cu KO conduce la performanțe îmbunătățite în ceea ce privește masa corporală și producția finală (Castro și colab., 2017). De asemenea, Nunes și colab., 2020 au raportat că utilizarea KO în alimentația larvelor de creveți reduce durata ciclului de producție și mortalitatea, chiar și în condiții de stres. Xiuling și colab., 2019 au efectuat un studiu asupra creveților auriu, Pompano auriu (*Trachinotus ovatus* Linnaeus, 1758), folosind diferite surse de lipide (FO-ulei de pește, KO-ulei de krill, SO-ulei de soia și CO-ulei de porumb), iar rezultatele au evidențiat o îmbunătățire a performanțelor de creștere atunci când au folosit în hrana acestora o combinație de 1:1 de FO și KO și, respectiv, KO-CO. De asemenea, autorii au concluzionat că utilizarea KO în dieta larvelor de Pompano auriu, ar putea regla anumiți indicatori fiziologici.

Studiul de față a demonstrat că densitatea mai mare de populare influențează în mod negativ eficiența reținerii nutrienților și, implicit performanța de creștere. Mai mulți autori au raportat că performanța de creștere a fost influențată negativ atunci când densitatea de populare depășește anumite „densități optime”. Hayat și colab., 2018, au raportat o scădere a creșterii performanței de creștere pentru crapul comun Majalaya

la densități de populare de 125 pești/m<sup>3</sup>. [Enache și colab., 2011](#) au raportat performanțe superioare de creștere pentru crap (masa medie individuală de 65 g/pește) populat la densități mai mici (32 kg/m<sup>3</sup>) în comparație cu crapul repopulat la densități de 64 kg/m<sup>3</sup>. Obținerea unor performanțe de creștere mai mici în cazul densităților ridicate de populare este corelată și cu scăderea spațiului disponibil pentru fiecare pește, competiția alimentară și cerințele suplimentare de energie induse de stres ([Montero și colab., 1999](#); [Costas și colab., 2008](#)).

#### 4.3.2. Evaluarea indicilor hepatosomatici și a compoziției biochimice a cărnii

În tabelul 4.2. sunt prezentate valorile indicilor somatici după 60 de zile experimentale. În cazul experimentului nostru, analiza statistica ANOVA nu a evidențiat diferențe semnificative ( $p > 0,05$ ) în ceea ce privește valorile indicilor CSI, în timp ce valorile HSI, VSI și SSI au înregistrat diferențe semnificative ( $p < 0,05$ ) între cele patru variante experimentale.

**Tabelul 4.2.** Valorile indicilor somatici după 60 de zile experimentale

Indici corporali	LD	LD-KO	HD	HD-KO	p
HSI	2,94±1,03 <sup>a</sup>	3,27±0,54 <sup>b</sup>	2,62±0,23 <sup>a</sup>	2,7±0,4 <sup>a</sup>	0,04
VSI (%)	11,46±1,94 <sup>b</sup>	10,38±0,69 <sup>a</sup>	10,87±1,53 <sup>a</sup>	11,67±0,92 <sup>b</sup>	0,04
SSI (%)	0,34±0,14 <sup>a</sup>	0,35±0,07 <sup>a</sup>	0,51±0,09 <sup>b</sup>	0,40±0,12 <sup>a</sup>	0,03
CSI (%)	0,21±0,38 <sup>a</sup>	0,11±0,07 <sup>a</sup>	0,16±0,03 <sup>a</sup>	0,20±0,02 <sup>a</sup>	0,85

HSI - indicele hepatosomatic; VSI - indicele viscerosomatic; SSI - indicele splenosomatic; CSI - indicele cardiosomatic. Valorile reprezintă media ± S.E. Valorile cu litere diferite într-un rând indică diferențe semnificative (ANOVA,  $p < 0,05$ ) între variantele experimentale

Indicele hepatosomatic este un indice indirect care măsoară nivelurile de glicogen și carbohidrați și poate fi utilizat pentru a indica starea nutrițională a peștilor, în timp ce indicele splenosomatic reflectă atât starea imunitară a peștilor, cât și capacitatea hematopoietică a peștilor ([Tavares-Dias, 2000](#)).

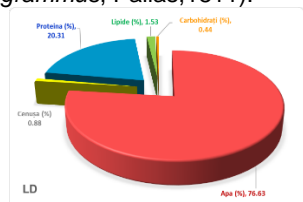
HSI a înregistrat o valoare semnificativ mai ridicată ( $p < 0,05$ ) în cazul variantei LD-KO (3,27±0,54 %), observându-se reducerea semnificativă ( $p < 0,05$ ) a acestuia în varianta HD (2,62±0,23 %). Reducerea HSI la densități mari de populare a fost, de asemenea, raportată de [Leatherland și Cho, 1985](#) la păstrăvul curcubeu. Autorii explică acest fenomen prin acumularea unor rezerve hepatice totale mai mici de lipide și glicogen hepatic.

Valorile VSI au fost semnificativ ( $p < 0,05$ ) mai reduse la peștii din loturile LD-KO, respectiv HD, fără diferențe semnificative ( $p > 0,05$ ) între peștii din loturile LD și HD-KO. În ceea ce privește valorile SSI, o creștere semnificativă ( $p < 0,05$ ) a fost înregistrată pentru peștii din lotul HD.

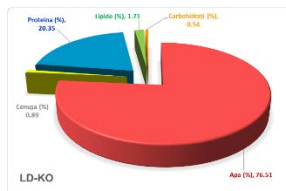
Splina este considerată a fi principalul organ al peștilor în care se produc eritrocitele, neutrofilele și granulocitele și mature, având totodată un rol vital în răspunsul imunitar al acestora, fiind responsabilă pentru producția ridicată de melano-macrofage ([Kumaran și colab., 2010](#)). În cazul experimentului nostru indicele SSI a înregistrat valori semnificativ mai ridicate ( $p < 0,05$ ) în varianta HD. Stocarea peștilor la densități ridicate, poate conduce la o

creșterea a volumului splinei, permițând organismului să își mențină funcțiile organice în echilibru.

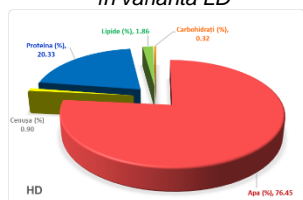
În figurile 4.1-4.4 sunt prezentate valorile compoziției biochimice a cărnii, după cele 60 de zile experimentale. Analiza statistică ANOVA nu a evidențiat diferențe semnificative ( $p > 0,05$ ) între cele patru variante experimentale. Cu toate acestea valori ușor mai bune au fost obținute pentru peștii hrăniți cu KO. Rezultate similare au fost raportate de [Choi și colab., 2020](#), după includerea făinii de Krill în dieta codului de Alaska (*Gadus chalcogrammus*, Pallas, 1811).



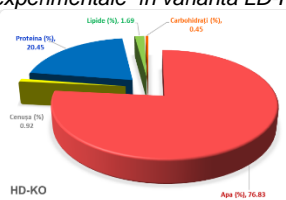
**Figura 4.1.** Compoziția biochimică a cărnii după cele 60 de zile experimentale în varianta LD



**Figura 4.2.** Compoziția biochimică a cărnii după cele 60 de zile experimentale în varianta LD-KO



**Figura 4.3.** Compoziția biochimică a cărnii după cele 60 de zile experimentale în varianta HD



**Figura 4.4.** Compoziția biochimică a cărnii după cele 60 de zile experimentale în varianta HD-KO

### 4.3.3. Evaluarea parametrilor hematologici

După 60 de zile experimentale, cât și după tratamentul cu ABZ (după 7 zile de expunere), au fost determinați parametrii hematologici: hemoglobina (Hb), numărul de globule roșii (RBC), hematocritul (Ht), precum și constanțele eritrocitare (VEM, HEM și CHEM) (tabelul 4.3.).

La finalul experimentului de hrănire, deși analiza statistică nu a evidențiat diferențe semnificative ( $p > 0,05$ ), valorile parametrilor hematologici au înregistrat o ușoară scădere a numărului de eritrocite (RBC) în cazul densității mai mari de populare, respectiv o creștere ne semnificativă în loturile hrănite cu dieta cu ulei de krill. Totodată, atât densitățile de populare alese, cât și suplimentarea hranei cu KO nu a avut un efect semnificativ ( $p > 0,05$ ) asupra Hb, Ht, VEM, HEM și CHEM.

Cu toate acestea, după tratamentul cu ABZ, valorile Hb au prezentat o scădere semnificativă ( $p < 0,05$ ) în grupurile HD și HD-KO, în timp ce valorile Ht, VEM și HEM au scăzut doar în grupurile HD.

În general, densitățile ridicate de populare pot compromite sănătatea peștilor, provocând modificări ale profilului hematologic și metabolic.

**Tabelul 4.3.** Valorile parametrilor hematologici înregistrate după 60 de zile experimentale, și după aplicarea testului cu ABZ

Parametrul	După 60 de zile experimentale			
	LD	LD-KO	HD	HD-KO
RBC ( $\times 10^6$ /mm <sup>3</sup> )	1.24 $\pm$ 0.14 <sup>a*</sup>	1.31 $\pm$ 0.16 <sup>a*</sup>	1.14 $\pm$ 0.14 <sup>a*</sup>	1.28 $\pm$ 0.05 <sup>a*</sup>
Hb (g/dL)	8.42 $\pm$ 0.63 <sup>a*</sup>	8.83 $\pm$ 0.69 <sup>a*</sup>	9.71 $\pm$ 0.51 <sup>a*</sup>	9.34 $\pm$ 0.27 <sup>a*</sup>
Ht (%)	28.22 $\pm$ 2.10 <sup>a*</sup>	29.13 $\pm$ 1.31 <sup>a*</sup>	31.59 $\pm$ 1.80 <sup>a*</sup>	27.93 $\pm$ 2.65 <sup>a*</sup>
VEM ( $\mu$ m <sup>3</sup> )	238.59 $\pm$ 36.97 <sup>a*</sup>	233.77 $\pm$ 34.33 <sup>a*</sup>	286.63 $\pm$ 12.3 <sup>a*</sup>	220.36 $\pm$ 14.88 <sup>a*</sup>
HEM (pg)	71.71 $\pm$ 11.45 <sup>a*</sup>	70.68 $\pm$ 10.97 <sup>a*</sup>	88.01 $\pm$ 10.31 <sup>a*</sup>	73.46 $\pm$ 4.46 <sup>a*</sup>
CHEM (g/dL)	30.02 $\pm$ 2.05 <sup>a*</sup>	30.21 $\pm$ 1.21 <sup>a*</sup>	30.93 $\pm$ 2.02 <sup>a*</sup>	34.42 $\pm$ 3.44 <sup>a*</sup>
Parametrul	După testul cu ABZ (7 zile)			
	LD	LD-KO	HD	HD-KO
RBC ( $\times 10^6$ /mm <sup>3</sup> )	1.40 $\pm$ 0.12 <sup>a*</sup>	1.67 $\pm$ 0.15 <sup>a*</sup>	1.36 $\pm$ 0.21 <sup>a*</sup>	1.41 $\pm$ 0.11 <sup>a*</sup>
Hb (g/dL)	8.44 $\pm$ 0.31 <sup>c*</sup>	9.48 $\pm$ 0.39 <sup>d*</sup>	7.09 $\pm$ 0.73 <sup>a**</sup>	7.28 $\pm$ 0.72 <sup>b**</sup>
Ht (%)	31.30 $\pm$ 2.17 <sup>c*</sup>	31.80 $\pm$ 1.77 <sup>c*</sup>	23.00 $\pm$ 2.62 <sup>a**</sup>	28.87 $\pm$ 2.02 <sup>b*</sup>
VEM ( $\mu$ m <sup>3</sup> )	231.23 $\pm$ 12.30 <sup>a*</sup>	196.57 $\pm$ 9.74 <sup>a*</sup>	194.52 $\pm$ 16.87 <sup>a**</sup>	213.77 $\pm$ 11.01 <sup>a*</sup>
HEM (pg)	62.40 $\pm$ 6.37 <sup>a*</sup>	58.68 $\pm$ 6.07 <sup>a*</sup>	56.48 $\pm$ 9.06 <sup>a**</sup>	53.01 $\pm$ 7.38 <sup>a*</sup>
CHEM (g/dL)	27.33 $\pm$ 1.57 <sup>a*</sup>	30.35 $\pm$ 2.52 <sup>a*</sup>	30.55 $\pm$ 5.63 <sup>a*</sup>	25.56 $\pm$ 2.71 <sup>a**</sup>

Valorile reprezintă media  $\pm$  S.E. (n = 3). Valorile cu litere diferite într-un rând indică diferențe semnificative (ANOVA,  $p < 0,05$ ) între variantele experimentale. Valorile cu simboluri diferite \*\*/\*\* într-un rând indică diferențe semnificative după tratamentul cu ABZ (T dependent,  $p < 0,05$ ). RBC- număr de globule roșii (eritrocite), Hb- hemoglobină, Ht- hematocritul, VEM- volum corpuscular mediu, HEM- hemoglobină corpusculară medie, CHEM- conținut corpuscular mediu de hemoglobină.

Rezultatele experimentului nostru au arătat că valorile parametrilor hematologici nu a fost influențate de densitatea de populare a peștilor sau de suplimentarea hranei cu KO. Este bine cunoscut faptul că profilul hematologic al peștilor este influențat de factori externi stresanți, deoarece reprezintă legătura dintre mediul înconjurător și cel intern. Reducerea concentrației de hemoglobină în grupurile HD după expunerea la ABZ ar putea fi efectul inhibitor cumulativ al ambilor factori de stres, densitate și ABZ, asupra sistemului enzimatic care este responsabil de sinteza hemoglobinei (Ahmed și colab., 2020).

Determinarea constantelor eritrocitare (VEM, HEM, CHEM) prezintă o importanță deosebită pentru evaluarea stărilor de anemie la pești, fiind utilizate pe scară largă pentru determinarea mărimii, conținutului și densității Hb în globulele roșii (Ambili și colab., 2013). În studiul nostru, după cele 60 de zile de hrănire, valorile VEM, HEM și CHEM nu au evidențiat modificări semnificative ( $p > 0,05$ ) între cele patru loturi experimentale, susținând ipoteza că densitatea mai mare de populare nu a indus o stare de stres, sau o stare

patologică. Cu toate acestea, după tratamentul cu ABZ, s-a înregistrat scăderea semnificativă a valorilor Ht, VEM și CHEM în grupurile HD ( $p < 0,05$ ), respectiv scăderea semnificativă a valorilor CHEM la grupurile HD-KO ca urmare a scăderii Hb.

Rezultatele noastre sunt similare cu cele raportate de alți autori. Reducerea acestor indici hematologici se datorează efectului ABZ asupra sistemului hematopoietic, care poate reduce dimensiunea celulelor sau distruge constituenții sângelui (Nwani și colab., 2015). Conform lui Islam și colab., 2015, acest lucru ar putea îngreuna capacitatea de transport al oxigenului în sânge conducând la hipoxie. Totodată, scăderea valorilor RBC, Hb, VEM, Ht și a valorilor CHEM ar putea fi datorată de stresul oxidativ care rezultă din interacțiunea metabolică a ABZ asupra peștilor.

În cazul studiului nostru, valorile parametrilor hematologici au arătat un interval de variație în ecartul optim al speciei, pentru această vârstă (Baghizadeh și colab., 2015). Cu toate acestea, peștii din grupurile cu densitate mare (HD-KO) care au primit hrana suplimentată cu KO a prezentat o mai mică modificare a profilului hematologic.

#### **4.3.4. Evaluarea parametrilor serici**

Măsurătorile biochimice ale sângelui reflectă starea de sănătate a peștilor. Așadar, la finalul experimentului, dar și după tratamentul cu ABZ s-a determinat profilul metabolic al peștilor: albumina (ALB), globulina (GLOB), raportul albumină/globulină (A/G), proteinele serice totale (TP), glucoza (GLU), alanina aminotransferaza (ALT), aspartat aminotransferaza (AST), fosfataza alcalină (ALP), gamma-glutamilttransferaza (GGT), bilirubină directă (BIL D), bilirubina totală (BIL T), lipoproteinele cu densitate mare (HDL), lipoproteinele cu densitate joasă (LDL), colesterol (CHOL), trigliceridele (TG) și lipidele totale (TL) (Tabelul 4.4.).

Anterior tratamentului cu ABZ, peștii stocați la o densitate mai mare și hrăniți cu furaj simplu au înregistrat o creștere semnificativă ( $p < 0,05$ ) a valorilor GLU, AST, ALT și GGT în comparație cu grupurile hrănite cu KO. KO nu a indus modificări semnificative ( $p > 0,05$ ) în ceea ce privește valorile ALP, BIL D, BIL T, TL și fracției lipidice, excepție făcând HDL, care a avut valori mai mari în variantele LD-KO și HD-KO.

După tratamentul cu ABZ, valorile ALB, GLOB și TP au crescut în toate variantele experimentale, ambii factori, densitatea și hrana, arătând o interacțiune semnificativă ( $p < 0,05$ ) pentru acești parametri. De asemenea, valorile GLU cresc semnificativ după tratamentul cu ABZ, cu cea mai mare valoare în varianta HD ( $97.60 \pm 3.80$  mg/dl) și cea mai mică valoare în varianta LD-KO ( $75.20 \pm 3.11$  mg/dl) urmată de HD-KO ( $85.60 \pm 4.73$  mg/dl) și LD ( $86.80 \pm 4.95$  mg/dl). De asemenea, tratamentul cu ABZ a indus o creștere a valorilor ALT și AST în toate variantele experimentale, cu o valoare medie semnificativ ( $p < 0,05$ ) mai mare pentru grupurile HD.

Valorile HDL au crescut după tratamentul cu ABZ în toate variantele experimentale, fără diferențe semnificative ( $p > 0,05$ ) între variantele experimentale. La finalul celor 60 de zile experimentale, valorile LDL nu a

fost influențate ( $p > 0,05$ ) de hrana administrată sau de densitatea de populare, însă acestea au crescut semnificativ ( $p < 0,05$ ) după tratamentul cu ABZ, când cea mai mare valoare medie a fost înregistrată pentru grupurile HD ( $95,20 \pm 2,52$  mg/L).

După 60 de zile experimentale, valorile CHOL, TL și TG nu au fost influențate semnificativ ( $p > 0,05$ ) de densitatea de stocare sau de suplimentarea hranei cu KO. După tratamentul cu ABZ s-a observat o scădere semnificativă ( $p < 0,05$ ) a valorilor TG și TL, respectiv o creștere semnificativă ( $p < 0,05$ ) a valorilor CHOL în toate variantele experimentale. Astfel, după tratamentul cu ABZ, cele mai mari valori medii ale CHOL și TG, respectiv cea mai mică valoare medie a TL a fost înregistrată în loturile HD.

În cazul studiului nostru, după 60 de zile de hrănire, peștii crescuți în condiții ridicate de populare (HD) au prezentat cele mai mici valori ale TP și ale GLOB. Deși grupurile care au primit hrana suplimentată cu KO au înregistrat concentrații serice mai mari de TP și GLOB în comparație cu grupurile hrănite cu o dietă normală și stocați în aceeași densitate, diferențe semnificative ( $p < 0,05$ ) au fost înregistrate doar pentru grupurile cu densitate mare; ALB nu a fost afectată de densitate sau de regimul de hrănire ( $p > 0,05$ ).

Modificarea parametrilor biochimici în condiții de densitate ridicată a fost raportată și de alți autori (Kpundeh și colab., 2013; Abdel-Tawwab și colab., 2014; Mahmoud și colab., 2021). Naderi și colab., 2017, au raportat scăderea semnificativă a valorilor globulinei și albuminei, fără modificarea valorilor proteinelor serice pentru păstrăvul curcubeu (*Oncorhynchus mykiss*) crescut la o densitate mare de populare ( $80 \text{ kg/m}^3$ ).

**Tabelul 4.4.** Valorile parametrilor serici la finalul experimentului de hrănire și după aplicarea testului cu ABZ

Parametrul	Variantele experimentale				Interacțiunea
	LD	LD-KO	HD	HD-KO	Hrana x Densitatea
<b>După 60 de zile de hrănire</b>					
ALB (g/dl)	1.09 ± 0.03 <sup>a*</sup>	1.00 ± 0.05 <sup>a*</sup>	1.13 ± 0.10 <sup>a*</sup>	1.03 ± 0.07 <sup>a*</sup>	p=0.084
GLOB (g/dl)	2.76 ± 0.25 <sup>c*</sup>	2.96 ± 0.10 <sup>c*</sup>	2.33 ± 0.06 <sup>a*</sup>	2.56 ± 0.15 <sup>b*</sup>	p=0.034
A/G	0.39 ± 0.03 <sup>b*</sup>	0.33 ± 0.02 <sup>a*</sup>	0.48 ± 0.03 <sup>c*</sup>	0.40 ± 0.01 <sup>b*</sup>	p=0.020
TP (g/dl)	3.83 ± 0.18 <sup>b*</sup>	3.96 ± 0.25 <sup>b*</sup>	3.36 ± 0.05 <sup>a*</sup>	3.59 ± 0.10 <sup>b*</sup>	p=0.235
GLU (mg/dl)	48.33 ± 3.79 <sup>a*</sup>	43.67 ± 2.42 <sup>a*</sup>	68.67 ± 3.21 <sup>c*</sup>	51.50 ± 5.03 <sup>b*</sup>	p=0.967
ALT (U/L)	81.33 ± 3.59 <sup>a</sup>	54.33 ± 3.46 <sup>a*</sup>	110.00 ± 4.94 <sup>c*</sup>	96.00 ± 3.58 <sup>b*</sup>	p=0.560
AST (U/L)	120.67 ± 8.36 <sup>a*</sup>	106.67 ± 5.16 <sup>a*</sup>	189.67 ± 4.98 <sup>c*</sup>	150.33 ± 6.53 <sup>b*</sup>	p=0.872
ALP (U/l)	129.20 ± 4.44 <sup>a*</sup>	103.60 ± 4.50 <sup>a*</sup>	135.33 ± 4.31 <sup>a*</sup>	113.50 ± 6.79 <sup>a*</sup>	p=0.403
GGT (U/L)	0.50 ± 0.71 <sup>a*</sup>	0.50 ± 0.71 <sup>a*</sup>	3.00 ± 0.83 <sup>c*</sup>	1.33 ± 1.15 <sup>b*</sup>	p=0.457
BIL D (mg/dl)	0.20 ± 0.07 <sup>a*</sup>	0.22 ± 0.08 <sup>a*</sup>	0.20 ± 0.05 <sup>a*</sup>	0.18 ± 0.04 <sup>a*</sup>	p=0.213



**Lăcrămioara NĂSTAC (Grădinariu) - Influența compușilor bioactivi din suplimentele alimentare asupra proceselor metabolice ale organismelor acvatice, 2023**

<b>BIL T</b> (mg/dl)	0.29 ± 0.10 <sup>a*</sup>	0.25 ± 0.11 <sup>a*</sup>	0.32 ± 0.09 <sup>a*</sup>	0.27 ± 0.06 <sup>a*</sup>	p=0.187
<b>HDL</b> (mg/dl)	79.73 ± 6.85 <sup>a*</sup>	90.07 ± 6.38 <sup>b*</sup>	74.63 ± 5.03 <sup>a*</sup>	87.73 ± 8.24 <sup>b*</sup>	p=0.578
<b>LDL</b> (mg/L)	27.67 ± 6.00 <sup>a*</sup>	26.33 ± 2.65 <sup>a*</sup>	25.67 ± 4.85 <sup>a*</sup>	27.67 ± 12.22 <sup>a*</sup>	p=0.858
<b>CHOL</b> (mg/dl)	211.67 ± 15.57 <sup>a*</sup>	204.67 ± 8.50 <sup>a*</sup>	203.50 ± 5.69 <sup>a*</sup>	181.33 ± 8.02 <sup>a*</sup>	p=0.961
<b>TG</b> (mg/dl)	449.33 ± 9.29 <sup>a*</sup>	435.00 ± 3.51 <sup>a*</sup>	440.00 ± 4.43 <sup>a*</sup>	421.33 ± 27.74 <sup>a*</sup>	p=0.642
<b>TL</b> (mg/dl)	1026.33 ± 3.01 <sup>a*</sup>	983.00 ± 4.64 <sup>a*</sup>	999.00 ± 9.81 <sup>a*</sup>	931.33 ± 43.25 <sup>a*</sup>	p=0.734
<b>După testul cu ABZ (7 zile)</b>					
<b>ALB</b> (g/dl)	1.28 ± 0.06 <sup>b**</sup>	1.18 ± 0.06 <sup>a*</sup>	1.42 ± 0.05 <sup>c**</sup>	1.21 ± 0.03 <sup>a**</sup>	p=0.044
<b>GLOB</b> (g/dl)	3.02 ± 0.04 <sup>b**</sup>	3.22 ± 0.22 <sup>c**</sup>	2.75 ± 0.18 <sup>a**</sup>	3.11 ± 0.13 <sup>b**</sup>	p=0.026
<b>A/G</b>	0.40 ± 0.02 <sup>a*</sup>	0.36 ± 0.03 <sup>a*</sup>	0.51 ± 0.01 <sup>b**</sup>	0.38 ± 0.01 <sup>a*</sup>	P=0.312
<b>TP</b> (g/dl)	4.30 ± 0.15 <sup>b**</sup>	4.40 ± 0.22 <sup>c**</sup>	4.17 ± 0.32 <sup>a**</sup>	4.32 ± 0.15 <sup>b**</sup>	p=0.031
<b>GLU</b> (mg/dl)	86.80 ± 4.95 <sup>b**</sup>	75.20 ± 3.11 <sup>a**</sup>	97.60 ± 3.80 <sup>c**</sup>	85.60 ± 4.73 <sup>b**</sup>	p=0.751
<b>ALT</b> (U/L)	92.40 ± 2.40 <sup>b**</sup>	65.00 ± 2.47 <sup>a**</sup>	148.50 ± 1.44 <sup>d**</sup>	122.00 ± 2.99 <sup>c**</sup>	p=0.011
<b>AST</b> (U/L)	233.50 ± 10.32 <sup>b**</sup>	197.75 ± 6.79 <sup>a**</sup>	367.25 ± 7.25 <sup>d**</sup>	281.00 ± 7.06 <sup>c**</sup>	p=0.012
<b>ALP</b> (U/l)	53.20 ± 0.73 <sup>a*</sup>	69.60 ± 4.33 <sup>a**</sup>	74.80 ± 2.19 <sup>a*</sup>	75.53 ± 3.95 <sup>a**</sup>	p=0.494
<b>GGT</b> (U/L)	2.40 ± 2.30 <sup>a**</sup>	2.50 ± 1.29 <sup>a**</sup>	4.00 ± 1.00 <sup>b**</sup>	2.40 ± 1.14 <sup>a**</sup>	p=0.148
<b>BIL D</b> (mg/dl)	0.11 ± 0.04 <sup>a**</sup>	0.11 ± 0.05 <sup>a**</sup>	0.13 ± 0.04 <sup>a**</sup>	0.12 ± 0.03 <sup>a**</sup>	p=0.830
<b>BIL T</b> (mg/dl)	0.19 ± 0.06 <sup>a**</sup>	0.19 ± 0.09 <sup>a**</sup>	0.21 ± 0.06 <sup>b**</sup>	0.24 ± 0.05 <sup>c**</sup>	p=0.860
<b>HDL</b> (mg/dl)	75.40 ± 3.15 <sup>a**</sup>	82.10 ± 6.50 <sup>a**</sup>	70.16 ± 7.45 <sup>a**</sup>	80.00 ± 6.08 <sup>a**</sup>	p=0.571
<b>LDL</b> (mg/L)	89.00 ± 3.76 <sup>a**</sup>	81.60 ± 5.66 <sup>a**</sup>	118.40 ± 9.07 <sup>c**</sup>	95.20 ± 2.52 <sup>b**</sup>	p=0.459
<b>CHOL</b> (mg/dl)	228.40 ± 9.58 <sup>a*</sup>	214.80 ± 7.29 <sup>a*</sup>	247.60 ± 6.89 <sup>b**</sup>	229.00 ± 4.16 <sup>a**</sup>	p=0.771
<b>TG</b> (mg/dl)	263.80 ± 8.94 <sup>a**</sup>	266.60 ± 7.04 <sup>a**</sup>	334.40 ± 6.89 <sup>b**</sup>	285.80 ± 9.05 <sup>a**</sup>	p=0.252
<b>TL</b> (mg/dl)	899.00 ± 10.23 <sup>a**</sup>	959.40 ± 7.87 <sup>b**</sup>	871.60 ± 2.46 <sup>a**</sup>	903.00 ± 5.23 <sup>a**</sup>	p=0.268

Valorile reprezintă media ± S:E., n = 3. Valorile cu litere diferite într-un rând diferă semnificativ (ANOVA, p<0,05). Valorile cu simboluri diferite \*\*/\*\* într-o coloană diferă semnificativ după tratament (T dependent, p<0,05).

Globulina este un biomarker de diagnosticare cu o valoare semnificativă la pești. Astfel, creșterea globulinei serice și scăderea valorilor raportului albumină/globulină (A/G) reprezintă un indicator important al imunității nespecifice și al mecanismelor de protecție al peștilor (Opiyo și colab., 2019). În studiul de față, după cele 60 de zile de hrănire, raportul A/G a fost influențat de ambii factori, dieta și densitatea, precum și de interacțiunea acestora (p<0,05). Raportul A/G ridicat a fost evidențiat în grupurile HD, în timp ce valori mai mici au fost observate în grupurile care au primit hrana suplimentată cu KO.

După tratamentul cu ABZ, nivelul proteinelor totale serice și al globulinei a crescut la toate grupurile experimentale ( $p < 0,05$ ); proteinele totale și globulina a înregistrat valori semnificativ mai mari la grupurile hrănite cu dieta KO și la grupurile crescute în densități mici. Cu toate acestea, în urma rezultatelor noastre, se poate concluziona că peștii hrăniți cu o dietă normală, ținută în condiții de stres de densitate și tratați cu ABZ, au prezentat un răspuns imunitar nespecific mai alterat decât peștii ținută în aceleași condiții, dar hrăniți cu KO.

Glucoza este considerată a fi, de asemenea, un bun indicator al stresului peștilor (acut sau cronic), fiind adesea utilizată ca biomarker de bunăstare (Martínez-Porchas și colab., 2009). Rezultatele studiului de față au evidențiat o creștere semnificativă ( $p < 0,05$ ) a concentrației de glucoză serică a crapului în ambele grupuri HD, chiar și în cele hrănite cu KO. După tratamentul cu ABZ, concentrația glucozei serice a crescut în toate variantele experimentale, înregistrând cea mai mare valoare în grupul HD hrănit cu o dietă normală ( $97,60 \pm 3,80$  mg/dl), ceea ce sugerează un răspuns fiziologic mai puternic la stresul indus de densitatea mare de populare și toxicitatea ABZ.

CHOL și TG serice oferă informații importante privind starea de stres a peștilor deoarece sunt legați de metabolismul energetic și lipidic (Wu și colab., 2018). Este recunoscut faptul că la peștii ținută în condiții de densitate mare de populare rezervele de energie sunt afectate pentru a face față cererii crescute de energie, fie prin consum, fie prin realocarea acestora.

În cazul experimentului nostru, după cele 60 de zile de hrănire CHOL nu au fost afectate în mod semnificativ de densitatea de populare ( $p > 0,05$ ) sau suplimentarea hranei cu KO ( $p > 0,05$ ). Cu toate acestea, s-au observat valori mai mici în cazul densității mai ridicate de populare și la grupurile hrănite cu KO.

Densitatea de populare sau suplimentarea hranei cu KO, nu a indus diferențe semnificative în ceea ce privește concentrația de LDL ( $p > 0,05$ ), în timp ce HDL a înregistrat valori mai mari pentru peștii hrăniți cu dieta KO. Cu toate acestea, tratamentul cu ABZ a indus o creștere semnificativă ( $p < 0,05$ ) a valorilor LDL în toate grupurile experimentale, printre care cea mai mare valoare a fost cuantificată în HD, iar cea mai mică în LDK, sugerând că KO a atenuat impactul negativ al ABZ asupra lipidelor. HDL a scăzut semnificativ ( $p < 0,05$ ) după tratamentul cu ABZ, dar fără diferențe semnificative ( $p > 0,05$ ) între variantele experimentale.

Stresul cronic, a alterat, de asemenea, funcția hepatică evaluată prin intermediul unor biomarkeri precum ALT, AST, ALP și GGT. În mod normal, aceste enzime au o variație constantă, cu excepția cazului în care se abordează stresul cauzat de factorii de mediu sau unele provocări patologice. În cazul peștilor teleosteeni, enzimele ALT și AST sunt principalele aminotransferaze legate de metabolismul aminoacizilor în ficat (Coz-Rakovac și colab., 2008). În cazul crapului crescut în prezentul experiment, în condiții de stres de densitate, nivelurile AST și ALT, măsurate după cele 60 de zile de hrănire, au crescut semnificativ ( $p < 0,05$ ) în variantele cu

densitate mai mare, în timp ce pentru ALP, suplimentarea hranei sau densitatea de populare nu a indus modificări semnificative ( $p > 0,05$ ).

Rezultatele noastre sunt similare cu cele raportate de alți autori. [Onxayvieng și colab., 2021](#), precum și [Adineh și colab., 2021](#) au raportat valori crescute pentru AST, ALT și ALP pentru speciile precum caras, *Carassius gibelio* sau pentru cossaș, *Ctenopharyngodon idella*, crescute în densități mari. Unii autori, însă, nu au raportat modificări semnificative în ceea ce privește valorile serice ale ALT, AST și ALP pentru bibanul american, *Micropterus salmoides* ([Wang și colab., 2019](#)). Suplimentarea hranei cu KO a indus valori semnificativ mai mici ale AST ( $p < 0,05$ ) măsurate în grupurile din densități mari, precum și modificări semnificative ( $p < 0,05$ ) ale ALT în ambele densități testate. În ceea ce privește valorile ALP, acestea nu a fost afectate de densitate sau de regimul de hrănire ( $p > 0,05$ ).

După tratamentul cu ABZ, concentrația enzimelor hepatice ALT și AST a crescut în toate variantele experimentale, cu cele mai ridicate valori în grupurile HD. Cu toate acestea, merită să remarcăm valorile semnificativ mai mici ( $p < 0,05$ ) înregistrate pentru ambele grupuri de densitate care au primit hrana suplimentată cu KO. Pentru acești parametri, s-a constatat o interacțiune semnificativă (dietă  $\times$  densitate) ( $p < 0,05$ ).

Valorile fosfatazei alcaline (ALP) măsurate la crapul expus la ABZ au înregistrat o scădere semnificativă ( $p < 0,05$ ) pentru grupurile care au primit o dietă normală, indiferent de densitate. În studiul actual, scăderea activității ALP la pești după expunerea la ABZ poate rezulta din perturbarea sistemului de transport membranar, deoarece ALP este o enzimă direct implicată în activitățile de transport membranar ([Bernet și colab., 2001](#)).

Valorile bilirubinei directe, printre alți biomarkeri, oferă informații privind funcția hepatică sau starea de nutriție a peștilor. Concentrațiile totale de bilirubină în serul peștilor sunt considerate aproape neglijabile în comparație cu mamiferele, datorită activității mai reduse a biliverdin-reductazei ([Fang și Bada, 1982](#)). În studiul de față, BIL T nu a fost afectată de densitatea de populare sau de suplimentarea hranei cu KO, dar a fost redusă semnificativ ( $p < 0,05$ ) după tratamentul cu ABZ, cu valori mai mari în grupurile HD.

Activitatea GGT a fost îmbunătățită de densitatea ridicată și de tratamentul cu ABZ, indicând, împreună cu AST și ALT, disfuncții sau leziuni hepatice. Utilizarea KO în dieta crapului a redus semnificativ ( $p < 0,05$ ) nivelul GGT în serul peștilor ținuți în densități mari.

#### **4.3.5. Evaluarea stresului oxidativ, a capacității antioxidante și activității lizozimului**

În tabelul 4.5. sunt prezentați parametri de stres oxidativ și activitatea lizozimului, după cele 60 de zile experimentale, cât și după aplicarea testului cu ABZ.

După cele 60 de zile experimentale, concentrațiile de MDA din plasmă și ficat au fost semnificativ crescute ( $p < 0,05$ ) în grupurile de pești hrăniți cu o dietă normală și stocați la densitate mare. Concentrații semnificativ mai mari ( $p < 0,05$ ) de MDA au fost înregistrate după aplicarea testului cu ABZ în

toate variantele experimentale. Cu toate acestea, cea mai mică concentrație a fost observată în grupurile LD-KO și cea mai mare în varianta HD.

În plus, valorile TAC au fost influențate semnificativ (interacțiunea  $p < 0,05$ ) de densitatea de stocare și de suplimentarea hranei. Înainte de tratamentul cu ABZ, TAC a crescut semnificativ ( $p < 0,05$ ) la peștii din grupul LD-KO. După provocarea cu ABZ, au fost observate scăderi semnificative ale valorilor TAC, cele mai mici valorile fiind înregistrate în grupul HD.

**Tabelul 4.5.** Valorile malondialdehidei, capacității antioxidante și ale lizozimului la finalul experimentului de hrănire și după aplicarea testului cu ABZ

Parametrul	După 60 de zile de hrănire			
	LD	LD-KO	HD	HD-KO
<b>MDA</b> (nmol/mL plasmă)	2.10 ± 0.09 <sup>b*</sup>	1.67 ± 0.13 <sup>a*</sup>	2.67 ± 0.16 <sup>c*</sup>	2.00 ± 0.15 <sup>b*</sup>
<b>MDA</b> (nmol/g ficat)	8.12 ± 0.17 <sup>b*</sup>	5.49 ± 0.10 <sup>a*</sup>	8.47 ± 0.21 <sup>c*</sup>	8.12 ± 0.22 <sup>b*</sup>
<b>TAC</b> (mM Trolox)	21.78 ± 0.25 <sup>b*</sup>	24.64 ± 0.29 <sup>c*</sup>	19.31 ± 0.26 <sup>a*</sup>	21.48 ± 0.31 <sup>b*</sup>
<b>LYZ</b> (U/mL)	7.70 ± 0.29 <sup>b*</sup>	9.10 ± 0.12 <sup>c*</sup>	7.33 ± 0.14 <sup>a*</sup>	9.33 ± 0.11 <sup>d*</sup>
Parametrul	După testul cu ABZ			
<b>MDA</b> (nmol/mL)	2.44 ± 0.11 <sup>b**</sup>	1.88 ± 0.17 <sup>a**</sup>	2.98 ± 0.15 <sup>c**</sup>	2.38 ± 0.13 <sup>b**</sup>
<b>MDA</b> (nmol/g ficat)	10.77 ± 0.19 <sup>b**</sup>	8.80 ± 0.14 <sup>a**</sup>	11.84 ± 0.18 <sup>b**</sup>	8.61 ± 0.19 <sup>a**</sup>
<b>TAC</b> (mM Trolox)	18.97 ± 0.22 <sup>a**</sup>	18.95 ± 0.24 <sup>a**</sup>	14.37 ± 0.21 <sup>b**</sup>	17.21 ± 0.23 <sup>a**</sup>
<b>LYZ</b> (U/mL)	9.18 ± 0.18 <sup>b**</sup>	9.73 ± 0.16 <sup>c**</sup>	8.54 ± 0.11 <sup>a**</sup>	9.10 ± 0.14 <sup>b**</sup>

Valorile reprezintă media ± S.E. (n=3). Valorile cu litere diferite într-un rând indică diferențe semnificative (ANOVA,  $p < 0,05$ ) între variantele experimentale. Valorile cu simboluri diferite \*\*/\*\* într-un rând indică diferențe semnificative după tratamentul cu ABZ (T dependent,  $p < 0,05$ ). MDA – indicele de peroxidare lipidică; TAC - capacitate antioxidantă totală; LYZ - activitatea lizozimului.

Activitatea lizozimului în serul sanguin al puietului de *Cyprinus carpio* a fost semnificativ mai mare ( $p < 0,05$ ) după 60 de zile în grupurile hrănite cu diete suplimentate cu HO. După aplicarea testului cu ABZ, activitatea lizozimului crește semnificativ ( $p < 0,05$ ) în toate grupurile, cu excepția LD-KO; cele mai mici valori fiind înregistrate în loturile HD.

Ca urmare a proceselor metabolice, la nivel celular, sunt produse și eliminate specii reactive de oxigen (ROS), prin mecanisme fiziologice complexe care sunt concepute pentru a menține un echilibru dinamic continuu. Atunci când ROS sunt în exces, radicalii liberi provoacă peroxidarea lipidelor. Componenta principală a peroxidizilor lipidici, malondialdehida (MDA), afectează structura și funcțiile celulare, fiind caracterizată prin biotoxicitate (Ming și colab., 2015).

În studiul de față, concentrațiile serice și hepatice de MDA au fost afectate atât de regimul de hrănire, cât și de densitatea de populare, prezentând valori semnificativ mai mari la grupurile hrănite cu o dietă simplă și la loturile crescute în condiții de densitate ridicată. Cele mai mari valori au fost, prin urmare, observate pentru grupurile HD, urmate de grupurile HDKO, LD și LDKO.

După aplicarea testului cu ABZ, valorile MDA au crescut pentru toate variantele experimentale, deși au păstrat același tipar: cu cele mai scăzute niveluri pentru grupurile care au primit hrană suplimentată cu KO și cele mai ridicate la grupurile HD hrănite cu o dietă normală.

În ceea ce privește capacitatea antioxidantă totală (TAC), acesta a fost semnificativ redusă ( $p < 0,05$ ) după aplicarea testului cu ABZ în toate cele patru variante experimentale. Rezultate similare au fost raportate și de [Nwani și colab., 2016](#) pentru somnul African expus la ABZ. Acesta prezentat niveluri mai ridicate de peroxidare a lipidelor și, în mod corespunzător, o inhibiție mai mare a activităților antioxidante, supunând unui risc mai mare de deteriorare.

Cu toate acestea, în studiul de față, reducerea mai mică a TAC în variantele suplimentate cu KO poate indica faptul că țesuturile evită epuizarea rezervelor totale de antioxidanți pentru a neutraliza stresul oxidativ. Astfel, conținutul ridicat de PUFA n-3 și de astaxantină din KO poate fi responsabil pentru activarea mecanismelor de protecție și/sau pentru acțiunea antioxidantă a acestor molecule care limitează utilizarea rezervelor interne de TAC.

Lizozimul (LZM) este un biomarker acceptat în mod obișnuit pentru evaluarea stării imunitare a peștilor după aplicarea unor stimuli, deoarece joacă un rol important în sistemul de bioapărare ([Saurabh și colab., 2008](#)).

Scăderea concentrației plasmatice de LZM a fost corelată cu afectarea sistemului imunitar la diferite specii de pești crescuți la densități mari de populare ([Costas et al. 2013](#); [Liu et al., 2019](#)). În mod similar, în experimentul nostru, nivelul de LZM a scăzut în grupurile HD hrănite cu furaj nesuplimentat cu KO, ceea ce relevă faptul că densitatea de populare a avut un efect negativ asupra stării de imunitate. Cu toate acestea, în loturile de pești hrănite cu KO, activitatea LZM a fost îmbunătățită și nu au fost detectate diferențe semnificative între densitățile de populare testate pentru aceste variante. După testul cu ABZ, concentrația de LZM a crescut în toate variantele experimentale, prezentând cea mai mare valoare în grupul LD-KO și cea mai mică în grupul HD, ceea ce sugerează că, combinația de agenți antiinflamatori și antioxidanți care se găsesc în KO a stimulat producția de molecule responsabile de imunitate, cum ar fi lizozimul, și a sporit capacitatea organismului de a consolida sistemul de apărare atunci când este supus unor factori stresanți.

#### **4.4. Concluzii și recomandări**

În general, în sistemele de creștere intensivă, precum sistemele recirculante de acvacultură, biomasa piscicolă este supusă stresului, însă expunerea cronică la stres conduce la deteriorarea stării de sănătate, conducând la reducerea eficienței utilizării hranei, slăbirea imunității și, în final la obținerea unor performanțe slabe de creștere.

Utilizarea suplimentelor alimentare în hrana peștilor din acvacultură este intens investigată în ultimii ani. În acest context, prezentul studiu a fost realizat pentru a investiga potențialul KO ca ingredient funcțional pentru

acvacultura intensivă. Astfel, în urma desfășurării prezentului experiment se pot desprinde o serie de concluzii, prezentate în cele ce urmează:

- administrarea uleiului de krill în hrana puietului de crap a condus la îmbunătățirea performanței de creștere, atât la densități de stocare de 3,5 kg/m<sup>3</sup>, cât și la densități mai ridicate de 8 kg/m<sup>3</sup>;
- indicii somatici au reliefat valori superioare în variantele experimentale unde s-a administrat ulei de krill, reliefând o stare de întreținere superioară prin comparație cu loturile a căror hrană nu a fost aditivată.

## Referințe capitul

1. Abdel-Tawwab, M.; Hagra, A.E.; Elbaghdady, H.A.M.; Monier, M.N. (2014). Dissolved oxygen level and 677 stocking density effects on growth, feed utilization, physiology, and innate immunity of Nile Tilapia, 678 *Oreochromis niloticus*. *J. Appl. Aquac.*, 26(4), 340-355. <https://doi.org/10.1080/10454438.2014.959830>
2. Ahmed, I.; Reshi, Q.M.; Fazio, F. (2020). The influence of the endogenous and exogenous factors on hematological parameters in different fish species: a review. *Aquac. Int.* 28(3), 869–899. <https://doi.org/10.1007/s10499-019-00501-3>
3. Ambili, T.R.; Saravanan, M.; Ramesh, M.; Abhijith, D.B.; Poopal, R.K. (2013). Toxicological Effects of the Antibiotic Oxytetracycline on an Indian Major Carp *Labeo rohita*. *Arch Environ Contam Toxicol*, 64, 494–503 DOI 10.1007/s00244-012-9836-6
4. Baghizadeh, E., Khara, H. (2015). Variability in hematology and plasma indices of common carp *Cyprinus carpio*, associated with age, sex and hormonal treatment. *Iran. J. Fish. Sci.* 14(1), 99–111.
5. Barton, B. A. (2002). Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integrative and comparative biology*, 42(3), 517-525.
6. Bernet, D.; Schmidt, H.; Wahli, T.; Burkhardt-Holm, P. (2001). Effluent from a sewage treatment works causes changes in serum chemistry of brown trout (*Salmo trutta* L.). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 48(2), 140–147. <https://doi.org/10.1006/eesa.2000.2012>
7. Castro, A., Montes, M., Orihuela, M. L., Linares, J., Cota, N., Carrera, L., et al. (2019). Effect of stocking density on growth and survival of fine flounder *Paralichthys adspersus* (Steindachner, 1867) larvae. *Latin american journal of aquatic research*, 47(1), 1-8.
8. Costas, B.; Aragao, C.; Dias, J.; Afonso, A.; Conceicao, L.E.C. Interactive effects of a high-quality protein diet and high stocking density on the stress response and some innate immune parameters of Senegalese sole *Solea senegalensis*. *Fish Physiol. Biochem.* 2013, 39, 1141–1151. DOI: 10.1007/s10695-013-9770-1
9. Coz-Rakovac, R.; Smuc, T.; Topic Popovic, N.; Strunjak-Perovic, I.; Hacmanjek, M.; Jadan, M. (2008). Novel methods for assessing fish blood biochemical data. *J. Appl. Ichthyol.*, 24(1), 77–80. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2007.01041.x>
10. Enache I., Cristea V., Ionescu T., Ion S., 2011 The influence of stocking density on the growth of common carp, *Cyprinus carpio*, in a recirculating aquaculture system. *AACL Bioflux* 4(2):146-153.
11. Fang, L.S.; Bada, J.L. Biliverdin reductase activity in marine fishes. *Mar. Biol. Lett.*, 3, 1982, pp. 121-130.

12. Goran, S.M.A.; Omar, S.S.; Anwer., A. A. Water Quality and Physiological Parameters of Common Carp 621 Fingerling Fed on Jerusalem artichoke Tubers. *Polytechnic* 2016, 3, 502-516.
13. Hayat, M., Nugroho, R. A., Aryani, R. (2018). Influence of different stocking density on the growth, feed efficiency, and survival of Majalaya common carp (*Cyprinus carpio* Linnaeus 1758), *F1000 Research*, 7, 1-9
14. Hansen, J. Ø., Shearer, K. D., Øverland, M., Penn, M. H., Krogdahl, A., Mydland., L. T., Storebakken, T. (2011). Replacement of LT fish meal with a mixture of partially deshelled krill meal and pea protein concentrates in diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*), *Aquaculture*, 315(3-4), 275-282.
15. Hoseini, S.M.; Taheri Mirghaed, A.; Iri, Y.; Hoseinifar, S.H.; Van Doan, H.; Reverter, M. Effects of dietary 508 Russian olive, *Elaeagnus angustifolia*, leaf extract on growth, hematological, immunological, and 509 antioxidant parameters in common carp, *Cyprinus carpio*. *Aquaculture* **2021**, 1-7. 510 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736461>
16. Islam, M., S. Islam, M. R. Howlader, and N. S. Lucky. Comparative efficacy of albendazole, fenbendazole, and levamisole against gastrointestinal nematodiasis in cattle of Bangladesh. *International Journal of Biological Research*, 2015. 3:25–35. DOI: 10.1080/08997659.2016.1194908
17. Jia, R.; Wang, L.; Hou, Y.; Feng, W.; Li, B.; Zhu, J. Effects of Stocking Density on the Growth Performance, Physiological Parameters, Redox Status and Lipid Metabolism of *Micropterus salmoides* in Integrated Rice–Fish Farming Systems. *Antioxidants* 2022, 11, 1215. <https://doi.org/10.3390/antiox11071215>
18. Kousoulaki, K., Rønnestad, I., Olsen, H. J., Rathore, R., Campbell, P., Nordrum, S., et al. (2013). Krill hydrolysate free amino acids responsible for feed intake stimulation in Atlantic salmon (*Salmo salar*), *Aquaculture Nutrition*, 19, 47-61
19. Kpundeh, M.D.; Xu, P.; Yang, H.; Qiang, J.; He, J. Stocking densities and chronic zero culture water 673 exchange stress' effects on biological performances, hematological and serum biochemical indices of gift 674 tilapia juveniles (*Oreochromis niloticus*). *J Aquac Res Development* 2013, 4(5), 1-5. DOI: 10.4172/2155-675 9546.1000189 676.
20. Kumaran, S., B. Deivasigamani, K. M. Alagappan, and M. Sakthivel. (2010). Infection and immunization trials of Asian Seabass (*Lates calcarifer*) against fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Journal of Environmental Biology* 31: 539–541.
21. Leatherland, J. F., & Cho, C. Y. (1985). Effect of rearing density on thyroid and interrenal gland activity and plasma and hepatic metabolite levels in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Biol.*, 27, 583- 592.
22. Liu, B.L.; Fei, F.; Li, X.T.; Wang, X.Y.; Huang, B. Effects of stocking density on stress response, innate immune parameters, and welfare of turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquac. Int.* 2019, 27, 1599–1612. <https://doi.org/10.1007/s10499-019-00413-2>
23. Martínez-Porchas, M.; Rafael Martínez-Córdova, L.; Ramos-Enriquez, R. Cortisol and Glucose: Reliable indicators of fish stress? *Pan-Am. J. Aquat. Sci.* 2009, 4(2), 158–178.
24. Ming, J.H.; Ye, J.Y.; Zhang, Y.X.; Xu, P.; Xie, J. Effects of dietary reduced glutathione on growth performance, non-specific immunity, antioxidant capacity and expression levels of IGF-I and HSP70 mRNA of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Aquaculture*, 2015 438, 39-46. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.12.038>
25. Mahmoud, H.K.; Reda, F.M.; Alagawany, M.; Farag, M.R. Ameliorating deleterious effects of high 680 stocking density on *Oreochromis niloticus* using natural and



- biological feed additives. *Aquaculture* 2021, 681 26:4, 340-355. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735900> 682
26. Naderi, M.; Keyvanshokoh, S.; Salati, A.P.; Ghaedi, A. Effects of chronic high stocking density on liver 683 proteome of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiol. Biochem.* 2017, 43(5), 1373–1385. 684 <https://doi.org/10.1007/s10695-017-0378-8> 685
27. Năstac, L., Crețu, M., Dediu, L., Docan, A.I., Rîmniceanu, C., Vizireanu C. (2023). Effect of Krill Oil Supplementation and Stocking Density on Growth Performance, Proximate Composition, and Organo-somatic Indices of *Cyprinus carpio*. *European Journal of Biology and Biotechnology*, 4(1), 1-6, DOI: <http://dx.doi.org/10.24018/ejbio.2023.4.1.426>
28. Năstac, L., Dediu, L., Crețu, M., Rîmniceanu, C., Docan, A., Grecu, I., Vizireanu, C. (2023). The Protective Effects of Korill Product on Carp Fingerlings Reared in High Densities and Challenged with Albendazole Treatment. *Fishes*, 8(3), 153.
29. Nunes, A. J. P., Soares, A. N., Sabry-Neto, H., Burri, L. (2020). Effect of dietary graded levels of astaxanthin krill oil and high protein krill meal on the growth performance and stress resistance of postlarval *Litopenaeus vannamei* under hyper-intensive nursery culture. *Aquacult Nutr.* 1-15.
30. Opiyo, M.A.; Jumbe, J.; Ngugi, C.C.; Charo-Karisa, H. (2019). Dietary administration of probiotics modulates 686 non-specific immunity and gut microbiota of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in low input 687 ponds. *Int. J. Vet. Sci.*, 7(1), 1–9. <https://doi.org/10.1080/23144599.2019.1624299>.
31. Sahin, K.; Yazlak, H.; Orhan, C.; Tuzcu, M.; Akdemir, F.; Sahin, N. The effect of lycopene on antioxidant status in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) reared under high stocking density. *Aquaculture* 2014, 418–419, 132–138. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.10.009>
32. Souza, C.D.F, Baldissera, M.D., Baldisserotto, B., Heinzmann, B.M., Martos-Sitcha, J.A., Mancera J.M. Essential Oils as Stress-Reducing Agents for Fish Aquaculture: A Review. *Front. Physiol.* 2019, 10:785. doi: 10.3389/fphys.2019.00785
33. Shourbela, R.M.; El-Hawarry, W.N.; Elfadadny, M.R.; Dawood, M.A.O. Oregano essential oil enhanced the growth performance, immunity, and antioxidative status of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared under intensive systems. *Aquaculture* 542 2021, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736868>
34. Suárez, M.D.; Trenzado, C.E.; García-Gallego, M.; Furné, M.; García-Mesa, S.; Domezain, A.; Sanz, A. Interaction of dietary energy levels and culture density on growth performance and metabolic and oxidative status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquac. Eng.* 2015, 67, 59-66. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2015.06.001>
35. Saurabh, S.; Sahoo, P.K. Lysozyme: An important defence molecule of fish innate immune system. *Aquac. Res.* 2008, 39(3), 223–239. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01883.x>
36. Soltanian, S.; Vazirzadeh, A.; Akbary, P. Effect of Praziquantel on Hemato-Immunological Indices in Common Carp (*Cyprinus carpio*). *Iran J. Sci. Technol. Trans. A. Sci.* 2018, 42(3), 1015–1025. <https://doi.org/10.1007/s40995-017-0179-z>
37. Tavares-Dias, M., Martins, M. L., Moraes, F. R. (2000). Relacao hepatossomatica e esplenossomatica em peixes teleosteos de cultivo intenso. *Rev Bras Zool.*, 171, 273-281.
38. Wang, Y.; Xu, G.; Nie, Z.; Li, Q.; Shao, N.; Xu, P. Effect of Stocking Density on Growth, Serum Biochemical Parameters, Digestive Enzymes Activity and Antioxidant Status of Largemouth Bass, *Micropterus salmoides*. *Pak. J. Zool.* 2019, 51(4), 1509–1517. <https://doi.org/10.17582/journal.pjz/2019.51.4.1519.1526>



39. Wu, F.; Wen, H.; Tian, J.; Jiang, M.; Liu, W.; Yang, C.; Yu, L.; Lu, X. Effect of stocking density on growth performance, serum biochemical parameters, and muscle texture properties of genetically improved farm tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquac. Int.* 2018, 26(5), 1247–1259. <https://doi.org/10.1007/s10499-018-0281-z>

## **5. Cercetări privind influența silimarinei și berberinei asupra performanței de creștere, compoziției biochimice și stării de sănătate la *Cyprinus carpio***

### **5. 1. Introducere**

Ficatul, reprezintă principalul organ responsabil de metabolizarea compușilor endogeni și exogeni, jucând un rol crucial în funcționarea organismului. Este, de asemenea, unul dintre primele organe care sunt afectate de factorii de stres sau de substanțele toxice. Existența unor condiții de stres sau expunerea la substanțe precum metalele, biotoxinele și poluanții organici persistenți pot provoca leziuni hepatice la pești. Acest lucru se datorează faptului că ficatul este responsabil de procesul de detoxifiere și are capacitatea de a acumula diferiți contaminanți sau metaboliți asociați acestora. Astfel, menținerea funcției hepatice în limite normale este esențială pentru sănătatea și creșterea optimă a peștilor.

Plantele și extractele lor au fost utilizate în diverse scopuri încă din antichitate. În acvacultură, acestea au început să fie folosite ca aditivi în hrană pentru a îmbunătăți creșterea peștilor, stimularea imunității, cât și pentru a spori rezistența la boli.

Fructele de *Arumariu* (*Silybum marianum*) conțin aproximativ 2% amestec, numit silimarină, de flavonolignani alcătuit din silibină, silidianină, silicristină și izosilibină (A și B), cu o puternică activitate antioxidantă ([Kvasnička et al., 2003](#)), antiinflamatoare, imunomodulatoare și de regenerare a ficatului ([Abenavoli et al., 2018](#)). Silimarina (SM) are proprietăți antioxidante și antiinflamatorii, reduce colesterolul și grăsimile din sânge, fiind folosită în medicina umană pentru tratarea bolilor biliare și a altor boli legate de tractul gastrointestinal. S-a raportat că proprietățile antioxidante ale SM previn tulburările metabolice ale acestor celule prin inhibarea peroxidării lipidelor în celule hepatice, având un efect pozitiv pentru prevenirea metabolismului alterat al lipoproteinelor ([Halim și colab., 1997](#); [Schonfeld și colab., 1997](#)) precum și de reducere a enzimelor hepatice din sânge.

Cu toate acestea, mecanismul de acțiune al SM la pești este necunoscut. Studiile efectuate au demonstrat că administrarea SM în hrana peștilor reduce stresul oxidativ, modificările histopatologice și genotoxicitatea cauzate de expunerea crapului comun la un nivel subletal de deltametrină (insecticid) ([Jindal et al., 2019](#)). De asemenea, [Al-Shawi et al., 2021](#), a raportat că suplimentarea hranei cu SM ar putea modula leziunile cauzate de stres oxidativ și hepatotoxicitatea la crapul comun expus la o toxicitate subletală de clorură de cadmiu. Într-un studiu recent, [El-Houseiny și colab.,](#)

2022 au constatat că suplimentarea dietei somnului african (*Clarias gariepinus*) cu plante uscate de *S. marianum* (semințe, frunze și tulpini) timp de 60 de zile conduce la reducerea leziunilor histopatologice și atenuază efectele imunosupresoare ale toxicității fluorului.

Berberina (BBR) este un compus bioactiv, care aparține unei clase de compuși numiți alcaloizi. Aceasta este izolată din mai multe plante, fiind regăsită în rizomul, rădăcinile și tulpinile unor plante medicinale, cum ar fi *Berberis aristata*, *Coptis Chinensis Franch*, precum și *Berberis vulgaris L.* (Wang și colab., 2022). Conform lui Xu și colab., 2021, conținutul de BBR în aceste plante variază de la 0,05 mg/g la 96,10 mg/g, în timp ce *Berberis* este cea mai bogată sursă naturală de BBR.

În ultimii ani, mai multe studii au constatat că BBR prezintă rezultate promițătoare în tratamentul clinic al ficatului gras, obezității, hipertensiunii și diabetului de tip 2 (Ilyas și colab., 2002; Shinjyo și colab., 2020).

În acvacultură, BBR este recent utilizată ca aditiv funcțional în hrană, pentru prevenirea și tratarea unor boli bacteriene (Xu et al., 2017). De asemenea, s-a raportat că îmbunătățește răspunsul imunitar și capacitatea antioxidantă, precum și reducerea acumulării de lipide în ficat, reducerea colesterolului total (TC) și a trigliceridelor (TG) (Chen et al., 2016; Xu et al., 2017).

În contextul celor prezentate, scopul acestui experiment a fost de a evalua efectul administrării SM și a BBR, asupra indicatorilor tehnologici, precum și asupra compoziției biochimice a cărnii de crap. Totodată, s-a evaluat și influența acestor suplimente alimentare asupra stării de confort tehnologic a crapului, precum și efectul hepatoprotector după aplicarea unui "challenge test" cu paracetamol.

## 5.2. Design experimental

Puietul de crap (*Cyprinus carpio*) a fost achiziționat de la o fermă locală. După o perioadă de aclimatizare de două săptămâni, un număr total de 180 pești (masa medie individuală de 118,4± 11,09 g) au fost repartizați randomizat în sistemul recirculant, pentru a crea șase variante experimentale, în triplicat (Figura 5.1.).

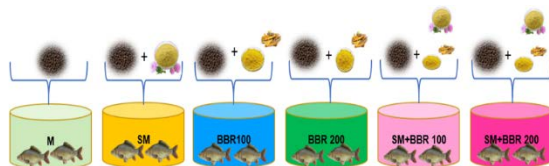
Pe tot parcursul perioadei experimentale peștii au fost hrăniți cu un furaj din gama Skretting cu un conținut de 40% proteină brută (PB), 10% lipide, 1,5% fibre, 6,8% cenușă (Skretting, Vignetto, Italia). Furajul a fost aditivat cu silimarină (SM) și berberină (BBR), fiind create astfel următoarele variante experimentale;

- Varianta M - varianta martor, în care peștii au fost hrăniți cu furaj cu 40% PB.
- Varianta SM – Furaj 40% PB, suplimentat cu 1 g silimarină/kg furaj;
- Varianta BBR100 - Furaj 40% PB, suplimentat cu 100 mg berberină/ kg furaj;
- Varianta BBR200 – Furaj 40% PB, suplimentat cu 200 mg berberină/kg furaj;

- Varianta SM+BBR100 - Furaj 40% PB, suplimentat cu 1 g silimarină/kg furaj +100 mg berberină/ kg furaj;
- Varianta SM+BBR200 - Furaj 40% PB, suplimentat cu 1 g silimarină/kg furaj +200 mg berberină/ kg furaj).

Intensitatea hrănirii a fost de 1,5 % din biomasă pe zi (BW/zi), biomasa din fiecare unitate de creștere fiind cântărită după 36 de zile experimentale pentru a ajusta cantitatea de hrană.

Fotoperioda a fost de 16 ore de lumină și 8 ore de întuneric. Pe toată durata cercetărilor experimentale, parametri de calitate a apei au fost monitorizați zilnic. Temperatura apei, pH-ul, oxigenul dizolvat au fost monitorizate automat cu ajutorul sistemului de monitorizare Endress+Hauser (Endress+Hauser AG, Elveția) prin intermediul sondelor plasate în fiecare bazin de creștere, în timp ce concentrațiile compușilor azotului au fost cuantificate săptămânal cu un analizor Skalar SAN++, Skalar Analytical, Olanda.



**Figura 5.1. Schema realizării experimentului**

Astfel, monitorizarea calității apei într-un sistem recirculant de acvacultură este esențială pentru a asigura un mediu optim pentru creșterea și sănătatea peștilor. O apă de o calitate necorespunzătoare, poate afecta fiziologia și creșterea peștilor, conducând la reacții patologice la nivelul organelor interne, ceea ce poate contribui și la creșterea ratei de mortalitate. Așadar, pe parcursul derulării experimentului, zilnic s-a urmărit evaluarea parametrilor de calitate ai apei, valorile medii înregistrate fiind încadrate în ecartul optim pentru creșterea crapului: temperatura  $21,8 \pm 3,14$  °C; pH =  $7,41 \pm 1,04$ ; oxigenul dizolvat  $7,29 \pm 1,13$  mg×L<sup>-1</sup>; amoniu  $0,09 \pm 0,05$  mg×L<sup>-1</sup>; nitrații <  $0,16$  mg×L<sup>-1</sup>; și nitriții <  $0,09$  mg×L<sup>-1</sup>.

După 64 de zile experimentale, 7 pești din fiecare variantă experimentală au fost selectați randomizat pentru a plica un test „challenge” cu paracetamol. Paracetamolul, este un medicament larg utilizat pentru ameliorarea durerii și reducerii febrei, poate ajunge în mediul acvatic prin diferite căi, inclusiv prin excreția directă a substanței active de către oameni sau prin eliminarea deșeurilor medicamentoase. Totodată este cunoscut faptul că paracetamolul, este un antipiretic care a fost de mult timp asociat cu toxicitate hepatică atunci când este administrat în doze peste cele terapeutice. Astfel, scopul testului „challenge” cu paracetamol a fost de a evalua dacă suplimentele administrate au influențat nivelul de toxicitate hepatică indus de paracetamol.

Astfel, imediat după experimentul de hrănire, o parte din pești au fost mutați într-un sistem experimental cu 12 acvarii de sticlă de 130 L. Doza a

fost administrată pe cale orală (500 mg paracetamol/greutate corporală) cu ajutorul unei seringi la capătul căruia are atașat un furtun. Administrarea paracetamolului s-a făcut în doză unică.

### 5.3. Rezultate și discuții

#### 5.3.1. Evaluarea performanței de creștere a puietului de crap

Scopul primar al acvaculturii este de a obține cea mai rapidă creștere, implicând un raport de conversie a hranei (FCR) cât mai scăzut, astfel că un prim obiectiv al experimentului nostru a fost de a evalua modul în care suplimentele alimentare folosite în hrana crapului influențează indicatorii de performanță a creșterii (Tabelul 5.1.).

La debutul experimentului, masa corporală medie inițială a exemplarelor de crap nu a prezentat diferențe semnificative ( $p > 0,05$ ) din punct de vedere statistic între cele șase variante experimentale.

După 36 de zile, se observă creșterea semnificativă ( $p < 0,05$ ) a masei corporale în varianta SM și M, în timp ce între celelalte variante experimentale masa corporală înregistrează valori ne semnificative din punct de vedere statistic ( $p > 0,05$ ) (Figura 5.2).

La finalul experimentului (după 64 de zile), masa corporală a crapului înregistrează valori semnificativ diferite ( $p < 0,05$ ) între cele șase variante experimentale. Astfel, cea mai mare masă corporală medie se înregistrează în variantele experimentale unde s-a administrat silimarină (SM) ( $195,60 \pm 10,12$  g), respectiv în varianta în care furajul a fost suplimentat cu BBR în concentrație de 200 mg/kg hrană ( $198,70 \pm 18,16$  g), în timp ce în variantele experimentale BBR 100, SM+BBR100 și SM+BBR200 masa medie finală a înregistrat cele mai mici valori (Figura 5.2; Tabelul 5.1.).

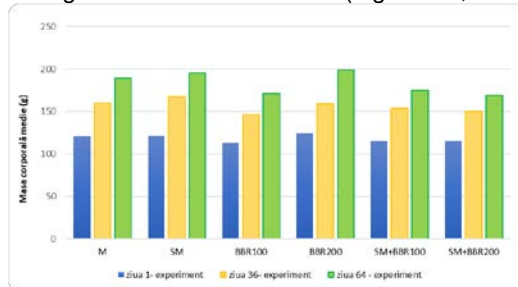


Figura 5.2. Evoluția masei corporale medii de crap de-a lungul perioadei experimentale

Tabelul 5.1. Indicatorii de performanță tehnologică ai puietului de crap după 64 de zile experimentale

Parametrii de creștere	M	SM	BBR100	BBR200	SM+BBR 100	SM+BBR 200
Numărul inițial de pești	10	10	10	10	10	10

Lăcrămioara NĂSTAC (Grădinaru) - Influența compușilor bioactivi din suplimentele alimentare asupra proceselor metabolice ale organismelor acvatice, 2023

Biomasa inițială (g)	1207± 8,56 <sup>a</sup>	1216± 7,23 <sup>a</sup>	1131± 9,76 <sup>a</sup>	1245± 9,76 <sup>a</sup>	1151± 5,23 <sup>a</sup>	1154± 3,12 <sup>a</sup>
Masa medie inițială (g)	120,70± 10,25 <sup>a</sup>	121,60± 9,12 <sup>a</sup>	113,10± 7,16 <sup>a</sup>	124,50± 5,2 <sup>a</sup>	115,10± 6,24 <sup>a</sup>	115,40± 4,65 <sup>a</sup>
Supraviețuirea (%)	100	100	100	100	100	100
Biomasa finală, (g)	1891,50± 16,65 <sup>b</sup>	1956± 19,65 <sup>a</sup>	1714± 18,50 <sup>c</sup>	1987± 20,16 <sup>a</sup>	1750± 16,24 <sup>c</sup>	1694± 14,29 <sup>c</sup>
Masa medie finală	189,15± 18,61 <sup>b</sup>	195,60± 10,12 <sup>a</sup>	171,40± 19,65 <sup>c</sup>	198,70± 18,16 <sup>a</sup>	175,03± 17,46 <sup>c</sup>	169,47± 10,12 <sup>c</sup>
Spor de creștere biomasă (g)	684,50± 6,65 <sup>b</sup>	740± 4,95 <sup>a</sup>	583± 9,67 <sup>c</sup>	742± 10,10 <sup>a</sup>	599,33± 9,96 <sup>c</sup>	540,67± 8,49 <sup>c</sup>
FCR, (g/g)	1,70± 0,04 <sup>b</sup>	1,47± 0,08 <sup>a</sup>	1,86± 0,05 <sup>b</sup>	1,46± 0,03 <sup>a</sup>	1,83± 0,02 <sup>b</sup>	2,10± 0,05 <sup>c</sup>
SGR (% zi <sup>-1</sup> )	0,70± 0,02 <sup>a</sup>	0,74± 0,01 <sup>b</sup>	0,65± 0,04 <sup>c</sup>	0,73± 0,02 <sup>b</sup>	0,65± 0,03 <sup>c</sup>	0,60± 0,03 <sup>c</sup>

Notă: Valorile reprezintă media triplicatelor ± S.D. Valorile cu litere diferite într-un rând indică diferențe semnificative (ANOVA,  $p < 0,05$ ) între variantele experimentale. FCR- Factorul de conversie al hranei; SGR- Rata specifică de creștere.

La finalul perioadei experimentale, s-a observat că în toate variantele experimentale, rata de supraviețuire a crapului a înregistrat un procent de 100%. Acest aspect confirmă faptul că atât condițiile mediale, cât și cele referitoare la hrănire au fost menținute în limite optime.

În ceea ce privește valorile factorului de conversie al hranei (FCR), calculat pentru cele șase variante experimentale, comparația statistică a evidențiat diferențe semnificative ( $p < 0,05$ ). Astfel, cel mai bun FCR a fost înregistrat în variantele experimentale în care s-a administrat silimarină (FCR-1,47±0,01 g/g), respectiv în varianta BBR200 (FCR- 1,46±0,03 g/g), observându-se o mai slabă utilizare a nutrienților în cazul variantei experimentale SM+BBR20 (FCR-2,10±0,05 g/g). Obținerea unor indicatori tehnologici superiori în variantele SM și BBR200 poate fi atribuită proprietăților hepatoprotectoare și imunostimulatoare ale acestor plante, însă efectul acestora asupra creșterii se află în strânsă corelație și cu doza administrată. Studii similare, realizate de alți cercetători au furnizat rezultate concludente în acest sens. Astfel, într-un studiu efectuat de [Wang și colab., 2019](#), a fost investigată adăugarea SM în hrana calcanului (*Scophthalmus maximus*, L) la diferite concentrații (100, 200 și 400 mg/kg hrană), iar rezultatele au arătat o performanță de creștere superioară la concentrația de 100 mg/kg hrană. Autorii au observat că administrarea SM la concentrații mai mari a condus la efecte imunomodulatorii și activare a proceselor inflamatorii în organism, ceea ce a redus eficiența reținerii nutrienților.

Contradictoriu cu cele relatate anterior, [Shahin și colab., 2023](#), obține în cazul larvelor de *Dicentrarchus labrax* performanțe de creștere superioare în cazul folosirii unor concentrații mult mai mari de SM. Astfel, folosind concentrații de 0, 200, 400, and 600 mg SM kg<sup>-1</sup> hrană, autorii obțin o

creștere semnificativă a performanței de creștere a larvelor de biban de mare direct proporțională cu creșterea cantității de SM din hrană.

În ceea ce privește efectul BBR asupra performanței de creștere, studiile efectuate au demonstrat că administrarea acesteia în hrană poate avea efecte benefice asupra performanței de creștere a peștilor. Astfel, [Van Doan și colab., 2020](#), afirmă că digestia și absorbția substanțelor nutritive în tractul digestiv al puietului de tilapia de Nil (*Oreochromis niloticus*) a fost îmbunătățită după administrarea BBR în hrană, timp de opt săptămâni. De asemenea, autorii au obținut o creștere semnificativă a ratei specifice de creștere, a sporului de creștere, a masei corporale a peștilor, nivelurile maxime fiind observate în cazul suplimentării cu 1 g BBR/kg hrană, în comparație cu 3, 6 și 9 g BBR/kg hrană.

Într-un studiu realizat de [Yi și colab., 2012](#), aditivarea hranei la *C. auratus gibelio*, la un nivel de 4 mg/kg hrană nu a condus la rezultate superioare în ceea ce privește creșterea peștilor. Diferențele raportate de aceste studii sunt datorate fie dozelor diferite în care au fost înglobate în hrană, fie sunt datorate de metabolismul diferit de la o specie la alta.

Cele mai multe studii au vizat evaluarea efectului BBR, atunci când sunt administrate furaje cu un conținut lipidic ridicat. În acvacultura intensivă, se practică utilizarea dietelor bogate în lipide, sau carbohidrați, datorită avantajelor lor în economisirea proteinelor și stimularea creșterii peștilor. Cu toate acestea, administrarea acestor furaje ridică probleme legate de acumularea excesivă de grăsimi în ficat, aspect ce reprezintă o pierdere de energie inutilă, având în vedere că un nutrient energetic este depozitat în ficat sau în masa viscerală.

Astfel, studiile efectuate subliniază potențialul BBR pentru folosirea în acvacultură ca aditiv alimentar, pentru tratarea disfuncției hepatice cauzate de dietele cu conținut ridicat de lipide și carbohidrați, datorită efectelor sale dovedite pentru tratarea tulburărilor metabolice, cum ar fi ficatul gras, hiperlipidemia, sugerându-se rolul său important în metabolismul glucozei și lipidelor ([Xu și colab., 2021](#)). În plus, suplimentarea cu berberină a dovedit și îmbunătățirea performanței de creștere, sănătatea intestinală, capacitatea antioxidantă și starea imunitară a peștilor în mai multe studii ([Doan și colab., 2020](#)).

După cele 64 de zile, rata specifică de creștere (SGR) a înregistrat valori semnificativ mai bune tot în variantele SM și M, urmate de varianta M. Un SGR mai scăzut a fost înregistrat în variantele SM+BBR200, BBR100 și SM+BBR 100.

Astfel, având în vedere variația semnificativă a rezultatelor raportate în literatura de specialitate, privind dozele optime în care aceste suplimente ar putea fi încorporate în hrană (SM și BBR), este necesar ca acestea să fie stabilite pentru fiecare specie de pești, cât și pentru fiecare stadiu de dezvoltare.

Din informațiile prezentate în literatura de specialitate, nu există până în prezent informații privind suplimentarea hranei peștilor cu SM și BBR. În cazul studiului nostru, s-a observat că adăugarea în hrană a unui g de SM/kg

hrană, în combinație cu 100 mg, respectiv 200 mg BBR/kg hrană, nu a condus la îmbunătățirea performanței de creștere a peștilor, masa medie finală, respectiv sporul de creștere al biomasei, înregistrând cele mai slabe valori în aceste variante experimentale.

Prin urmare, relația dintre performanța de creștere și suplimentarea hranei cu SM și BBR poate varia în funcție de specia de pește, modul de hrănire, dieta utilizată, precum și de doza și durata de administrare. Unii autori au raportat că utilizarea BBR în hrana peștilor pentru o perioadă prea îndelungată de timp, poate reduce efectul benefic al acesteia (Shan și colab., 2013). Acest aspect a fost raportat la mamifere, ipoteza fiind aceea că expresia intestinală a P-glicoproteinei este prea supraaglomerată de o doză prea mare sau de administrarea BBR pe termen lung, fapt care inhibă absorbția berberinei de către intestin (Shan și colab., 2013). Cu toate acestea, acest mecanism nu a fost raportat la pești și ar trebui studiat în continuare.

### 5.3.2. Evaluarea indicilor hepatosomatici și a compoziției biochimice a cărnii

În tabelul 5.2. sunt redate valorile indicilor somatici. Astfel, după cele 64 de zile experimentale, analiza statistică ANOVA nu a evidențiat diferențe semnificative ( $p > 0,05$ ) între variantele experimentale, pentru indicii somatici analizați.

**Tabelul 5.2. Indicii somatici la finalul experimentului de hrănire**

Indici corporali	M	SM	BBR100	BBR20	SM+BBR100	SM+BBR200
HSI	2,37± 0,18 <sup>a</sup>	1,91± 0,24 <sup>a</sup>	1,92± 0,38 <sup>a</sup>	1,69± 0,68 <sup>a</sup>	1,65± 0,21 <sup>a</sup>	2,09 ± 0,74 <sup>a</sup>
IGS (%)	6,82± 2,36 <sup>a</sup>	3,03± 2,35 <sup>a</sup>	4,32± 1,43 <sup>a</sup>	4,96± 0,09 <sup>a</sup>	5,40± 1,80 <sup>a</sup>	7,62± 5,68 <sup>a</sup>
SSI (%)	0,27± 0,07 <sup>a</sup>	0,28± 0,06 <sup>a</sup>	0,18± 0,01 <sup>a</sup>	0,33± 0,19 <sup>a</sup>	0,24± 0,06 <sup>a</sup>	0,23± 0,08 <sup>a</sup>

Notă: Valorile reprezintă media±SD a triplicatelor. Valorile cu litere diferite indică diferențe semnificative (ANOVA,  $p < 0,05$ ) între variantele experimentale.

Cu toate acestea, se poate observa o ușoară scădere a indicelui HSI în variantele în care hrana a fost aditivată cu suplimentele alimentare selectate, cel mai mare HSI fiind înregistrat în varianta martor. Un HSI mai mic indică o reducere a acumulării grăsimii sau a substanțelor toxice în ficat, aspect ce sugerează că SM și BBR a avut un efect benefic asupra sănătății hepatice a peștilor. Este cunoscut că ficatul gras poate conduce la apariția unor patologii metabolice la mamifere, de la steatoză la leziuni hepatocelulare, fibroză sau insuficiență hepatică (Dai și colab., 2015). Pe de altă parte, peștii sunt mai susceptibili la acumularea de grăsimi în ficat, deoarece ficatul este principala locație de depozitare a lipidelor. Totodată, în acvacultură, s-au observat deficiențe în creștere și o rată ridicată de mortalitate cauzate de ficatul gras, determinând consecințe economice semnificative.

După cele 64 de zile de hrănire, analiza statistică nu a evidențiat diferențe semnificative ( $p > 0,05$ ) în ceea ce privește conținutul de apă, proteine și cenușă, în timp ce conținutul de lipide a înregistrat valori semnificativ mai mici ( $p < 0,05$ ) în variantele în care s-a administrat aditivii alimentari în hrana peștilor.

**Tabelul 5.3. Compoziția biochimică a cărnii crapului după cele 64 de zile experimentale**

	M	SM	BBR100	BBR200	SM+BB R100	SM+BB R200
<b>Apa (%)</b>	78,44± 1,26 <sup>a</sup>	78,52± 0,64 <sup>a</sup>	79,30± 0,22 <sup>a</sup>	79,04± 1,32 <sup>a</sup>	79,09± 1,32 <sup>a</sup>	79,54± 0,26 <sup>a</sup>
<b>Proteina (%)</b>	17,06± 0,73 <sup>a</sup>	18,63± 0,17 <sup>a</sup>	17,54± 0,47 <sup>a</sup>	17,94± 0,53 <sup>a</sup>	17,69± 0,61 <sup>a</sup>	17,42± 0,56 <sup>a</sup>
<b>Lipidele (%)</b>	2,44± 0,88 <sup>a</sup>	1,44± 0,46 <sup>b</sup>	1,39± 0,08 <sup>b</sup>	1,32± 0,22 <sup>b</sup>	1,68± 0,28 <sup>a</sup>	1,31± 0,13 <sup>b</sup>
<b>Cenușa (%)</b>	1,12± 0,07 <sup>a</sup>	1,29± 0,09 <sup>a</sup>	1,26± 0,05 <sup>a</sup>	1,07± 0,05 <sup>a</sup>	1,72± 0,65 <sup>a</sup>	1,20± 0,24 <sup>a</sup>

Notă: Valorile reprezintă media±SD a triplicatelor. Valorile cu litere diferite indică diferențe semnificative (ANOVA,  $p < 0,05$ ) între variantele experimentale.

Cu toate că valorile proteinei nu a înregistrat diferențe semnificative între variantele experimentale, se poate observa o ușoară creștere a procentului de proteină în variantele în care au fost folosiți aditivii alimentari în hrana crapului. Astfel, aceste rezultate sugerează că aditivii alimentari pot fi utilizați eficient pentru a îmbunătăți calitatea cărnii de pește și pentru a satisface cerințele nutriționale ale consumatorilor care doresc să reducă aportul de lipide și să obțină o sursă mai sănătoasă de proteine.

### 5.3.3. Evaluarea parametrilor hematologici

După cele 64 de zile experimentale, cât și după administrarea dozei unice de paracetamol au fost determinați parametrii hematologici: hemoglobina (Hb), numărul de globule roșii (RBC), hematocritul (Ht), precum și constantele eritrocitare (VEM, HEM și CHEM).

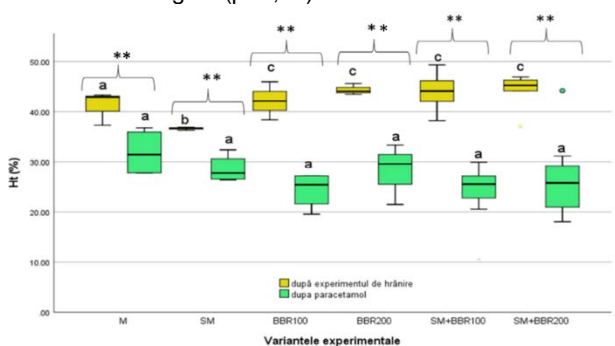
Astfel, la finalul experimentului de hrănire, analiza statistică a evidențiat diferențe semnificative ( $p < 0,05$ ), în ceea ce privește valorile Ht și RBC, în timp ce valorile Hb, VEM, HEM și CHEM nu au înregistrat diferențe semnificative ( $p > 0,05$ ) între cele șase variante experimentale.

După testul cu paracetamol, valorile parametrilor hematologici nu au indicat diferențe semnificative ( $p > 0,05$ ) între cele șase variante experimentale.

Procentul de hematocrit reflectă proporția de celule roșii din sânge în raport cu leucocitele și plasma. După cele 64 de zile de hrănire, nivelul hematocritului a înregistrat valori semnificativ diferite ( $p < 0,05$ ) între variantele experimentale (Figura 5.3.). Astfel, valorile Ht din varianta SM au înregistrat cele mai mici valori (36,62±0,31 %), fiind urmate de varianta M (41,15±3,35 %), în timp ce în variantele BBR100 (42,14±3,80 %), BBR200 (44,36±1,11



%), SM+BBR100 (43,98±3.77 %), respectiv SM+BBR200 (44,11±3,63 %), valorile au fost sensibil egale ( $p>0,05$ ).



**Figura 5.3.** Variația hematocritului – boxplot (mediana, valori minime, maxime și cvartilele)

Valorile cu litere diferite indică diferențe semnificative (Anova,  $p<0,05$ ) între variantele experimentale. Valorile cu \* indică diferențe ne semnificative (t dependent,  $p>0,05$ ) după testul cu paracetamol. Valorile cu \*\* indică diferențe semnificative după testul cu paracetamol (t dependent,  $p<0,05$ ).

După testul cu paracetamol, valorile Ht nu au înregistrat diferențe semnificative ( $p>0,05$ ) între cele șase variante experimentale.

Comparația statistică (T-test) a valorilor Ht după experimentul de hrănire cu cele după testul cu paracetamol a evidențiat diferențe semnificative în toate variantele experimentale. Cu toate că valorile hematocritului au prezentat o scădere semnificativă după administrarea supradozei de paracetamol, valorile obținute se încadrează în ecartul optim recomandat de literatura de specialitate (Tabelul 5.4).

**Tabelul 5.4.** Valori de referință pentru parametri hematologici la *Cyprinus carpio*

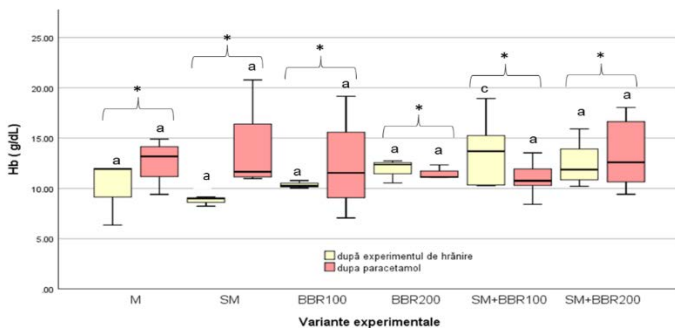
Masa corporală (g)	Ht (%)	Hb (g/dL)	RBC ( $\times 10^6/m^3$ )	VEM ( $\mu m^3$ )	HEM (pg)	CHEM (g/dL)	Referință
138,3±28,7	29±3	8,63±0,76	1,64±0,14	180,30±15,3	52,9±4,7	29±2,0	Sudova și colab., 2009
200	31,8±5,5	6,94±1,6	1,81±0,2	178,2±31,7	40,2±6,5	21,6±3,3	Tripathi și colab., 2004
61,2±7,3	22-39	3,76-8,76	0,90-2,02	133,7-248,4	36,9-57,8	15-32	Mikula și colab., 2008

*Lăcrămioara NĂSTAC (Grădinariu) - Influența compușilor bioactivi din suplimentele alimentare asupra proceselor metabolice ale organismelor acvatice, 2023*

<b>138± 28,7</b>	26±3	6,84± 0,9	1,05± 0,03	248,1± 36	65,2± 10	26,3± 0,13	Velisek și colab., 2010
<b>297,4± 55,6</b>	29,2± 2,7	7,43± 0,7	1,63± 0,13	179,5± 13,5	45,8± 4,2	25,5± 0,78	Velisek și colab., 2012
<b>41±0,2</b>	42,2± 0,5	11,24± 0,41	1,80± 0,02	234,5± 2,0	62,5± 1,6	26,67± 0,7	Gholami - Seyedk olaei și colab., 2013
<b>67,5± 9,1</b>	30,9± 3,5	7,18± 0,13	1,40± 0,09	217,2± 24,2	51,9± 8,2	24,1± 0,31	Yonar, 2013
<b>43,3± 7,7</b>	34,2± 5,7	7,66± 0,7	1,49± 0,12	230± 37,9	51± 7,5	23± 3, 79	Yonar și colab, 2014
<b>61,9± 2,4</b>	42,8± 4	9,4± 0,8	1,37± 0,19	317,9± 60,9	-	22,2± 3,3	Kuhlwei n și colab., 2014
<b>80±5</b>	24±1	10,2± 0,8	1,47± 0,2	176,6± 13,5	78,8± 10	44,6± 0,4	Bojarski și colab., 2015

În ceea ce privește valorile hemoglobinei, analiza statistică nu a evidențiat diferențe semnificative ( $p > 0,05$ ) după cele 64 de zile de hrănire. Cu toate acestea, valorile Hb au fost ușor mai scăzute în varianta SM (Figura 5.4.). După administrarea dozei unice de paracetamol, valorile hemoglobinei nu au înregistrat diferențe semnificative ( $p > 0,05$ ).

Comparația statistică a valorilor concentrației de hemoglobină după cele 64 de zile experimentale, cu cea a valorilor obținute după administrarea dozei unice de paracetamol nu a evidențiat diferențe semnificative ( $p > 0,05$ ). Cu toate acestea, se poate observa o ușoară creștere a Hb în toate variantele experimentale.

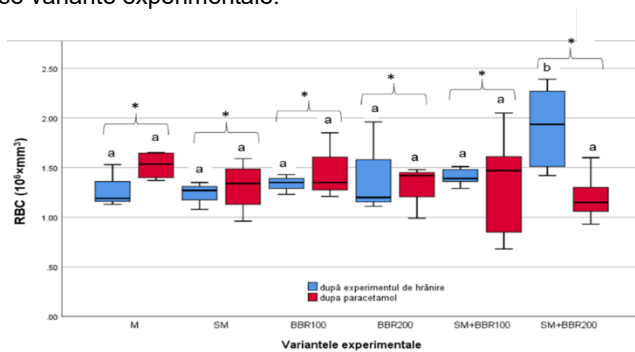


**Figura 5.4. Variația hemoglobinei– boxplot (mediانا, valori minime, maxime și cvartilele)**

Valorile cu litere diferite indică diferențe semnificative (Anova,  $p < 0,05$ ) între variantele experimentale. Valorile cu \* indică diferențe nesemnificative (t dependent,  $p > 0,05$ ) după testul cu paracetamol. Valorile cu \*\* indică diferențe semnificative după testul cu paracetamol (t dependent,  $p < 0,05$ ).

În general, situațiile de stres pot determina o creștere a hemoglobinei în sângele peștilor. Acest lucru poate fi o adaptare a organismului pentru a crește capacitatea de transport a oxigenului în perioadele solicitante.

După perioada de hrănire, numărul de eritrocite a înregistrat valori semnificativ mai ridicate în varianta SM+BBR200 ( $1,91 \pm 0,20 \times 10^6 \text{ mm}^3$ ) (Figura 5.5.), în timp ce după administrarea dozei de paracetamol, valorile eritrocitelor nu au înregistrat diferențe semnificative ( $p > 0,05$ ) între cele șase variante experimentale.

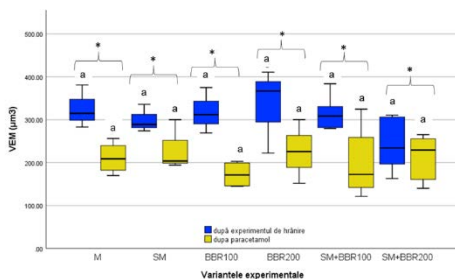


**Figura 5.5. Variația numărului de eritrocite- boxplot (mediانا, valori minime, maxime și cvartilele)**

Valorile cu litere diferite indică diferențe semnificative (Anova,  $p < 0,05$ ) între variantele experimentale. Valorile cu \* indică diferențe nesemnificative (t dependent,  $p > 0,05$ ) după testul cu paracetamol. Valorile cu \*\* indică diferențe semnificative după testul cu paracetamol (t dependent,  $p < 0,05$ ).

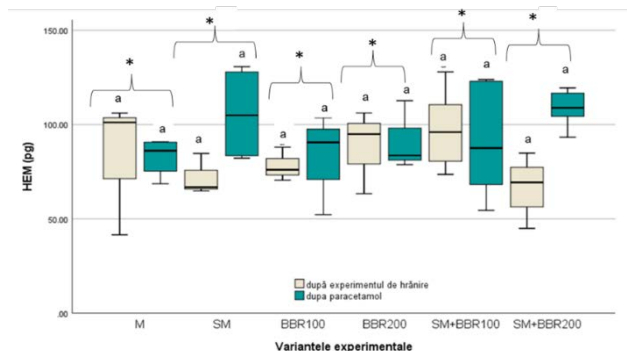
Comparând valorile numărului de eritrocite după cele 64 de zile experimentale, cu cel al valorilor obținute după administrarea dozei unice de paracetamol, testul T nu a evidențiat diferențe semnificative ( $p>0,05$ ).

În cea ce privește valorile constantelor eritrocitare VEM, HEM și CHEM analiza statistică nu a evidențiat diferențe semnificative ( $p>0,05$ ) după experimentul de hrănire sau după administrarea dozei de paracetamol ( $p>0,05$ )(Figurile 5.6; 5.7; 5.8). În ceea ce privește comparația statistică a valorilor constantelor eritrocitare după experimentul de hrănire, cu valorile după administrarea dozei de paracetamol, analiza statistică (T-test) a evidențiat diferențe semnificative ( $p<0,05$ ), doar în cazul CHEM în varianta BBR200.



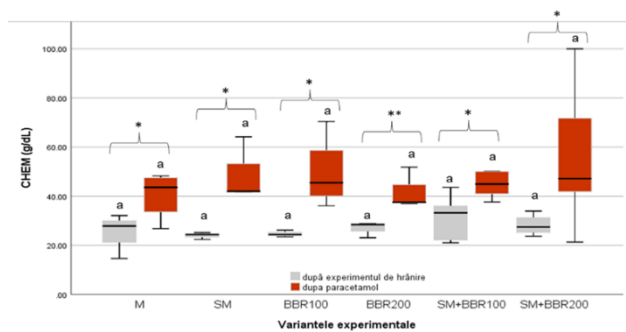
**Figura 5.6.** Variația VEM- boxplot (mediana, valori minime, maxime și cvartilele)

Valorile cu litere diferite indică diferențe semnificative (Anova,  $p<0,05$ ) între variantele experimentale. Valorile cu \* indică diferențe nesemnificative (t dependent,  $p>0,05$ ) după testul cu paracetamol. Valorile cu \*\* indică diferențe semnificative după testul cu paracetamol (t dependent,  $p<0,05$ ).



**Figura 5.7.** Variația HEM- boxplot (mediana, valori minime, maxime și cvartilele)

Valorile cu litere diferite indică diferențe semnificative (Anova,  $p<0,05$ ) între variantele experimentale. Valorile cu \* indică diferențe nesemnificative (t dependent,  $p>0,05$ ) după testul cu paracetamol. Valorile cu \*\* indică diferențe semnificative după testul cu paracetamol (t dependent,  $p<0,05$ ).



**Figura 5.8.** Variația CHEM- boxplot (mediana, valori minime, maxime și cvartilele)

Valorile cu litere diferite indică diferențe semnificative (Anova,  $p < 0,05$ ) între variantele experimentale. Valorile cu \* indică diferențe nesemnificative (t dependent,  $p > 0,05$ ) după testul cu paracetamol. Valorile cu \*\* indică diferențe semnificative după testul cu paracetamol (t dependent,  $p < 0,05$ ).

În studiul nostru, analiza parametrilor hematologici nu a evidențiat modificări majore, după administrarea suplimentelor alimentare selectate, cu excepția Ht și RBC, care a prezentat o scădere semnificativă a Ht în varianta SM, respectiv creșterea semnificativă a numărului de eritrocite în varianta SM+BBR200.

Rezultatele noastre sunt similare cu cele raportate de alți autori. Astfel, [Lukanov și colab., 2018](#), după administrarea SM (0,5%, respectiv 1%), în hrana *Japanese quails* nu a observat modificări semnificative ale numărului de eritrocite, Ht sau concentrației Hb. [Ahmadi și colab., 2012](#), a observat creșterea semnificativă a numărului de eritrocite, a hematocritului și a concentrației de hemoglobină, după administrarea în hrana păstrăvului curcubeu a SM (0,0, 0,1, 0,4, și 0,8 g/kg hrană), evidențiindu-se influența SM asupra organelor hematopoietice, cum ar fi splina și rinichiul, care joacă un rol important în formarea celulelor sanguine.

În ceea ce privește influența paracetamolului asupra parametrilor hematologici, s-a observat scăderea semnificativă ( $p > 0,05$ ) a hematocritului în toate variantele experimentale, respectiv scăderea CHEM în varianta experimentală BBR200, aspect ce nu sugerează apariția leziunilor celulare.

### 5.3.4. Evaluarea parametrilor serici

Unul din principalele obiective ale studiului de față a constat în evaluarea potențialului unor suplimente de natură fitobiotică precum SM și BBR, cât și a unor formule nutraceutice (mixtură de BBR și SM) asupra stării de sănătate a crapului, și evaluarea potențialului hepatoprotector al acestora după aplicarea unui test de tip "challenge" în care hepatotoxicitatea a fost indusă prin

administrarea unei supradoze de paracetamol. Astfel, la finalul experimentului de lungă durată, în care au fost administrate furaje suplimentate cu compușii menționați, au fost cuantificați o serie de parametri biochimici relevanți pentru evaluarea stării generale de sănătate. De asemenea, aceiași parametri au fost cuantificați după testul de toxicitate acută.

În tabelul 5.5. sunt prezentate valorile parametrilor serici la finalul experimentului de hrănire și după testul cu paracetamol. Atunci când este administrat în supradoză, paracetamolul provoacă hepatotoxicitate atât la oameni cât și la animalele de laborator, aceasta fiind ușor de pus în evidență de nivelul crescut al enzimelor hepatice alanin aminotransferazei (TGP sau ALT), aspartat aminotransferazei (TGO sau AST) și fosfataza alcalină (Kumar și colab. 2004; Yen și colab. 2007). S-a demonstrat că o creștere a valorilor TGO și TGP reflectă leziuni hepatice, în timp ce o creștere a nivelului de fosfatază alcalină (ALP) poate indica atât leziuni renale cât și leziuni hepatice (Bhattacharya și colab., 2005).

În general, pentru evaluarea leziunilor hepatice cauzate de paracetamol, se utilizează, în mod obișnuit, ca enzime marker, TGO și TGP. TGO este o enzimă găsită în mitocondriile și citoplasma tuturor celulelor, în timp ce TGP este o enzimă hepatocelulară citoplasmatică a cărei creștere la nivel sanguin indică afectarea ficatului. Prin urmare, TGP (ALT) este considerat un marker mai specific ficatului și este astfel un parametru mai potrivit pentru detectarea leziunilor hepatice și evaluarea amplitudinii acestora. Nivelurile crescute de TGO, TGP și ALP (fosfataza alcalină) pot indica scurgeri celulare și pierderea integrității funcționale a membranei celulei hepatocitelor. Nivelurile serice crescute de ALP indică, de asemenea, o creștere a presiunii biliare.

În cazul experimentului de hrănire, după cele 64 de zile de administrare a dozelor de SM și BBR, nu au fost înregistrate diferențe semnificative ( $p > 0,05$ ) între variantele testate, în ceea ce privește nivelul enzimelor TGO și TGP din sânge, acestea încadrându-se în ecartul valorilor considerate normale pentru specia luată în studiu (Nicula și colab., 2010). Cu toate acestea, valori TGP ușor mai scăzute sunt observate în variantele experimentale în care s-a administrat BBR în concentrații de 100 și 200 mg/kg furaj ( $8,00 \pm 1,82$  U/L și  $8,12 \pm 0,63$  U/L pentru variantele BBR100, respectiv BBR200).

După administrarea dozei unice de paracetamol, nivelul enzimelor TGP serice a crescut pentru toate variantele experimentale testate însă o creștere semnificativă ( $p < 0,05$ , testul T dependent) a fost detectată doar pentru varianta control (M) care a înregistrat valoarea medie TGP de  $42,50 \pm 8,58$  U/L, cu aproximativ 400% mai mare decât valoarea inițială. Aceiași tendință, de creștere a valorilor serice înregistrate după expunerea la paracetamol, în special la varianta control, a fost înregistrată și pentru TGO. Astfel, pentru loturile M, valoarea medie TGO a înregistrat  $364,25 \pm 78,88$  U/L, valoare semnificativ mai mare față de cea dinaintea de expunere ( $p < 0,05$ , testul T dependent) și față de valorile înregistrate pentru loturile experimentale, care au oscilat în ecartul  $218,00 \pm 44,21$  U/L și  $304,50 \pm 32,27$  U/L, diferențele dintre

acestea fiind nesemnificative din punct de vedere statistic ( $p < 0,05$ , testul ANOVA).

Rezultatele obținute în urma testului de toxicitate acută, realizat prin administrarea paracetamolului în doză unică (500mg/kg corp), evidențiază faptul că atât SM, BBR cât și variantele nutraceutice testate (SM+BBR100 și SM+BBR200) au un efect hepatoprotector, ambele valori TGP și TGO fiind crescute nesemnificativ după expunere.

Valorile fosfatazei alcaline (ALP) măsurate la crapii expuși la paracetamol au înregistrat o creștere semnificativă ( $p < 0,05$ , testul T dependent) pentru loturile martor în timp ce, pentru loturile experimentale creșterea a fost nesemnificativă statistic ( $p > 0,05$ ). Se constată astfel, că la finalul testului de toxicitate indusă, valorile cele mai reduse ale ALP au fost înregistrate la variantele BBR200 (154,00±77,6 U/L), BBR100 (173,33±49,80 U/L) și SM+BBR200 (179,25±78,54 U/L) situație care conturează ideea că, berberina a avut o contribuție mai pregnantă decât silimarina ca agent hepatoprotector, cel puțin din perspectiva ALP. În varianta BBR200 creșterea ALP după expunerea la paracetamol a fost de doar 7%.

SM administrată oral la alte specii precum *Oncorhynchus mykiss* a stabilizat, de asemenea, structura membranei celulare și a reglat nivelurile activității AST, ALT și ALP în condițiile utilizării unor concentrații de până la 400 mg/kg corp (Banaee și colab., 2011). Într-un studiu realizat pe specia *Cyprinus carpio* se arată faptul că silimariana protejează hepatocitele împotriva leziunilor tisulare induse de clorura de cadmiu doar la concentrații de 2400 mg/kg dieta (Al-Shawi și colab., 2021).

De-a lungul istoriei medicinei, fructele unor plante precum *Berberis vulgaris* au fost utilizate, totodată, pentru efecte benefice asupra funcției biologice a ficatului și a sistemului cardiovascular prin reducerea trigliceridelor, colesterolului, lipoproteinelor cu densitate scăzută și a tensiunii arteriale datorită compușilor săi bioactivi unici, cum ar fi berberina (Ardestani et al., 2013)(Zarei et al., 2015).

În studiul nostru, nivelurile de TG din serul peștilor hrăniți cu furaj îmbogățit cu BBR, SM și BBR+SM au scăzut semnificativ ( $p < 0,05$ , testul ANOVA) în comparație cu grupul de control. Deși între variantele experimentale în care s-a suplimentat fie SM, fie BBR în diferite concentrații, nu au fost înregistrate diferențe semnificative din punct de vedere statistic, se poate observa faptul că, valorile TG au fost mai scăzute în variantele SM+BBR100 (343,5±53,78 mg/dL) și SM+BBR200 (342,6±48,71 mg/dL) în care s-a pus în evidență efectul sinergic al SM și BBR.

Rezultate similare au fost raportate pentru sturionul *Acipenser baeri* (Ramezan și colab., 2021) a cărui dietă suplimentată cu BBR, în concentrații de 150, 300, 600, și 750 mg/kg, s-a corelat negativ cu valorile TG înregistrate în serul peștilor. BBR a fost, de altfel, raportată ca fiind un agent eficient de scădere a lipidelor serice prin reducerea sintezei TG prin stimularea activității proteinkinazei activată de adenozin monofosfat (AMP), care joacă un rol cheie în homeostazia energiei celulare (Brusq și colab., 2006).

Tabelul 5.5. Valorile (Media±S.D) parametrilor serici la finalul experimentului de hrănire și după testul cu paracetamol

Parametrul	După experimentul de hrănire					
	M	SM	BBR100	BBR200	SM+BBR100	SM+BBR200
TG (mg/dL)	458±81,93 <sup>c</sup>	370,33±76,44 <sup>b</sup>	367,00±67,39 <sup>b</sup>	347,29±45,74 <sup>b</sup>	343,5±53,78 <sup>a</sup>	342,6±48,71 <sup>a</sup>
CHOL (mg/dL)	268,33±33,07 <sup>c</sup>	234,00±16,7 <sup>b</sup>	196,75±9,81 <sup>a</sup>	225,00±22,99 <sup>b</sup>	225,66±12,5 <sup>b</sup>	214,5±20,69 <sup>a</sup>
LDL (mg/dL)	115,10±4,56 <sup>d</sup>	98,22±11,22 <sup>c</sup>	53,67±7,55 <sup>b</sup>	46,67±9,34 <sup>a</sup>	64,34±8,56 <sup>b</sup>	54,76±6,55 <sup>b</sup>
HDL (mg/dL)	44,71±6,32 <sup>a</sup>	42,73±8,12 <sup>a</sup>	77,50±9,10 <sup>b</sup>	89,88±8,45 <sup>c</sup>	75,43±6,77 <sup>b</sup>	82,12±7,45 <sup>b</sup>
TGP/ ALT (U/L)	10,25±1,25 <sup>a</sup>	10,00±3,00 <sup>a</sup>	8,00±1,82 <sup>a</sup>	8,12±0,63 <sup>a</sup>	9,33±4,03 <sup>a</sup>	8,33±1,96 <sup>a</sup>
TGO/ AST (U/L)	174±19,71 <sup>a</sup>	142,67±49,03 <sup>a</sup>	134,79±8,86 <sup>a</sup>	188,67±37,11 <sup>a</sup>	199,5±55,47 <sup>a</sup>	147,8±22,81 <sup>a</sup>
FOSFATAZA/ ALP (U/L)	186±48,46 <sup>a</sup>	158,33±27,28 <sup>a</sup>	144,67±20,71 <sup>a</sup>	147±54,72 <sup>a</sup>	185,66±68,19 <sup>a</sup>	155,25±77,10 <sup>a</sup>
GGT (U/L)	1,33±0,47 <sup>a</sup>	1,23±0,75 <sup>a</sup>	0,92±0,09 <sup>a</sup>	1,00±0,44 <sup>a</sup>	1,38±0,33 <sup>a</sup>	1,45±0,32 <sup>a</sup>
BILD (mg/dL)	0,18±0,05 <sup>a</sup>	0,13±0,03 <sup>a</sup>	0,15±0,01 <sup>a</sup>	0,18±0,04 <sup>a</sup>	0,12±0,03 <sup>a</sup>	0,15±0,02 <sup>a</sup>
BILT (mg/dL)	0,31±0,06 <sup>b</sup>	0,20±0,02 <sup>a</sup>	0,21±0,06 <sup>a</sup>	0,23±0,09 <sup>a</sup>	0,19±0,02 <sup>a</sup>	0,21±0,01 <sup>a</sup>
Parametrul	După paracetamol					
	M	SM	BBR100	BBR200	SM+BBR100	SM+BBR200
TG (mg/dL)	141,00±29,81 <sup>a**</sup>	189,25±38,59 <sup>b*</sup>	186,75±41,55 <sup>b*</sup>	181,75±38,81 <sup>b**</sup>	182,25±28,50 <sup>b**</sup>	163,25±27,73 <sup>b**</sup>
CHOL (mg/dL)	187,25±32,01 <sup>a**</sup>	173,25±14,10 <sup>a**</sup>	206,50±27,19 <sup>a*</sup>	168,25±24,40 <sup>a**</sup>	156,00±25,17 <sup>a**</sup>	170,50±18,77 <sup>a*</sup>
LDL (mg/dL)	95,10±4,56 <sup>d**</sup>	78,22±11,22 <sup>c**</sup>	44,67±7,55 <sup>b**</sup>	39,61±7,24 <sup>a**</sup>	44,98±7,65 <sup>b**</sup>	39,16±8,34 <sup>b**</sup>
HDL (mg/dL)	34,71±6,32 <sup>a**</sup>	35,73±8,12 <sup>a**</sup>	68,20±9,10 <sup>b*</sup>	82,33±4,95 <sup>c*</sup>	70,43±7,37 <sup>b*</sup>	77,12±7,45 <sup>b*</sup>
TGP/ ALT (U/L)	42,50±8,58 <sup>b**</sup>	25,50±8,54 <sup>a*</sup>	26,00±2,58 <sup>a*</sup>	29,75±12,39 <sup>a*</sup>	25,30±0,57 <sup>a*</sup>	29,75±4,71 <sup>a*</sup>
TGO/ AST (U/L)	364,25±78,88 <sup>b**</sup>	218,00±44,21 <sup>a*</sup>	295,25±88,68 <sup>a*</sup>	304,50±32,27 <sup>a*</sup>	242,00±24,12 <sup>a*</sup>	273,20±79,95 <sup>a*</sup>
FOSFATAZA/ ALP (U/L)	294,50±15,02 <sup>c**</sup>	183,67±64,01 <sup>b*</sup>	173,33±49,80 <sup>a*</sup>	154,00±77,6 <sup>a*</sup>	199,5±23,01 <sup>b*</sup>	179,25±78,54 <sup>b*</sup>
GGT (U/L)	2,90±0,85 <sup>c**</sup>	1,55±0,42 <sup>b*</sup>	1,27±0,25 <sup>a*</sup>	1,15±0,20 <sup>a*</sup>	1,50±0,57 <sup>b*</sup>	2,00±1,55 <sup>b*</sup>
BILD (mg/dL)	0,26±0,04 <sup>c**</sup>	0,16±0,03 <sup>a*</sup>	0,22±0,01 <sup>b**</sup>	0,24±0,05 <sup>b*</sup>	0,15±0,04 <sup>a*</sup>	0,20±0,01 <sup>b*</sup>
BILT (mg/dL)	0,46±0,06 <sup>c**</sup>	0,27±0,04 <sup>a*</sup>	0,31±0,04 <sup>a**</sup>	0,35±0,10 <sup>a*</sup>	0,25±0,10 <sup>a*</sup>	0,34±0,09 <sup>b*</sup>

Notă: Valorile cu litere diferite indică diferențe semnificative (Anova,  $p < 0,05$ ) între variantele experimentale. Valorile cu \* indică diferențe nesemnificative (t dependent,  $p > 0,05$ ) după testul cu paracetamol. Valorile cu \*\* indică diferențe semnificative după testul cu paracetamol (t dependent,  $p < 0,05$ ).



În ceea ce privește colesterolul total (CHOL), după experimentul de hrănire, valorile serice medii au fost semnificativ mai mici în variantele experimentale în care s-a administrat hrană îmbogățită cu aditivi alimentari, comparativ cu varianta martor. De remarcat însă, este faptul că cele mai mici valori au fost înregistrate în grupurile în care s-a administrat BBR, fie ca supliment unic (în varianta BBR100 concentrația medie a fost de  $196,75 \pm 9,81$  mg/dL), fie în combinație nutraceutică cu SM (în varianta BBR100 concentrația medie a fost de  $214,5 \pm 20,69$  mg/dL). De asemenea, valorile fracțiunilor de colesterol arată faptul că BBR a influențat pozitiv raportul HDL/LDL (Tabel 5.4). Astfel, în varianta BBR200 s-a înregistrat cea mai mică concentrație LDL ( $46,67 \pm 9,34$  mg/dL), urmată de variantele BBR100, SM+BBR200 și SM+BBR200; valoarea cea mai mare a fost înregistrată pentru varianta martor ( $115,10 \pm 4,56$  mg/dL) aceasta fiind semnificativ mai mare comparativ cu valorile medii înregistrate pentru restul variantelor experimentale. Frațiunea HDL a înregistrat cele mai mici valori la variantele martor și SM ( $44,71 \pm 6,32$  mg/dL respectiv  $42,73 \pm 8,12$  mg/dL).

Dozele mari de paracetamol epuizează rapid nivelurile hepatice de glicogen, trigliceride și colesterol, indicând afectarea metabolismului carbohidraților și lipidelor. Pierderea glicogenului sau a lipidelor poate apărea ca efect direct al intoxicației sau poate apărea secundar ca urmare a alterării stării generale a corpului cauzată de foame, stres sau boală concomitentă (Wolf și Wolfe, 2005).

De asemenea, s-a demonstrat că atât dozele subtoxice, cât și dozele toxice de paracetamol reduc genele căilor biochimice consumatoare de energie, inclusiv gluconeogeneza (glucoză-6-fosfatază), sinteza acizilor grași (sterol-C4-metil oxidază) și sinteza colesterolului (3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A sintaza 1) și reglează genele biochimice producătoare de energie, cum ar fi glicoliza/gluconeogeneza (6-fosfofructo-2-kinaza/fructoza-2,6-bisfosfataza 1) (Yuxia și Richard 2010). În cazul peștilor hrăniți cu furaj suplimentat cu SM și BBR (variantele experimentale SM și BBR100) nivelul trigliceridelor a scăzut nesemnificativ după expunerea la paracetamol, sugerând acțiunea reglatoare a acestor suplimente.

Colesterolul a fost, de asemenea, folosit în numeroase studii de cercetare anterioare ca instrument de diagnostic pentru monitorizarea biologică a stării peștilor de crescătorie (Clifton și colab., 2010). În consecință, metabolii energetici crescuți, cum ar fi colesterolul total (CHOL), HDL și LDL, pot indica probleme metabolice ale lipidelor sau lipoproteinelor sau disfuncție hepatică. Rezultatele obținute după testul de provocare toxică au relevat faptul că nivelul colesterolului total și a fracțiunilor de colesterol a scăzut pentru toate variantele experimentale. Se poate remarca însă, cu ușurință, faptul că, din perspectiva metabolismului lipidic, varianta martor a fost cea mai expusă efectului negativ al hepatotoxicității induse de paracetamol în timp ce, variantele cu scăderi nesemnificative de . De asemenea, în ceea ce privește varianta BBR100 a înregistrat cea mai redusă depreciere a valorilor CHOL în timp ce pentru în variantele BBR200 și HDL și LDL.

GGT ( $\gamma$ -glutamil transferaza) cunoscută și sub denumirea de gamma-glutamil transpeptidază, este o enzimă prezentă în principal în ficat, dar și în alte țesuturi, cum ar fi rinichii, pancreasul și splina. Funcția principală a GGT constă în transferul de grupe  $\gamma$ -glutamil de la peptide și aminoacizi către alte molecule, cum ar fi aminotransferazele, și în hidroliza  $\gamma$ -glutamilmcisteinilglicinei (un precursor al

glutationului). GGT este adesea utilizată ca un marker enzimatic pentru evaluarea funcției hepatice. Concentrațiile ridicate ale GGT în sânge pot indica diferite afecțiuni hepatice, în special afectarea căilor biliare.

Bilirubina este un pigment galben-portocaliu rezultat din degradarea hemoglobinei din eritrocitele (globulele roșii) vechi. Este produsă în principal în ficat și este un component important al bilei, care joacă un rol esențial în digestia grăsimilor. Există două forme principale de bilirubină: bilirubina totală și bilirubina directă (conjugată). Bilirubina totală reprezintă suma bilirubinei directe și a bilirubinei indirecte (neconjugate). Bilirubina indirectă este forma de bilirubină care se formează inițial în procesul de degradare a hemoglobinei. Este insolubilă în apă și trebuie să fie transportată în ficat pentru a fi procesată și eliminată. În ficat, bilirubina indirectă este conjugată cu acidul glucuronic pentru a forma bilirubina directă.

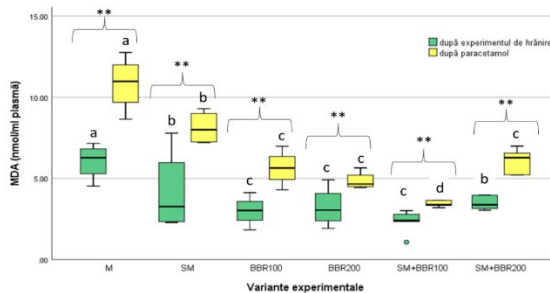
În studiul de față, după experimentul de hrănire, nu au fost înregistrate diferențe semnificative între mediile valorilor GGT și BILD aferente loturile experimentale testate ( $p > 0,05$  la testarea ANOVA). În cea ce privește BILT, acesta a înregistrat o valoare medie semnificativ mai mare față de loturile experimentale ( $p < 0,05$  la testarea ANOVA). De asemenea, după expunerea la paracetamol, valorile GGT, BILD și BILT au crescut semnificativ ( $p < 0,05$  la testarea T dependent) în loturile martor. În variantele experimentale în care au fost testate compușii de natură fitobiotică și asocierea nutraceutică BBR+ SM nu au fost înregistrate creșteri semnificative ale parametrilor menționați excepția variantei BBR100 unde parametrii BILD și BILT au înregistrat creșteri semnificative. Se poate observa totodată că cele mai mici valori ale BILD și BILT au fost înregistrate pentru loturile în care s-a administrat SM ca și compus unic ( $0,16 \pm 0,03$  mg/dL respectiv  $0,27 \pm 0,04$  mg/dL) și cele în care s-a administrat asocierea silimarină cu berberină în doze de 100 mg/kg furaj.

Efectele ameliorative ale BBR și SM au fost astfel evidențiate atât prin modularea activității gamma-glutamil transferazei, cât și cea a bilirubinei. Bilirubina este considerată a fi unul dintre cei mai puternici antioxidanți endogeni, concentrațiile sale serice fiind afectate predominant de activitatea bilirubinei hepatice. Astfel bilirubina intervine în protecția celulelor atunci când acestea sunt expuse la efectele negative ale compușilor toxici (Tomaro & Batlle, 2002). Valorile mari ale bilirubinei în varianta martor reflectă indirect eșecul funcției hepatice din cauza hepatotoxicității induse de paracetamol. Totodată, protecția oferită de SM împotriva toxicității hepatice indusă de paracetamol poate fi în general legată de o serie de proprietăți benefice printre care se numără eliminarea radicalilor liberi, creșterea conținutul celular de GSH și reglarea permeabilită membranare (Sabi și colab., 2015). Mai mult decât atât, în cazul de față, prin asocierea SM cu BBR în concentrație de 100 mg/kg furaj acest efect a fost potențat datorită proprietăților antioxidante ale BBR.

### **5.3.5. Evaluarea stresului oxidativ, a capacității antioxidante și activității lizozimului**

În figurile 5.9 - 5.12 sunt prezentați parametri de stres oxidativ și activitatea lizozimului, după cele 64 de zile experimentale, cât și după testul cu paracetamol.

După cele 64 de zile experimentale, concentrația MDA din plasmă a înregistrat diferențe semnificative între cele șase variante experimentale (Figura 5.9).



**Figura 5.9.** Variația MDA- boxplot (mediانا, valori minime, maxime și cvartilele)

Valorile cu litere diferite indică diferențe semnificative (Anova,  $p < 0,05$ ) între variantele experimentale. Valorile cu \* indică diferențe nesemnificative (t dependent,  $p > 0,05$ ) după testul cu paracetamol. Valorile cu \*\* indică diferențe semnificative după testul cu paracetamol (t dependent,  $p < 0,05$ ).

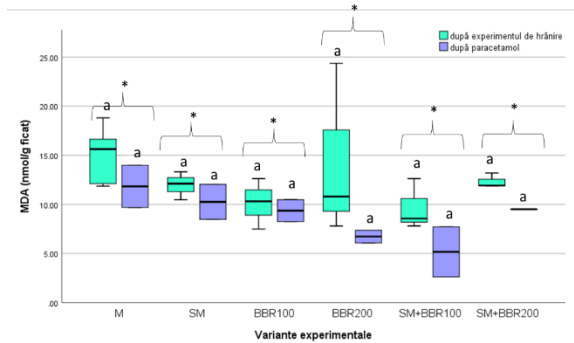
Cea mai mică concentrație a MDA a fost înregistrată în variantele SM+BBR100 ( $2,34 \pm 0,67$  nmol/mL plasmă), BBR100 ( $3 \pm 0,93$  nmol/mL plasmă), BBR200 ( $3,24 \pm 1,24$  nmol/mL plasmă), SM+BBR200 ( $3,72 \pm 0,88$  nmol/mL plasmă). Cea mai mare concentrație a fost observată în varianta M ( $6,06 \pm 1,11$  nmol/mL plasmă), în timp ce în varianta în care s-a administrat SM valoarea MDA a fost de  $4,15 \pm 2,56$  nmol/mL plasmă.

MDA este un indicator folosit în mod obișnuit pentru evaluarea peroxidării lipidelor. În studiul nostru, nivelul crescut de MDA plasmatic în cazul variantei martor poate indica un ușor dezechilibru între generarea și eliminarea de specii reactive de oxigen (ROS). Rezultatele obținute au arătat că suplimentarea hranei cu BBR și SM a redus daunele oxidative din plasmă prin reducerea producției de MDA.

În ceea ce privește valorile MDA din ficat, acestea nu au înregistrat diferențe semnificative ( $p > 0,05$ ) atât după experimentul de hrănire, după testul cu paracetamol, cât și la comparația valorilor MDA după cele 64 de zile cu valorile MDA după testul cu paracetamol ( $p > 0,05$ ). Cu toate acestea, din analiza datelor obținute, se poate observa că în cazul variantei M, valorile MDA sunt ușor mai crescute, atât după experimentul de hrănire ( $15,10 \pm 2,71$  nmol/mL plasmă), cât și după testul cu paracetamol ( $10,48 \pm 2,20$  nmol/mL plasmă) (Figura 5.10).

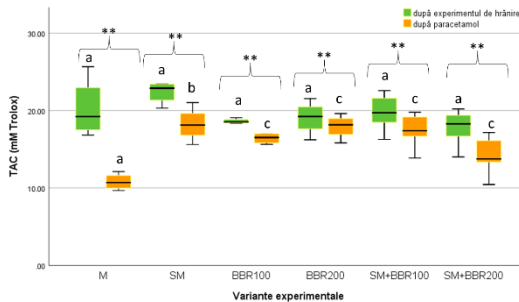
După cele 64 de zile de hrănire, capacitatea antioxidantă totală la nivelul plasmăi nu a prezentat diferențe semnificative ( $p > 0,05$ ) între cele șase variante experimentale (Figura 5.11.). Cu toate acestea se poate observa o ușoară creștere a valorilor TAC în varianta martor.

După administrarea dozei unice de paracetamol, valori semnificativ mai ridicate au fost înregistrate în varianta în care s-a administrat SM, urmate de variantele SM+BBR200, BBR100, BBR200, SM+BBR10. Cea mai scăzută valoare a MDA a fost înregistrată în varianta M.



**Figura 5.10.** Variația MDA ficat- boxplot (mediana, valori minime, maxime și cvartilele)

Valorile cu litere diferite indică diferențe semnificative (Anova,  $p < 0,05$ ) între variantele experimentale. Valorile cu \* indică diferențe nesemnificative (t dependent,  $p > 0,05$ ) după testul cu paracetamol. Valorile cu \*\* indică diferențe semnificative după testul cu paracetamol (t dependent,  $p < 0,05$ ).



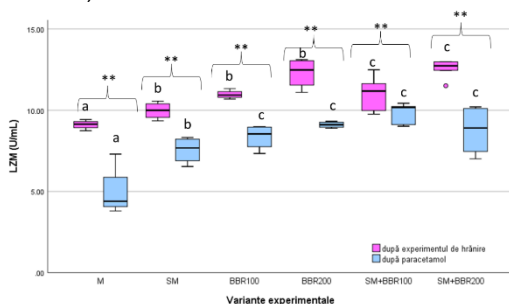
**Figura 5.11.** Variația TAC- boxplot (mediana, valori minime, maxime și cvartilele)

Valorile cu litere diferite indică diferențe semnificative (Anova,  $p < 0,05$ ) între variantele experimentale. Valorile cu \* indică diferențe nesemnificative (t dependent,  $p > 0,05$ ) după testul cu paracetamol. Valorile cu \*\* indică diferențe semnificative după testul cu paracetamol (t dependent,  $p < 0,05$ ).

Potrivit studiilor efectuate, s-a constatat că există o relație inversă între peroxidarea lipidică și capacitatea totală de antioxidanți, ceea ce înseamnă că scăderea nivelului de malondialdehidă conduce la creșterea procentului de antioxidanți în organism (Lupoe și colab., 2011). Rezultatele noastre au demonstrat că în variantele experimentale în care s-au adăugat aditivi suplimentari în hrană, concentrația de MDA a scăzut, în timp ce valorile TAC au crescut, evidențiind astfel efectul pozitiv al acestor aditivi în combaterea stresului oxidativ. Prin urmare, adăugarea de SM și BBR în hrana crapului poate contribui la menținerea un raport echilibrat între oxidanți și antioxidanți, prevenind astfel apariția stresului oxidativ.

În ceea ce privește activitatea LZM, după cele 64 de zile experimentale, analiza statistică ANOVA a evidențiat diferențe semnificative ( $p < 0,05$ ) între cele șase variante experimentale, activitatea LZM din variantele SM+BBR100 ( $12,29 \pm 0,94$  U/mL), SM+BBR200 ( $12,7 \pm 0,74$  U/mL) fiind semnificativ mai ridicată decât cea din variantele BBR200 ( $11,04 \pm 1,05$  U/mL), BBR100 ( $10,97 \pm 0,26$  U/mL), SM ( $9,97 \pm 0,53$  U/mL). Cea mai scăzută activitate a LZM a fost observată în varianta martor ( $9,11 \pm 0,29$  U/mL).

După testul cu paracetamol, analiza statistică a evidențiat diferențe semnificative ( $p < 0,05$ ) între variantele experimentale. Astfel, cea mai scăzută activitate a LZM a fost înregistrată în varianta M ( $4,97 \pm 1,57$  U/mL). Valorile LZM din varianta în care s-a administrat BBR100 ( $8,35 \pm 0,77$  U/mL), BBR200 ( $9,10 \pm 0,19$  U/mL), SM+BB100 ( $9,86 \pm 0,62$  U/mL), respectiv SM+BBR200 ( $8,76 \pm 1,39$  U/mL) au fost semnificativ mai crescute prin comparația cu varianta în care s-a administrat SM100 ( $7,55 \pm 0,82$  U/mL).



**Figura 5.12. Variația LZM- boxplot (mediana, valori minime, maxime și cvartilele)**

Valorile cu litere diferite indică diferențe semnificative (Anova,  $p < 0,05$ ) între variantele experimentale. Valorile cu \* indică diferențe nesemnificative (t dependent,  $p > 0,05$ ) după testul cu paracetamol. Valorile cu \*\* indică diferențe semnificative după testul cu paracetamol (t dependent,  $p < 0,05$ ).

Rezultatele noastre sunt comparabile cu studiile anterioare, care au demonstrat că administrarea de SM sau BBR în hrana peștilor, poate reduce nivelul radicalilor liberi, crescând totodată activitatea enzimelor antioxidante, contribuind implicit la reducerea stresului oxidativ.

În concluzie, administrarea SM și BBR în hrana crapului a condus la îmbunătățirea stării imunitare a peștilor, dovedind totodată efectul hepatoprotector al acestora.

#### 5.4. Concluzii

În ultimii ani, leziunile hepatice au o incidență ridicată printre organismele acvatice. Peștii din fermele de acvacultură suferă de „sindromul hepatic”, având ca simptomatologie curentă mărirea considerabilă a ficatului (de până la două-trei ori față de dimensiunea inițială) și schimbarea culorii. Cauzele acestor manifestări nu sunt clare, nefiind identificate bacterii sau virusuri patogene asociate sindromului hepatic.

Provocarea xenobiotică indusă de prezența unor compuși farmaceutici în mediul acvatic reprezintă una dintre cele mai importante cauze patologice. Astfel, leziunile hepatice au fost adesea raportate la diferite specii de pești expuse la diferite xenobiotice. În pofida faptului că celulele se pot proteja împotriva compușilor toxici prin mecanisme precum biotransformarea xenobioticelor în metaboliți solubili în apă prin enzimele de fază I și eliminarea metaboliților prin conjugarea la molecule excretabile prin enzimele de fază II, nu a fost găsită o metodă eficientă pentru tratamentul sindromului hepatic. Acesta este motivul pentru care, în ultimii ani, cercetările au fost direcționate spre identificarea de strategii nutriționale care să implice nutraceutice eficiente în contracararea efectului toxic al xenobioticelor.

Convergent cu dezideratul comunității științifice, studiul de față și-a propus investigheze efectul aditivării furajelor cu diferite produse, potențial nutraceutice, asupra stării de sănătate a biomasei piscicole, menținută în condiții controlate, dar și a performanței tehnologice și a calității produsului de acvacultură.

Astfel, în prima etapă, care s-a desfășurat pe o perioadă de 64 de zile, s-a urmărit efectul administrării unor aditivi alimentari asupra performanței de creștere, compoziției biochimice și stării de întreținere prin evaluarea indicilor somatici și a parametrilor hematologici, serici, precum și a principalilor markeri de stres oxidativ. După cele 64 de zile experimentale, scopul experimentului următor a fost de a evalua efectul aditivilor alimentari administrați în hrană asupra imunității peștilor, după administrarea unei supradoze de paracetamol.

Rezultatele obținute în urma realizării activității experimentale au pus în evidență următoarele aspecte:

- Din analiza indicatorilor privind performanța creșterii, cel mai bun FCR a fost înregistrat în variantele experimentale în care s-a administrat SM, dar și BBR în concentrația de 200 mg/kg hrană, în timp ce o valorificare mai slabă a nutrienților a fost observată în variantele BBR100, respectiv în variantele în care s-a administrat amestecul de SM și BBR în diferite concentrații;
- În urma analizei indicilor somatici, nu au fost evidențiate diferențe semnificative, observându-se totuși o ușoară scădere a indicelui HSI în variantele în care hrana a fost aditivată cu suplimentele alimentare selectate, aspect ce sugerează reducerea acumulării grăsimii sau a substanțelor toxice la nivelul ficatului;
- În urma analizei compoziției biochimice a cărnii, s-a observat creșterea ușoară a conținutului de proteine, respectiv scăderea semnificativă ( $p < 0,05$ ) a conținutului de lipide în variantele în care s-a administrat suplimentele alimentare, aspect ce poate transpune în obținerea unui produs cu o calitate superioară, cu un conținut lipidic mai scăzut, dar cu o sursă ridicată de proteină;
- Administrarea SM și BBR a dovedit efecte hepatoprotectoare, reflectate prin valorile parametrilor serici, care au fost semnificativ îmbunătățite în aceste variante experimentale. Astfel, administrarea BBR a condus la reducerea colesterolui seric, trigliceridelor, reducerea ușoară a TGP-ului, precum și la îmbunătățirea raportului HDL/LDL.
- După administrarea dozei unice de paracetamol, s-a observat reducerea hepatotoxicității în variantele experimentale unde s-a administrat aditivii selectați, aspect reliefat de valorile parametrilor serici. Astfel, s-a observat că după expunerea crapului la paracetamol, valorile TGP, TGO, ALP nu au fost

semnificativ ( $p > 0,05$ ) afectate, în timp ce în varianta M s-a observat o depreciere a valorilor obținute.

- Adăugarea de SM și BBR în hrana puietului de crap a condus la scăderea concentrației de MDA, respectiv la creșterea valorilor TAC, evidențiindu-se efectul pozitiv al acestor aditivi în combaterea stresului oxidativ. Prin urmare, includerea acestor aditivi alimentari în hrana crapului poate contribui la menținerea unui echilibru adecvat între oxidanți și antioxidanți, prevenind astfel apariția stresului oxidativ.

### Referințe capitol

1. Abenavoli, L., Izzo, A. A., Milić, N., Cicala, C., Santini, A., & Capasso, R. (2018). Milk thistle (*Silybum marianum*): A concise overview on its chemistry, pharmacological, and nutraceutical uses in liver diseases. *Phytotherapy Research*, 32(11), 2202-2213.
2. Ahmadi, K., Banaee, M., Vosoghei, A. R., Mirvaghefi, A. R., & Ataeimehr, B. (2012). Evaluation of the immunomodulatory effects of silymarin extract (*Silybum marianum*) on some immune parameters of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Actinopterygii: Salmoniformes: Salmonidae). *Acta Ichthyologica Et Piscatoria*, 42(2), 113-120.
3. Al-Shawi, S. G., Yousif, A. Y., Al-Younis, Z. K., Shichiyakh, R. A., Zekiy, A. O., & Naserabad, S. S. (2022). Dietary silymarin, *Silybum marianum* extract ameliorates cadmium chloride toxicity in common carp, *Cyprinus carpio*. *Annals of Animal Science*, 22(2), 741-750.
4. Ali, H., & Ansari, K. K. (2012). Comparison of Haematological and Biochemical indices in healthy and Monogenean infected Common Carp, *Cyprinus carpio*. *Ann Biol Res*, 3(4), 1843-1846.
5. Al-Shawi, S. G., Yousif, A. Y., Al-Younis, Z. K., Shichiyakh, R. A., Zekiy, A. O., & Naserabad, S. S. (2021). Dietary silymarin, *Silybum marianum* extract ameliorates cadmium chloride toxicity in common carp, *Cyprinus carpio*. *Annals of Animal Science*, 1-28. <https://doi.org/10.2478/aoas-2021-0065>
6. Ardestani, S. B., Sahari, M. A., Barzegar, M., & Abbasi, S. (2013). Some Physicochemical Properties of Iranian Native Barberry Fruits (abi and poloei): *Berberis integerrima* and *Berberis vulgaris*. *Journal of Food and Pharmaceutical Sciences*, 1(3), 60-67. <http://www.jurnal.ugm.ac.id/jfps/article/view/1846>.
7. Bojarki, B., Ludwikoska, A., Kurek, A., Pawlak, K., Tombarkiewicz, B., and Lutnicka, H. (2015). Hematological alterations in common carp (*Cyprinus carpio* L.) exposed to herbicides: pendimethalin and ethofumesate tested separately and in mixture. *Folia Biologica* 63, 167-174.
8. Brusq, J. M., Ancellin, N., Grondin, P., Guillard, R., Martin, S., Saintillan, Y., & Issandou, M. (2006). Inhibition of lipid synthesis through activation of AMP kinase: An additional mechanism for the hypolipidemic effects of berberine. *Journal of Lipid Research*, 47(6), 1281-1288. <https://doi.org/10.1194/jlr.M600020-JLR200>
9. Bhattacharya H. S. C.; Zhang; Wang Y. J. Embryonic development of the rosy barb *Puntius conchonius* Hamilton 1822 (Cyprinidae). *Tropical Zoology* 18: 25-37; 2005.
10. Clifton, J. D., Lucumi, E., Myers, M. C., Napper, A., Hama, K., Farber, S. A., Smith, A. B., Hury, D. M., Diamond, S. L., & Pack, M. (2010). Identification of novel inhibitors of dietary lipid absorption using zebrafish. *PLoS ONE*, 5(8), 1-9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012386>
11. Chen, Q.-Q., Liu, W.-B., Zhou, M., Dai, Y.-J., Xu, C., Tian, H.-Y. (2016). Effects of berberine on the growth and immune performance in response to ammonia stress and

- high-fat dietary in blunt snout bream *Megalobrama amblycephala*. *Fish Shellfish Immunol.* 55, 165–172. doi: 10.1016/j.fsi.2016.05.023.
12. Dai, W., Wang, K., Zheng, X., Chen, X., Zhang, W., Zhang, Y., ... & Liu, L. (2015). High fat plus high cholesterol diet lead to hepatic steatosis in zebrafish larvae: a novel model for screening anti-hepatic steatosis drugs. *Nutrition & metabolism*, 12, 1-11.
  13. El-Houseiny, W., Abd El-Hakim, Y. M., Metwally, M. M., Ghfar, S. S. A., & Khalil, A. A. (2022). The single or combined *Silybum marianum* and co-enzyme Q10 role in alleviating fluoride-induced impaired growth, immune suppression, oxidative stress, histological alterations, and reduced resistance to *Aeromonas sobria* in African catfish (*Clarias gariepinus*). *Aquaculture*, 548, 737693.
  14. Ilyas, Z., Perna, S., Al-Thawadi, S., Alalwan, T. A., Riva, A., Petrangolini, G., & Rondanelli, M. (2020). The effect of Berberine on weight loss in order to prevent obesity: A systematic review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 127, 110137.
  15. Jindal, R., Sinha, R., & Brar, P. (2019). Evaluating the protective efficacy of *Silybum marianum* against deltamethrin induced hepatotoxicity in piscine model. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 66, 62-68.
  16. Gholami-Seyedkolaei, S.J., Mirvaghefi, A., Farahmand, H., Kosari, A. A. (2013). Effect of ofaglyphosate -based herbicide in *Cyprinus carpio*: Assessment of acetylcholinesterase activity, hematological response and serum biochemical parameters. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 98, 35-141.
  17. Kumar, A., Ekavali, Chopra, K., Mukherjee, M., Pottabathini, R., and Dhull, D. K. (2015). Current knowledge and pharmacological profile of berberine: An update. *Eur. J. Pharmacol.* 761, 288–297. doi: 10.1016/j.ejphar.2015.05.068.
  18. Kuhlwein, H., Merrifield, D.L., Rawling, M.D., Foey, A.D. (2014). Effect of dietary b-(1,3), (1,6)-D-glucan supplementation on growth performance, intestinal morphology and hemato-immunological profile of mirror carp (*Cyprinus carpio* L). *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 98, 279-289.
  19. Lupoaie, M., Cristea, V., Coprean, D., Mocanu M., Patriche, T., Bocioc, E. (2011). Biochemical determination and oxidative stress evaluation on *O. mykiss* grown in recirculation system, *Lucrări Științifice, Seria Zootenie*, 55, 306-310.
  20. Lukanov, H., Pavlova, I., Ivanov, V., Slavov, T., Petrova, Y., & Bozakova, N. (2018). Effect of silymarin supplementation on some productive and hematological parameters in meat type male Japanese quails. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 984-989.
  21. Mikula, P., Modra, H., Nemethova, D., Groch L, Svoboda, Z. (2008). Effects of subchronic exposure to LASSO MTX (Alachlor 42%W/V) on hematological indices and histology of the common carp, *Cyprinus carpio* L. *Bulletin of Environmental Contamination and toxicology* 81, 475-479.
  22. Mensinger A. F., Walsh P. J., and R. T. Hanlon, "Blood biochemistry of the oyster toadfish," *Journal of Aquatic Animal Health*, vol. 17, no. 2, pp. 170–176, 2005.
  23. Nicula, M., Bura, M., Simiz, E., Banatean-Dunea, I., Patruica, S., Marcu, A., Lunca, M., & Szelei, Z. (2010). Researches Concerning Reference Values Assessment of Serum Biochemical Parameters in some Fish Species from Acipenseridae, Cyprinidae, Esocidae and Salmonidae Family. *Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies*, 43(1), 498–505. <http://www.usab-tm.ro/fileadmin/fzb/Simp>
  24. Ramezani, F., Shekarabi, S. P. H., Mehrgan, M. S., Foroudi, F., & Islami, H. R. (2021). Supplementation of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) diet with barberry (*Berberis vulgaris*) fruit extract: Growth performance, hemato-biochemical parameters, digestive enzyme activity, and growth-related gene expression. *Aquaculture*, 540(April), 736750. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736750>
  25. Sabiu, S., Sunmonu, T. O., Ajani, E. O., & Ajiboye, T. O. (2015). Combined administration of silymarin and vitamin C stalls acetaminophen-mediated hepatic oxidative insults in Wistar rats. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 25(1), 29–34.



26. Sahreen, A., Fatima, K., Zainab, T., & Saifullah, M. K. (2021). Changes in the level of oxidative stress markers in Indian catfish (Wallago attu) infected with *Isoparorchis hypselobagri*. Beni-Suef University *Journal of Basic and Applied Sciences*, 10(1), 1-8.
27. Shan, Y.-Q., Zhu, Y.-P., Pang, J., Wang, Y.-X., Song, D.-Q., Kong, W.-J. (2013). Tetrandrine potentiates the hypoglycemic efficacy of berberine by inhibiting p-glycoprotein function. *Biol. Pharm. Bull.* 36, 1562–1569. doi:10.1248/bpb.b13-00272
28. Shahin, S. A., Mansour, A. T., Abdel-Rahim, M. M., El-Dahhar, A. A., El Basuini, M. F., & Elhetawy, A. I. (2023). Silymarin, Supplemented Weaning Diet Boosted Survival, Growth, Antioxidant Status, and Fatty Acids Profile of Seabass. *Annals of Animal Science*, 23(1), 253-264.
29. Shinjyo, N., Parkinson, J., Bell, J., Katsuno, T., & Bligh, A. (2020). Berberine for prevention of dementia associated with diabetes and its comorbidities: A systematic review. *Journal of integrative medicine*, 18(2), 125-151.
30. Sudová, E., Piačková, V., Kroupová, H., Pijáček, M., & Svobodová, Z. (2009). The effect of praziquantel applied per os on selected haematological and biochemical indices in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish physiology and biochemistry*, 35, 599-605.
31. Tomaro, M. L., & Battle, A. M. D. C. (2002). Bilirubin: Its role in cytoprotection against oxidative stress. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 34(3), 216–220. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(01\)00130-3](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(01)00130-3)
32. Tripathi, N. K., Latimer, K. S., & Burnley, V. V. (2004). Hematologic reference intervals for koi (*Cyprinus carpio*), including blood cell morphology, cytochemistry, and ultrastructure. *Veterinary Clinical Pathology*, 33(2), 74-83
33. Van Doan, H., Hosenifar, S. H., Jaturasitha, S., Dawood, M. A., & Harikrishnan, R. (2020). The effects of berberine powder supplementation on growth performance, skin mucus immune response, serum immunity, and disease resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings. *Aquaculture*, 520, 734927.
34. Velisek, J., Sudova, E., Machova, J. and Svobodova (2009). Effect of bifenthrin on some haematological parameters of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish Physiology and Biochemistry* 35, 583-590.
35. Xu, W.-N., Chen, D.-H., Chen, Q.-Q., Liu, W.B. (2017). Growth performance, innate immune responses and disease resistance of fingerling blunt snout bream, *Megalobrama amblycephala* adapted to different berberine-dietary feeding modes. *Fish Shellfish Immunol.* 68, 458–465. doi: 10.1016/j.fsi.2017.07.051.
36. Xu, M., Xiao, Y., Yin, J., Hou, W., Yu, X., Shen, L., et al. (2014). Berberine promotes glucose consumption independently of AMP-activated protein kinase activation. *PLoS One* 9, e103702. doi: 0.1371/journal.pone.0103702.
37. Xu, X., Yi, H., Wu, J., Kuang, T., Zhang, J., Li, Q., et al. (2021). Therapeutic effect of berberine on metabolic diseases: Both pharmacological data and clinical evidence. *Biomed. Pharmacother.* 133, 110984. doi: 10.1016/j.biopha.2020.110984
38. Wang, J., Zhou, H., Wang, X., Mai, K., & He, G. (2019). Effects of silymarin on growth performance, antioxidant capacity and immune response in turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Journal of the World Aquaculture Society*, 50(6), 1168-1181.
39. Wang, L., Sagada, G., Wang, C., Gao, C., Wang, B., Shao, Q. and Yan, Y. (2022). Berberine in fish nutrition: Impact on hepatocentric health, antioxidative and immune status. *Front. Mar. Sci.* 9:967748. doi: 10.3389/fmars.2022.967748.
40. Wang, Y., Shou, J.W., Li, X.Y., Zhao, Z.X., Fu, J., He, C.Y., Feng, R., Ma, C., Wen, B.Y., Guo, F., Yang, X.Y., Han, Y.X., Wang, L.L., Tong, Q., You, X.F., Lin, Y., Kong, W.J., Si, S.Y., Jiang, J.D. (2017). Berberine-induced bioactive metabolites of the gut microbiota improve energy metabolism. *Metabolism* 70, 72–84.
41. Yi D., Gu L.F., Ding, B.Y. Li, M., Hou Y.Q., Wan, L., Gong, J.S. (2012). Effects of dietary silymarin supplementation on growth performance and oxidative stress in *Carassius auratus gibelio*. *J. Anim. Vet. Adv.*, 11, 3399-3404.

42. Yuxia C, Richard SP (2010) Use of transcriptomics in understanding mechanisms of drug-induced toxicity. *Pharmacogenomics* 11:573–585
43. Yen F. L.; Wu T. H.; Lin L. T.; Lin C. C. Hepatoprotective and antioxidant effects of *Cuscuta chinensis* against acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. *J. Ethnopharmacol* 111: 123–128; 2007.
44. Yonar, S.M. (2013). Toxic effects of malathion in carp, *Cyprinus carpio*: protective role of lycopene. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 97, 223-229.
45. Wolf JC, Wolfe MJ (2005) A brief overview of nonneoplastic hepatic toxicity in fish. *Toxicol Pathol* 33:75–85
46. Zarei, A., Changizi-Ashtiyani, S., Taheri, S., & Ramezani, M. (2015). A quick overview on some aspects of endocrinological and therapeutic effects of *Berberis vulgaris* L. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 5(6), 485–497.

## 6. Concluzii generale

Acvacultura intensivă în sistemele recirculante de acvacultură se caracterizează prin utilizarea unor densități crescute de stocare a speciilor piscicole și prin aplicarea unei furajări intense. Cu toate acestea, această abordare poate genera o prevalență sporită a stresului și, implicit, o creștere a incidenței afecțiunilor în cadrul populațiilor piscicole. Prin urmare, pentru prevenirea și tratamentul bolilor, precum și pentru promovarea creșterii și stimularea apetitului peștilor, în ultima vreme se recurge la utilizarea unor game variate de suplimente alimentare în hrana peștilor.

Obiectivul general al tezei de doctorat a fost de a evalua influența unor suplimente alimentare asupra organismelor acvatice în contextul îmbunătățirii stării de sănătate și evaluarea creșterii rezistenței acestora după expunerea la tratamente antiparazitare sau substanțe medicamentoase.

Astfel, în urma rezultatelor experimentale și a concluziilor parțiale prezentate la finalul fiecărui capitol din partea experimentală, sunt evidențiate o serie de concluzii generale, astfel:

Din primul experiment *“Cercetări privind influența uleiului de krill asupra performanței de creștere a puietului de crap, compoziției biochimice a cărnii și stării de confort tehnologic”*, se desprind următoarele concluzii generale:

- ✓ în cazul experimentului nostru, aditivarea furajului cu ulei de Krill a condus la creșterea performanței tehnologice, chiar și atunci când peștii au fost stocați la o densitate mai mare de populare ( $8 \text{ kg/m}^3$ ).
- ✓ rezultatele obținute evidențiază faptul că nivelul enzimelor hepatice ALT, ATP, AST, a fost semnificativ mai scăzut în grupurile care au primit o dietă suplimentată cu KO în comparație cu peștii hrăniți cu o dietă normală, atenuând stresul de densitate și toxicitatea hepatică a albendazolului.
- ✓ albendazolul trebuie utilizat cu prudență, deoarece poate induce modificări ale profilului hematologic, cât și ale stresului oxidativ în ficat.
- ✓ uleiul de Kril îmbunătățește metabolismul lipidic și crește capacitatea de a elimina radicalii liberi.

Prin urmare, uleiul de krill (KO) poate fi utilizat pentru a atenua stresul, în special în situațiile în care peștii sunt expuși factorilor care perturbă homeostazia,

cum ar fi densitățile ridicate de populare sau administrarea de medicamente hepatotoxice. Uleiul de krill poate fi considerat o componentă complementară în gestionarea sănătății peștilor în industria acvaculturii și poate fi utilizat pentru dezvoltarea de produse nutraceutice. Cu toate acestea, mecanismul exact prin care includerea uleiului de krill în alimentația peștilor exercită efecte pozitive trebuie abordat în studiile viitoare.

Rezultatele obținute în urma realizării activității experimentale a celui de al doilea experiment „Cercetări privind influența silimarinei și berberinei asupra performanței de creștere a puietului de crap, compoziției biochimice a cărnii și stării de confort tehnologic” au pus în evidență următoarele aspecte:

- administrarea SM și BBR în hrana puietului de crap a condus la obținerea unor performanțe de creștere superioare, mai puțin în variantele în care s-a testat efectul sinergic al acestora.
- analiza indicilor somatici a demonstrat o reducere a acumulării de grăsime în ficat în cazul variantelor experimentale care au inclus suplimente alimentare. În același timp, analiza compoziției biochimice a cărnii a evidențiat o ușoară creștere a conținutului de proteine și o scădere semnificativă ( $p < 0,05$ ) a conținutului de lipide în variantele în care s-au administrat suplimente alimentare. Aceste rezultate sugerează posibilitatea obținerii unui produs de înaltă calitate, cu un conținut redus de lipide, dar cu o sursă bogată de proteine.
- rezultatele privind concentrația de malondialdehidă și a capacității antioxidante totale a evidențiat eficiența administrării suplimentelor alimentare asupra stresului oxidativ, atât după experimentul de hrănire, cât și după administrarea dozei de paracetamol.
- rezultatele obținute privind activitatea lizozimului indică accelerarea procesului de fagocitoză, aspect ce sugerează că introducerea SM și BBR în hrana crapului contribuie la fortificarea stării de imunitate a peștilor.

Astfel, în urma rezultatelor obținute, se desprinde concluzia că administrarea SM și BBR în hrana puietului de crap conduce la îmbunătățirea performanței de creștere, a stării fiziologice, precum și la îmbunătățirea markerilor de stres oxidativ.

Cu toate acestea, studiile suplimentare ar putea să ofere mai multe informații despre dozele ideale și interacțiunea dintre silimarină și berberină în hrana puietului de crap. De asemenea, este important să se monitorizeze atent răspunsul peștilor la aceste suplimente și să se adapteze dozele în funcție de rezultatele obținute și prelungirea perioadei de administrare a suplimentelor alimentare pentru a se observa cât mai profund efectele acestora asupra sănătății organismelor acvatice.

## **7. Contribuții personale și perspective de continuare a cercetărilor**

Creșterea intensivă a peștilor în sisteme recirculante de acvacultură presupune practicarea unor densități ridicate de stocare, respectiv inputuri mari de hrană, aspecte ce poate conduce la instalarea stresului și implicit dezvoltarea unor patologii grave în rândul biomasei piscicole.

În cadrul tezei de doctorat, obiectivul nostru a fost de a identifica soluții alternative pentru prevenirea patologiilor asociate cu stresul cauzat de creșterea

intensivă, prin îmbunătățirea sistemului imunitar al peștilor. De asemenea, cercetările noastre au avut ca scop evaluarea influenței unor suplimente alimentare asupra performanței de creștere și a calității nutritive a materialului biologic (Crap - *Cyprinus carpio*, Linnaeus 1758).

Astfel, cercetările noastre inovatoare privind suplimentarea hranei puietului de crap cu ulei de krill, silimarină și berberină aduce concluzii relevante și pune în evidență beneficiile acestor suplimente alimentare în obținerea unor performanțe de creștere superioare, în combaterea stresului de densitate ridicată, creșterea stării de imunitate, respectiv îmbunătățirea funcției hepatice chiar și în condițiile aplicării unor tratamente antiparazitare sau sub influența unor poluanți farmaceutici, oferind o contribuție originală la domeniul cercetării în acvacultură. Folosirea uleiului de krill în hrana crapului, respectiv combinația unică de suplimente alimentare (silimarină + berberină) nu a fost anterior investigată de către alți cercetători, demonstrând astfel potențialul său promițător în îmbunătățirea creșterii și stării de sănătate a puietului de crap. Rezultatele obținute, vor contribui la dezvoltarea cunoașterii în domeniu și vor oferi informații valoroase pentru optimizarea strategiilor nutriționale sustenabile din sectorul acvaculturii, cu scopul de a optimiza creșterea, sănătatea peștilor și eficiența sistemelor recirculante de acvacultură.

În baza rezultatelor obținute în cadrul tezei de doctorat, se desprind noi direcții de cercetare pentru aprofundarea impactului suplimentelor alimentare asupra organismelor acvatice, astfel:

- *Optimizarea dozelor de suplimente alimentare:* Este necesară investigarea unui spectru cât mai larg în ceea ce privește dozele optime de ulei de krill, silimarină și berberină pentru a obține cele mai bune rezultate în ceea ce privește creșterea și starea fiziologică a peștilor. Totodată, studiile ulterioare pot explora sinergia dintre aceste suplimente alimentare și pot identifica combinațiile și concentrațiile optime;
- *Evaluarea efectului pe termen lung a efectelor suplimentelor:* Pentru a obține o înțelegere mai completă a influenței suplimentelor alimentare asupra organismelor acvatice, este important să se efectueze studii pe termen lung, urmărind efectele pe măsură ce peștii cresc și se dezvoltă. Astfel, se pot evalua efectele de lungă durată asupra creșterii, sănătății și sistemului imunitar;
- *Evaluarea mecanismelor de acțiune a suplimentelor alimentare:* Cercetările viitoare pot explora mecanismele de acțiune prin care suplimentele alimentare influențează organismele acvatice. Acest lucru poate implica studii moleculare, biochimice și imunologice pentru a înțelege mai bine modul în care aceste suplimente interacționează cu organismul și determină efectele observate.

## 8. Diseminarea rezultatelor cercetărilor

### A. Articole publicate în jurnale cotate ISI

1. Năstac, L., Dediu, L., Crețu, M., Rîmniceanu, C., Docan, A., Grecu, I., Vizireanu, C. (2023). The Protective Effects of Korill Product on Carp Fingerlings Reared in High Densities and Challenged with Albendazole Treatment. *Fishes*, 8(3), 153. Factor de impact 3,17.

**B. Articole publicate în jurnale BDI**

1. Năstac, L. G., Crețu, M., Dediu, L., Docan, A. I., Rîmniceanu, C., & Vizireanu, C. (2023). Effect of Krill Oil Supplementation and Stocking Density on Growth Performance, Proximate Composition, and Organosomatic Indices of *Cyprinus carpio*. *European Journal of Biology and Biotechnology*, 4(1), 1-6.

**C. Lucrări comunicate la manifestări științifice internaționale**

1. Năstac, L., Crețu, M., Docan, A., Grecu, I., Dediu, L., Vizireanu, C. (2023). *Effects of dietary berberine, silymarin and their association on lipid and glucose metabolism in common carp Cyprinus carpio*, SCDS-UDJG 2023 The Eleventh Edition of the Scientific Conference of the Doctoral Schools of Dunărea de Jos, University, 8th-9th of June 2023.
2. Năstac, L., Crețu, M., Docan, A., Dediu, L., Vizireanu, C., (2022). *Effect of Albendazole on the oxidative stress markers and hematological parameters in tissues of Cyprinus carpio*, SCDS-UDJG 2022 The Ten Edition of the Scientific Conference of the Doctoral Schools of Dunărea de Jos, University, 9-10 June, 2022.
3. Năstac, L., Crețu, M., Constatin, O., Docan, A., Dediu, L., Vizireanu, C (2021). *Krill oil diet protects against density induced oxidative stress in Cyprinus carpio fingerlings reared in a recirculating aquaculture system*. Nine Edition of the Scientific Conference of the Doctoral Schools of Dunărea de Jos, University, 10-11 June 2021.
4. Năstac, L., Crețu, M., Istrati, D., Grecu, I., Dediu, L., Vizireanu, C. (2021). *Evaluating hematological status of fish reared in recirculating aquaculture systems after supplementing their diet with krill oil*. Nine Edition of the Scientific Conference of the Doctoral Schools of Dunărea de Jos, University, 10-11 June 2021.