

*CONTRACT NR. 51PTE/2020*

*ETAPA NR. 3/2022*

*COD PROIECT: PN-III-P2-2.1-PTE-2019-0697*

**OPTIMIZAREA TEHNOLOGIILOR DE CREȘTERE A BIOMASEI PISCICOLE ȘI VEGETALE  
ÎN CADRUL SISTEMELOR MULTI-TROFICE DE ACVACULTURĂ INTENSIVĂ PRIN  
UTILIZAREA TEHNICILOR INTELIGENTE DE RECUNOAȘTERE VIZUALĂ ȘI IoT  
(*MultiAqualoT*)**

**THE IMPROVEMENT OF REARING TECHNOLOGIES FOR FISH AND PLANTS BIOMASS  
PRODUCED IN INTENSIVE RECIRCULATING AQUACULTURE MULTI-TROPHIC  
SYSTEMS BY USING VISUAL RECOGNITION AND IoT METHODS (*MultiAqualoT*)**

Realizat de către,

SC. SILURUS MARKET SRL (Beneficiar)

UNIVERSITATEA "DUNAREA DE JOS", Galați (Partener 1)

UNIVERSITATEA "ALEXANDRU IOAN CUZA" IASI (Partener 2)

UNIVERSITATEA DE MEDICINA SI FARMACIE "GRIGORE T. POPA" DIN IAȘI (Partener 3)

## REZUMAT ȘI REZULTATE DISEMINARE

În cadrul prezentei etape, proiectul PN-III-P2-2.1-PTE-2019-0697 intitulat *Optimizarea Tehnologiilor de Creștere a Biomasei Piscicole și Vegetale în Cadrul Sistemelor Multi-Trofice de Acvacultură Intensivă prin Utilizarea Tehnicilor Inteligente de Recunoaștere Vizuală și IoT (MultiAquaIoT)* își **propune** demonstrarea funcționalității în condiții industriale a sistemului multi-trofic optimizat prin integrarea modulelor inteligente de recunoaștere vizuală și a substratului inovativ – alternativ (cochilii de rapane) de creștere a biomasei de busuioc, dezvoltat, testat și validat în cadrul etapei anterioare, concomitent cu demonstrarea în condiții industriale a noii tehnologii bazată pe aditivarea cu fitobiotice a furajului administrat biomasei sturionice, cu finalizarea dezvoltării soluției software de diseminare a rezultatelor și cu diseminarea generală a rezultatelor obținute, inclusiv depunerea unei cereri de brevet. Astfel, prezenta etapă este structurată în **7 activități**, realizate în manieră colaborativă, întreprinse în scopul obținerii a unui număr asumat de 8 rezultate. Partenerul 1 al proiectului (Universitatea "Dunarea de Jos", Galați) este implicată în 5 activități din cadrul acestei etape (2 fiind parcurse în mod exclusiv de P1 și alte trei fiind parcurse în colaborare, după caz, cu Beneficiarul proiectului, precum și cu ceilalți doi parteneri), în timp ce beneficiarul proiectului (SC. SILURUS MARKET SRL) este implicat în trei activități colaborative și P2 (Universitatea "Alexandru Ioan Cuza" Iași), respectiv P3 (Universitatea de Medicină și Farmacie "Grigore T. Popa" din Iași) în câte o 2 activități colaborative și câte o activitate parcursă exclusiv de fiecare dintre aceștia.

Prezenta etapă se identifică prin următoarele **rezultate**: raport de descriere a bazei de conținut imagistic pentru exemplarele de sturioni și biomasa de busuioc (realizare finală); raport de analiză a tehnologiilor inteligente de recunoaștere vizuală, dezvoltate în scopul evaluării creșterii biomasei sturionice și a celei de busuioc, în timp real, precum și pentru identificarea deficiențelor nutriționale (realizare finală); raport de descriere a parametrilor de extracția uleiului din biomasa de busuioc obținută în regim acvaponic și de caracterizarea chimică a acestuia în vederea identificării compușilor bioactivi (realizare finală); raport de evaluare in-vitro a efectului antimicrobian al compușilor biologic activi ai extractului obținut din biomasa de busuioc crescută în regim acvaponic și de descriere a antioxidanților enzimatici și nonenzimatici (realizare finală); raport de demonstrare a funcționalității în condiții industriale a sistemului multi-trofic îmbunătățit prin integrarea substraturilor de creștere inovative, a tehnologiei bazate pe fitobiotice, cât și prin integrarea modulelor automate de observație a dinamicii biomasei sturionice și vegetale, în timp real; raport de prezentare a aplicației software în scopul diseminării către mediul industrial a noilor tehnologii dezvoltate, precum și a posibilelor viitoare tehnologii dezvoltate sau optimizate (realizare finală); raport cumulativ de descriere a rezultatelor proiectului și a direcțiilor ulterioare de dezvoltare.

**Diseminarea** întreprinsă în cadrul etapei a constat într-un număr de 6 articole publicate (un articol în Q1 – zona roșie cu IF 3,408, un articol în Q3 – zona albă cu IF 2,690 și 4 articole indexate ISI), 5 articole acceptate spre a fi publicate (un articol în Q2 – zona galbenă cu IF 5,411, 3 articole indexate ISI și un articol BDI), 2 articole aflate în evaluare (un articol în Q1 – zona roșie cu IF 4,658, respectiv un articol în Q2 – zona galbenă cu IF 3,847), 12 lucrări comunicate în cadrul Conferințelor Internaționale (din care 7 conferințe indexate ISI), 1 platformă web pentru diseminarea rezultatelor tehnologice către mediul industrial), 1 cerere de brevet și 1 produs inovativ realizat și transferat către mediul economic.

Astfel, în cadrul prezentei etape a fost extinsă baza de conținut imagistic pentru exemplarele de sturioni și biomasa de busuioc atât prin integrarea imaginilor tehnologice cu sturioni aflați în stadii mai avansate de dezvoltare, cât și prin diversificarea imaginilor cu busuioc crescut în regim acvaponic, inclusiv imaginile cu plante aflate în diverse stări induse de deficiențe specifice de nutrienți. De asemenea, a fost demonstrată funcționalitatea în condiții industriale, caracteristice diverselor scenarii tehnologice, a sistemului multi-trofic îmbunătățit prin integrarea substraturilor de creștere inovative, a tehnologiei bazate pe fitobiotice (a implicat evaluarea bunăstării biomasei piscicole), cât și prin integrarea modulelor automate de observație a dinamicii biomasei sturionice și vegetale, în timp real. Evaluare in-vitro a efectului antimicrobian al compușilor biologic activi ai extractului obținut din biomasa de busuioc obținută în regim acvaponic a fost realizată, concomitent cu descrierea antioxidanților enzimatici și nonenzimatici. Evaluarea calitativă a producției vegetale a implicat și extracția uleiului din biomasa de busuioc obținută în regim acvaponic și caracterizarea chimică a acestuia în vederea identificării compușilor bioactivi. O aplicație software a fost dezvoltată în scopul de a oferi beneficiarului posibilitatea diseminării către mediul extern, contra cost, rezultatelor prezente și viitoare obținute din activitatea de cercetare-dezvoltare. Diseminarea rezultatelor s-a realizat la scară largă, prin articole și participări la conferințe internaționale și, mai ales, prin depunerea unei cereri de brevet în vederea brevetării noului sistem multi-trofic inteligent, destinat a asigura o dezvoltare durabilă a sectorului alimentar. Drept urmare, consider un **grad de îndeplinire de 100% a obiectivelor propuse** a fi realizate în cadrul contractului 51PTE, în etapa 3/2022.

### 1. Raport de descriere a bazei de conținut imagistic pentru exemplarele de sturioni și biomasa de busuioc (realizare finală).

Seturile de date imagistice existente și provenite din cadrul etapei 2 a prezentului proiect, folosite la antrenarea rețelelor neuronale, au fost îmbunătățite prin intermediul întreprinderii activității de demonstrare a funcționalității sistemului inovativ și tehnologiei optimizate de producție. În acest fel baza de imagini a fost extinsă, aceasta cuprinzând atât imagini cu biomasa sturionicolă aflată în diverse stadii de dezvoltare, cu biomasa de busuioc aflată în diverse etape de creștere, cât și cu biomasa de busuioc aflată în diverse stări asociate deficienței de nutrienți.

Astfel, colectarea imaginilor pentru seturi de date cu biomasa sturionicolă a fost realizată după cum urmează: în fiecare zi au fost realizate aproximativ 900 de imagini (în 2 serii a câte 450 de imagini realizate la ore diferite) (figura 1). După realizarea fiecărui lot de imagini, acestea au fost transferate pe server cu ajutorul unui *cron job* setat pe fiecare Raspberry Pi ce asigură comunicarea cu camerele de observație IntelRealSense. Având în vedere că baza de date imagistice servește la antrenarea rețelelor neuronale destinate a fi aplicate la nivel industrial, obținerea imaginilor în context real, de practicare a sturioniculturii la nivel industrial, oferă un mare avantaj aplicativ. Seturile de date imagistice ce implică biomasa de busuioc au fost preluate zilnic, în două momente ale zilei (dimineața – ora 7:30 și seara – ora 18:30). Asemenea bazei imagistice cu sturionice, imaginile cu biomasa busuioc au fost realizate cu ajutorul camerelor Intel RealSense și transferate pe server cu ajutorul unor *cron job*-uri setate pe fiecare Raspberry Pi (figura 1). Un *cron job* este o comandă Linux folosită pentru programarea sarcinilor care urmează să fie executate cândva în viitor. Acesta este de obicei folosit pentru a programa o lucrare care este executată periodic – de exemplu, pentru a trimite o notificare în fiecare dimineață. Astfel, pentru fiecare Raspberry Pi a fost creat un scrip/fișier care captează un număr de poze. După ce pozele au fost salvate local, pe cardul SD din Raspberry Pi, aceste fișiere sunt transmise prin SSH către server, unde sunt salvate pe HDD. Toate aceste comenzi sunt puse într-un fișier .bat, fișier specific programelor în Linux (figura 2, 3). Pentru a fi rulat periodic, fișierul este apelat cu ajutorul unui *cron job* (figura 2).



Figura 1. Date imagistice cu biomasa sturionicolă și cea de busuioc, aflate în diverse scenarii tehnologice, în condiții industriale de producție

Baza finală de date imagistice aferentă biomasei de busuioc a fost încărcată pe cloud-ul <https://files.ugol.ro/s/KloeNG9HRfPNIQv> și poate fi accesată utilizând parola **multiaquaiot** (ANEXA I). Astfel, arhitectura bazei de date constă într-un număr de 6 foldere cu imagini surprinse în timpul ciclului de producție (ciclu creștere 1 – 2022 – rpi 2; ciclu creștere 2 – 2022 – rpi 4; ciclu creștere 3 – 2022 – rpi 12; ciclu creștere 4 – 2022 – rpi 16; ciclu creștere 5 – 2021 – rpi intel L515; ciclu creștere 6 – 2021 – rpi Intel SR3; silurus market comercializare, silurus market răsad) (figura 4) și 4 foldere cu imagini de frunze de busuioc cu deficiențe de N, P, K, Fe (figura 5). Baza finală de date imagistice aferentă biomasei sturionice cuprinde 6 foldere cu imagini surprinse în diverse secvențe tehnologice (sturioni biomasa 1-4 2021-2022 rpi 5-6; sturioni silurus market biomasa 1 -2) (figura 6).

```
#!/bin/bash
python3 /home/pi/Work/dataset/camera_intel.py
echo "wait 30 seconds!"
sleep 30
echo "copy to server..."
sshpass -p "admin.2021" scp -r /home/pi/Work/dataset/camera_in
echo "finished copy to server"
echo "clean up files..."
rm -rf /home/pi/Work/dataset/camera_intel/*
echo "finished"

30 11 * * * /home/pi/Work/cron_camera_intel_copy_to_server.sh
30 20 * * * /home/pi/Work/cron_camera_intel_copy_to_server.sh
```

Figura 2. Imagine bat și comandă cron job

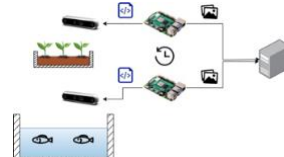


Figura 3. Diagramă sistem achiziție imagini



Figura 4. Date imagistice cu busuioi în timpul ciclului de producție, încărcate pe cloud

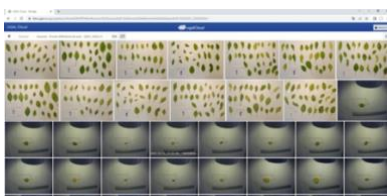


Figura 5. Date imagistice cu busuioi cu deficiențe de N, P, K, Fe, încărcate pe cloud

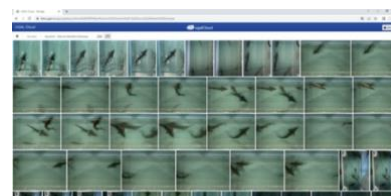


Figura 6. Date imagistice cu biomasa sturionice, încărcate pe cloud

## 2. Raport de analiză a tehnologiilor inteligente de recunoaștere vizuală, dezvoltate în scopul evaluării creșterii biomasei sturionice și a celei de busuioi, în timp real, precum și pentru identificarea deficiențelor nutriționale (realizare finală).

Din setul de date imagistice descris în cadrul raportului de mai sus (Raport 1), au fost extrase imagini care au fost trecute printr-un proces de adnotare manuală. Rezultatul acestui proces este un set de date pregătite pentru viitoare instruire atât pentru noi rețele cât și pentru îmbunătățirea rețelelor existente. Pentru adnotare a fost folosit tool-ul *LabelMe* (figura 7, 8). Baza de date imagistice adnotate a fost încărcată pe cloud-ul <https://files.ugal.ro/s/KloeNG9HRfPNIQv> și poate fi accesată utilizând parola *multiaquaiot*.



Figura 7. Date imagistice biomasa sturionice în timpul procesului de adnotare cu ajutorul tool-ului *LabelMe*



Figura 8. Date imagistice biomasa de busuioi în timpul procesului de adnotare cu ajutorul tool-ului *LabelMe*

Așa cum a fost prezentat în rapoartele anterioare, detecția biomasei sturionice se face cu ajutorul unor rețele neuronale și a unor tehnici din computer vision (spațiu culori). Folosind o rețea neuronală pentru segmentarea instanțelor, este generată o mască pentru fiecare exemplar sturionice în parte. Utilizând spațiul de culori *LAB*, masca creată în urma adnotării conturului sturionice este trecută printr-un algoritm ce ajută la extragerea acesteia. În acest fel, dintr-o mască similară cu rezultatul unei rețele de *semantic segmentation*, sunt generate mai multe măști similare cu rezultatul unei rețele de *instance segmentation* (figura 9). Deoarece ambele abordări au plusuri și minusuri, s-a optat pentru suprapunerea celor 2 măști și extragerea unei măști comune. Această mască este utilizată în continuare în formula de calcul. În cadrul formulelor de calcul sunt utilizate atât masca cât și informațiile de distanță (furnizate de camera Intel RealSense). Astfel, pentru identificarea indicelui de creștere a biomasei sturionice se ia în considerare media mărimilor tuturor peștilor detectați într-o zi, mărime care reprezintă numărul de pixeli determinați pe baza măști și distanța medie de la cameră la obiect (sturion) obținută cu ajutorul camerei Intel RealSense și a măștii peștelui (ec. 1)

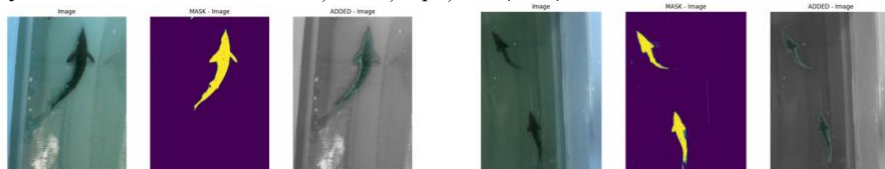


Figura 9. Extragerea de măști pentru biomasa sturionice adnotată

$$\text{Indice de creștere} = \frac{\sum \text{numar pesti} (\text{numar pixeli} \times \text{distanța medie})}{\text{numar pesti}}$$

Indicelui de creștere biomasa sturionice. (ec.1)

Abordarea de detectare a plantelor în imagini este similară cu algoritmul folosit la detecția peștilor. Și în acest caz este folosită o rețea neuronală alături de un algoritm de extragere a măștilor folosind spațiile de culori (*LAB*) (figura 10). Din combinarea celor 2 măști rezultă masca utilizată în ec. 2, și ec. 3. Astfel, cu ajutorul măști se extrage informațiile despre distanța colectate cu ajutorul camerei Intel RealSense, valori din cadrul cărora se extrage cea mai mică distanță. Cea mai mică distanță este asociată celui mai înalt punct existent la nivelul biomasei de busuioi, la un moment dat, adică vârful plantelor. Această distanță este corelată cu distanța până la sol, rezultând astfel înălțimea plantei (ec. 2). Creșterea suprafeței foliare a plantelor se observă prin intermediul indicelui prezentat în cadrul ec. 3. Acest indice se calculează zilnic și reprezintă numărul de pixeli (suprafața plantei) multiplicat cu înălțimea plantei. Prin această metodologie se ia în considerare o creștere a suprafeței o dată cu înălțarea plantelor (deoarece plantele nu vor mai crește în numărul de pixeli cu aceeași dinamică, după un anumit moment, când încep a se suprapune).

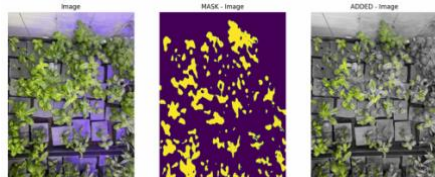


Figura 10. Extragerea de măști pentru biomasa de busuioi supusă procesului de adnotare

$$\begin{aligned} \text{Indice înălțime plantă} &= \text{distanța până la sol} \\ &- \text{distanța până la planta} \end{aligned}$$

Indicelui de evaluare a creșterii în înălțime a biomasei de busuioi (ec.2)

$$\begin{aligned} \text{Indice de creștere suprafață foliară} &= \text{numar pixeli mască} \\ &\times \text{înălțime planta} \end{aligned}$$

Indicelui de evaluare a creșterii suprafeței foliare a biomasei de busuioi (ec.3)

**Detecția bolilor plantelor – abordări testate:** Majoritatea abordărilor prezentate în cadrul publicațiilor științifice de specialitate gravitează în jurul a două mari direcții și anume extragerea caracteristicilor din imagini și clasificarea imaginilor. Astfel, au fost testate mai multe abordări, o parte din ele fiind prezentate în cele ce urmează.

O primă abordare presupune extragere caracteristicilor din imagini. Astfel, înainte de a prezenta abordările folosite, este necesar să se cunoască 2 concepte din procesarea imaginilor: *Local Binary Pattern* (denumit în continuare LBP) este o tehnică de Computer Vision folosită în clasificarea texturilor, respectiv *Normalizarea imaginii* este un proces tipic în procesarea imaginilor care modifică intervalul de valori ale intensității pixelilor. Scopul său normal este de a converti o imagine de intrare într-o gamă de valori a pixelilor care este mai familiară sau mai normală simțurilor, de unde și termenul de normalizare (figura 11). În ANEXA II se prezintă procedeul în manieră etapizată pentru o imagine din setul de date, care a fost trecută prin aceste 2 operații.

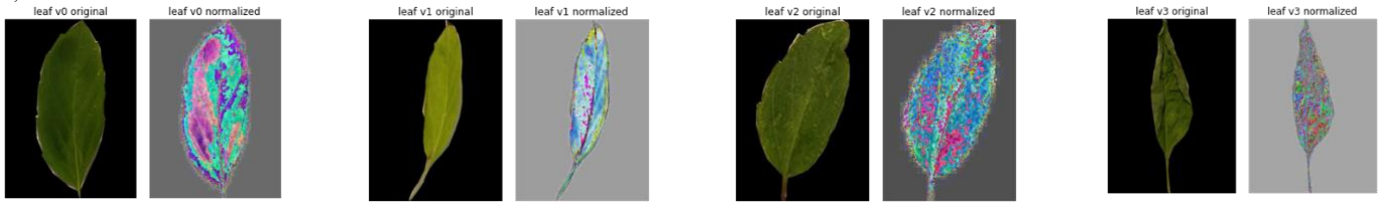


Figura 11. Rezultatele normalizării imaginilor pentru frunzele busuiocului cu deficiențe nutriționale

*Extragere caracteristici cu LBP și clasificare cu Random Forest (RF) Classifier* (figura 12 - 13): Algoritmul *Random Forest* se bazează pe arbori de decizie aleatorii. Este o tehnică de perturbare și combinare concepută specifică arborilor. Aceasta înseamnă că introducerea datelor aleatorii în construcția clasificatorului creează un set divers de clasificatori. Predicția ansamblului este predicție medie a clasificatorilor individuali. Înainte de a fi introduse în clasificator, imaginile au fost preprocesate utilizând LBP. Fiecare imagine este trecută printr-o etapă de preprocesare de tip LBP. Rezultatul este apoi trecut printr-o histogramă, care mai apoi este normalizată. Deși, rezultatele par încurajatoare, algoritmul nu a prezentat rezultate extraordinare, ceea ce ne-a motivat să căutăm altă abordare. A fost testat și algoritmul de clasificare *Logistic Regression*, însă rezultatele au fost asemănătoare (figura 14).

```
def extractLBP(img):
    """ Function that perform the feature extraction process with the LBP method """
    # TODO:
    lbp = local_binary_pattern(img, 24, 8, method="uniform")
    (hist, _) = np.histogram(lbp.ravel(), bins=np.arange(0, 27), range=(0, 26))
    hist = hist.astype("float")
    hist /= (hist.sum() + (1e-7))
    return hist

clf = RandomForestClassifier(n_estimators=100, random_state=42)
clf.fit(X_trainnext, y_train)

preds = clf.predict(X_testnext)
score = accuracy_score(y_test, preds)
clf_report = classification_report(y_test, preds, target_names=dataset_labels)

print("Accuracy with LBP and RandomForestClassifier:", score * 100)
print(clf_report)
```

Figura 12. Antrenare clasificator metoda LBP + RF

Accuracy with LBP and RandomForestClassifier: 50.806451612903224

|              | precision | recall | f1-score | support |
|--------------|-----------|--------|----------|---------|
| leaf-normal  | 0.48      | 0.26   | 0.34     | 80      |
| leaf-v1      | 0.39      | 0.28   | 0.32     | 58      |
| leaf-v2      | 0.57      | 0.34   | 0.43     | 47      |
| leaf-v3      | 0.25      | 0.04   | 0.07     | 24      |
| leaf-v4      | 0.53      | 0.83   | 0.65     | 163     |
| accuracy     |           |        | 0.51     | 372     |
| macro avg    | 0.44      | 0.35   | 0.36     | 372     |
| weighted avg | 0.48      | 0.51   | 0.46     | 372     |

Figura 13. Rezultate antrenare



Figura 14. Rezultatele algoritmului Logistics Regression

```
[INFO] correctly classified 331 / 390 images.
[INFO] correctly classified 224 / 266 images.
[INFO] correctly classified 237 / 268 images.
[INFO] correctly classified 89 / 112 images.
[INFO] correctly classified 794 / 822 images.
```

*Extragere caracteristici cu LBP și clasificare cu Suport Vector Machine: Suport Vector Machine (SVM)* sunt un set de metode de învățare supravegheată utilizate pentru clasificare, regresie și detectarea valorii aberante. În algoritmul SVM, fiecare element de date este reprezentat ca punct în spațiul  $n$ -dimensional (unde  $n$  este un număr de caracteristici), valoarea fiecărei caracteristici fiind valoarea unei anumite coordonate. Clasificatorul este hiperplanului care diferențiază foarte bine clase. La fel ca în exemplul de mai sus, fiecare imagine a fost preprocesată utilizând LBP, urmată de o histogramă și o normalizare (figura 15). S-a folosit librăria *scikit-learn* pentru implementarea algoritmului SVM. Cu toate acestea, în urma antrenării modelului s-a obținut o metrică asociată unei acuratețe finale destul de redusă, de 53%. (figura 16).

```
from sklearn import Feature
import numpy as np

class LocalBinaryPatterns:
    def __init__(self, numPoints, radius):
        # store the number of points and radius
        self.numPoints = numPoints
        self.radius = radius

    def describe(self, image, spacing=1):
        # compute the Local Binary Pattern representation
        # of the image, and then use the LBP representation
        # to build the histogram of patterns
        lbp = Feature.LocalBinaryPatterns(image, self.numPoints, self.radius, method="uniform")
        (hist, _) = np.histogram(lbp.ravel(), bins=np.arange(0, 27), range=(0, 26))
        # normalize the histogram
        hist = hist.astype("float")
        hist /= (hist.sum() + 1e-7)
        # return the histogram of Local Binary Patterns
        return hist
```

Figura 15. Procesarea imaginilor utilizând LBP – histogramă - normalizare

```
Precision of the Linear SVM: 1.0
Recall of the Linear SVM: 1.0
Accuracy of the Linear SVM: 1.0
Precision [0.75 0. 0. 0.52884615]
Recall [0.13636364 0. 0. 0.98214286]
Accuracy 0.5370370370370371
```

Figura 16. Acuratețea modelului LBP - SVM

*Extragere caracteristici cu LBP (imagini gri) și VGG16 și clasificare cu SVM*: Pornind de la cele afirmate în cadrul publicațiilor științifice de specialitate (Khalid et al., 2021) s-a încercat o abordare bazată pe LBP și o rețea neuronală convoluțională (CNN). În figura 17 sunt expuse informații despre forma imaginii după fiecare procesare: LBP, extragere caracteristici din CNN și combinarea informațiilor într-un singur array ce va fi intrare într-un clasificator SVM.

*Extragerea informațiilor/caracteristicilor folosind o rețea neuronală convoluțională, mai precis VGG* (figura 18): Rețeaua a fost instruită pe setul de date ImageNet. Imaginea este trecută prin rețea, însă nu până la capăt. Se extrag din rețea informații de dinainte de a se începe clasificarea imaginii, adică se extrag caracteristicile folosite la clasificare. Informațiile extrase din LBP și din rețeaua neuronală VGG16 sunt combinate într-o singură dată/array care este intrarea într-o altă rețea de clasificare. În figura 18 următoare se pot vedea dimensiunile datelor. Pentru clasificare, este folosit un clasificator liniar, mai precis SVP.

Alte 2 abordări utilizate sunt *Extragerea caracteristicilor cu LBP și clasificarea cu CNN (Resnet18)*, demers prezentat pe larg în ANEXA III și o clasificare a imaginilor utilizând un CNN (VGG) prezentă în detaliu în ANEXA IV.

*Detecție deficiențe nutriționale busuioc - abordare finală*: Una dintre abordările care a dat rezultate bune este utilizarea unui CNN de clasificare, însă folosind o arhitectură de rețea mult mai complexă. Pe durata testelor a fost încercată arhitectura Resnet50, care a prezentat rezultate destul de bune. În figura 19 se prezintă arhitectura rețelei și în ANEXA V sunt expuse log-uri din timpul antrenării și testul de predicție. Precizia finală a fost de 63%. Aceasta rețea este utilizată în cadrul aplicației, dezvoltate în cadrul prezentului proiect, pentru detectarea deficiențelor nutriționale la nivelul biomasei de busuioc.

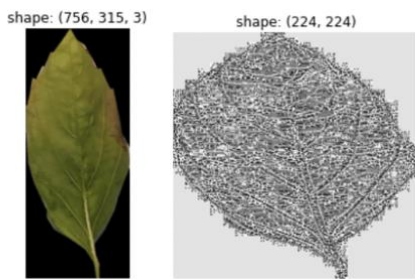


Figura 17. Extragerea informațiilor/caracteristicilor folosind LBP

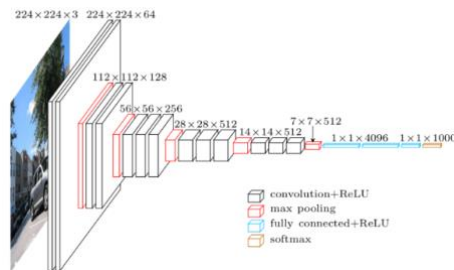


Figura 18. Arhitectura rețea VGG16 și dimensiune date

| layer name | output size | 18-layer               | 34-layer            | 50-layer            | 101-layer           | 152-layer            |
|------------|-------------|------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|----------------------|
| conv1      | 112x112     | 7x7, 64, stride 2      |                     |                     |                     |                      |
| conv2.x    | 56x56       | 3x3 max pool, stride 2 |                     |                     |                     |                      |
| conv3.x    | 28x28       | 3x3, 64, stride 2      |                     |                     |                     |                      |
| conv4.x    | 14x14       | 3x3, 128, stride 2     |                     |                     |                     |                      |
| conv5.x    | 7x7         | 3x3, 256, stride 2     |                     |                     |                     |                      |
| FLOPs      |             | 1.8x10 <sup>9</sup>    | 3.6x10 <sup>9</sup> | 3.8x10 <sup>9</sup> | 7.6x10 <sup>9</sup> | 11.3x10 <sup>9</sup> |

Figura 19. Arhitectura Resnet50

Având în vedere necesitatea funcționării sistemelor imagistice în manieră real-time, fapt ce implică transmiterea de date către utilizator și procesarea acestora pentru asigurarea perceptibilității lor la scară largă, s-a dovedit imperativă prezența unei aplicații cu rol de intermediar între sistem și operatorul de rând. Astfel, aplicația furnizează date legate de indicele de creștere în biomasa a materialului sturionicol, creșterea procentuală între două segmente de timp consecutive, precum și un tabel detaliat cu numărul de elemente identificate de model și luate în considerare în vederea elaborării celor două rezultate numerice cu o acuratețe ridicată (figura 20). De asemenea, datele legate de evaluarea creșterii biomasei de busuioc atât în înălțime, cât și în biomasa foliară, sunt reluate și prelucrate de aplicație, aceasta oferind valori asociate înălțimii plantelor, precum și indicele procentual de creștere a înălțimii (figura 21). Având în vedere faptul că, în cazul plantelor verzi crescute pentru valorificarea frunzelor, indicele de suprafață foliară este un indicator de producție foarte important, aplicația preia datele rezultate din folosirea modelelor imagistice ce determină suprafața de verde per o unitate de suprafață unitate acvaponică și calculează indicele procentual de creștere pentru aceasta, între două intervale de timp dorite (ANEXA VI). Astfel, în cadrul ANEXEI VI sunt prezentate o serie de printscreen-uri cu modul de rulare a aplicație, surprinse în timpul demonstrării funcționalității sistemului imagistic la nivel industrial. De asemenea, aplicația are și o componentă de identificare a procentului de similitudine a diverselor frunze de busuioc, identificate drept afectate de o posibilă deficiență nutrițională. Astfel, în figura 22 se prezintă un print-screen cu modalitatea de asociere a aspectului unei frunze de busuioc afectate cu de o deficiență de K cu o probabilitate de 54.36%, comparativ cu Fe 22.07%, N 10.19%, P 9.77%, precum și cu procentul de similitudine cu frunzele martor (normale) de doar 3.59%. În ANEXA VI sunt prezentate print-screen-uri din timpul funcționării în condiții industriale a acestui *feature* a aplicației.

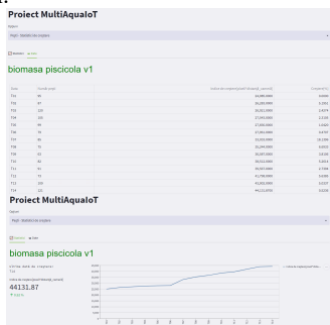


Figura 20. Interfața și structura aplicație realizată în scopul preluării prin IoT, vizualizării și interpretării rezultatelor de creștere obținute ca urmare a folosirii modulelor imagistice destinate observării biomasei sturionicole

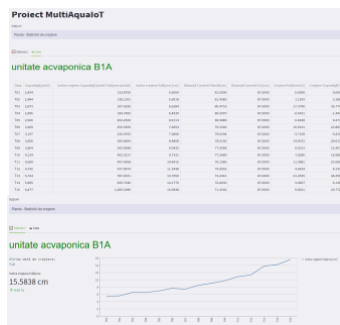


Figura 21. Interfața și structura aplicație realizată în scopul preluării prin IoT, vizualizării și interpretării rezultatelor de creștere obținute ca urmare a folosirii modulelor imagistice destinate observării biomasei de busuioc

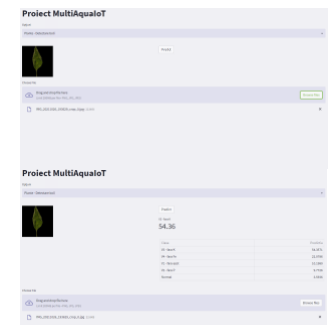


Figura 22. Interfața și structura aplicație de identificare a posibilelor deficiențe nutriționale la nivelul suprafeței foliare a busuiocului (exemplu determinarea deficienței de K)

### 3. Raport de demonstrare a funcționalității în condiții industriale a sistemului multi-trofic îmbunătățit prin integrarea substraturilor de creștere inovative, a tehnologiei bazate pe fitobiotice, cât și prin integrarea modulelor automate de observație a dinamicii biomasei sturionicole și vegetale, în timp real.

#### Design demonstrare funcționalitate pentru scenarii tehnologice A și B

În vederea demonstrării funcționalității în condiții industriale a modelului automat de observație a dinamicii biomasei sturionicole din cadrul sistemului multi-trofic și a utilității folosirii fitobiocitelor, prin evaluarea indicatorilor de creștere a biomasei piscicole și a compoziției biochimice a țesutului muscular, s-au urmărit diverse scenarii tehnologice ce surprind secvențe esențiale din cadrul ciclului de producție a speciei *A. baerii*. Astfel, în cadrul infrastructurii de producție sturionicolă industrială deținută de beneficiarul prezentului proiect, SC SILURUS MARKET SRL, au fost surprinse, pentru început, două secvențe tehnologice cu o durată de 43 zile fiecare, după cum urmează: A – creșterea biomasei sturionicole de la o biomasa inițială individuală medie (IW) de 51,24±4,8 g/ex la 142,20±17,44 g/ex, respectiv B – creșterea biomasei sturionicole de la IW inițial de 30,93±3,27 la 91,56±11,31 g/ex. De-a lungul perioadei experimentale, materialul biologic aferent ambelor baterii de creștere, asociate celor două scenarii tehnologice A și B, a fost furajat aplicând o rație de 1,5% din biomasa totală (BW). Furajul administrat are un conținut proteic de 56% (AllTech Coppens Supreme10®, de 2mm). Pulberea de busuioc a fost omogenizată cu o soluție de gelatină în concentrație de 2%, amestecul fiind pulverizat uniform pe suprafața furajului, mix-ul rezultat fiind uscat la cuptor electric cu ventilație (temperatura 30°C, timp 4 ore). După răcire, furajul a fost distribuit egal și administrat în 2 mese/zi către materialul biologic. Dinamica creșterii materialului sturionicol și compoziția biochimică a țesutului muscular au fost analizate. Astfel, pentru supervizarea creșterii în vederea adaptării în timp real (1 dată la fiecare 3 zile) a cantității de furaj administrat, a fost folosit modulul imagistic pentru evaluarea indicelui de creștere asociat biomasei piscicole. Întrucât modulul imagistic se integrează pentru prima dată la scară industrială, în vederea demonstrării funcționalității, a fost necesară optimizarea acestuia prin corelarea indicilor de creștere cu datele de spor de creștere identificate folosind metoda convențională, la fiecare 3 zile. Cele două baterii de creștere, aferente scenariilor tehnologice A și B au fost conectate, de-a lungul întregii secvențe tehnologice, în cadrul sistemului multi-trofic integrat, la modulele acvaponice aferente. Astfel, unitățile de creștere din cadrul A au fost conectate la

unitățile acvaponice HA și RA, respectiv cele din B la unitățile acvaponice HB și RB, unde H reprezintă grupul de unități cu substrat de creștere (GM) din argilă expandată și R grupul cu GM din cochiliile de rapane (substratul de creștere inovativ) supuse unui tratament de prelucrare similar cu cel menționat în cadrul raportului cumulativ al etapei a II-a a prezentului proiect. Parametrii hidraulici asociați modulelor acvaponice au fost identici: rată de încărcare hidraulică HLR (6 m/zi), timp hidraulic de retenție HRT (0,69 h). Motivul pentru care GM H a fost luat în considerare spre a fi demonstrat în cadrul secvenței tehnologice este reprezentat de dorința de identificare și impactul segregat al soluțiilor inovative propuse (sistemul multi-trofic cu modulele imagistice și tehnologie specifică bazată pe aditivarea furajului cu busuioc, dar cu GM convențional vs. sistemul multi-trofic cu modulele imagistice și tehnologie specifică bazată pe aditivarea furajului cu busuioc, dar cu GM format din cochiliile de rapane) – substratul GM R a fost ulterior introdus în rândul revendicărilor din cadrul brevetului „Sistem acvaponic cu substrat pentru creșterea durabilă a busuiocului și a sturionului siberian”, nr înreg. A/00676/24.10.2022. Astfel, răsaduri de busuioc au fost transplantate din sol și plantate la nivelul unităților acvaponice menționate mai sus (HA, RA, HB, RB), aplicând o densitate de cultivare de 70 răsaduri/m<sup>2</sup>. Înainte de transplantare, H GM și R GM au fost supuse activării respectând protocolul descris în raportul de etapa II al prezentului proiect, folosind bacterii Bio-Digest și adaos zilnic de clorură de amoniu.

**Modulul imagistic** pentru determinarea înălțimii și a indicelui de creștere a suprafeței foliare a fost folosit de-a lungul întregului ciclu de producție de 43 zile, concomitent fiind realizate și măsurători manuale cu rolul de a calibra modulul în cauză, conform celor descrise în raportul 2 al prezentei raportări științifice. Seria de date a fost folosită pentru a realiza un model de prognoză, util pentru identificarea din timp a eventualelor probleme ce pot apărea de-a lungul ciclului de producție și care se pot manifesta prin afectarea ritmului de creștere și dezvoltare. Astfel, pentru prognoza înălțimii biomasei de busuioc a fost folosită aceeași metodologie ca în cazul prognozei dinamicii biomasei sturionicele. Pentru a asigura legătura de interdependența înălțime – biomasa foliară de-a lungul procesului de predicție și a estima impactul creșterii în înălțime a plantei asupra dimensiunii frunzei se va folosi un model linear de forma ecuației 2:  $leaf_t = a + b * height_t + u_t$  (2), unde:  $a$  – reprezintă panta și arată cu cât va crește frunza dacă planta va stagna în înălțime,  $b$  – parametrul care ne arată cu cât va crește sau va scăde dimensiunea frunzei la o creștere a înălțimii cu o unitate,  $leaf_t$  și  $height_t$  – sunt variabilele modelului (una endogenă și alta exogenă) și  $u_t$  – reprezintă reziduală care va trebui minimizată folosind metoda celor mai mici pătrate.

**Calitatea biomasei vegetale de busuioc** a fost evaluată la finalul ciclului de producție, aceasta fiind analizată, într-o primă etapă, din punct de vedere a concentrației de Ca, Mg, Fe și K, folosind tehnica de absorbție atomică cu flacără. Compoziția biochimică a țesutului muscular al biomasei piscicole a fost evaluată la sfârșitul perioadei experimentale conform STAS 9064/4-81 și STAS 9065/10-75.

**Calitatea apei** a fost monitorizată atât la alimentarea unităților acvaponice, cât și la evacuarea acestora, în vederea determinării ratelor de retenție. Pentru concentrațiile de NO<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub>, NH<sub>4</sub>, Mg, Ca, pH, oxigen dizolvat (DO) și temperatura a fost folosită o soluție tehnică de monitoring bazată pe senzori și anume Libelium® Smart Water Sensor Platform Adds Ion Monitoring (Zaragoza, Spain), iar vizualizarea rezultatelor a fost realizată prin intermediul Waspmode® (Zaragoza, Spain), platforma Grafana® - dezvoltată de Grafana Labs Company (New York, SUA).

Pe durata experimentelor s-a evaluat bunăstarea materialului biologic atât la momentul inițial cât și la finalul experimentului. Pentru analiza biomasei de cultură din punct de vedere hematologic s-au folosit metode curente aplicate în hematologia veterinară ce reflectă starea de sănătate a peștilor, determinând, astfel, potențialele schimbări fiziologice ce pot apărea sub acțiunea factorilor de stres (Blaxhall et al., 1973; Svobodova, 1991). Astfel, pentru **determinarea numărului de eritrocite** (RBC - eritr./ $\mu$ l sânge  $\times 10^6$ ) s-a utilizat ca lichid de diluție - soluția Vulpian, hemocitometrul Neubauer, pipeta Potain și un microscop. **Determinarea concentrației de hemoglobină** (Hb - g/dL) s-a realizat spectrofotometric cu ajutorul reactivului Drabkin. Citirea absorbanței efectuându-se la spectrofotometrul SPECORD 210 Analytikena, la o lungime de undă de 540 nm. **Determinarea hematocritului** (PVC - %) s-a realizat cu ajutorul centrifugii HETICH HEMATOKRIT 210 pentru microhematocrit și a tuburilor capilare de microhematocrit heparinate. Centrifugarea s-a realizat la o viteză de 12000 de rotații / minut timp de 5 minute. Constantele eritrocitare reflectă gradul de funcționare al eritrocitelor, conținutul de hemoglobină al fiecărui eritrocit și raportul dintre acest conținut și valoarea lui. În cadrul experimentelor efectuate s-au determinat următoarele constante eritrocitare: **volumul eritrocitar mediu** (VEM - fL), **hemoglobina eritrocitară medie** (HEM - pg) și **concentrația de hemoglobină eritrocitară medie** (CHEM – g/dL). În ceea ce privește biochimia sângelui s-a determinat glucoza, cortizolul, proteinele totale și lizozimul. **Determinarea concentrației de glucoză** (GLU – mg/dL) s-a realizat prin metoda colorimetrică bazată pe reacția dintre glucoză cu o substanță cromogenă, și anume o-toluidina, care în prezența aldohexozelor formează un compus intens colorat în verde. Citirile s-au efectuat cu ajutorul spectrofotometrului SPECORD 210 Analytikjena la o lungime de undă de 635 nm. **Cortizolul** (ng/dL) s-a determinat din ser prin metoda colorimetrică imunoenzimatică competitivă cu ajutorul kit-ului *Fish Cortisol ELISA Kit* (96 determinări) bazat pe tehnica ELISA. **Dozarea proteinelor totale** serice (TP – g/dL) s-a realizat prin intermediul metodei biuretului, citirea probelor, față de proba blank, s-a efectuat la spectrofotometrul SPECORD 210 Analytikjena 250 la o lungime de undă de 546 nm. **Activitatea lizozimului** (U/mL) s-a determinat din ser pe baza testului turbidimetric folosind protocolul de lucru pentru determinarea enzimatică a lizozimului de la Sigma (Sigma, EC 3.2.1.17), utilizând ca substrat suspensia de *Micrococcus lysodeikticus*. Pentru **evaluarea stresului oxidativ** s-a recurs la determinarea catalazei (CAT – U/mg proteină), superoxid dismutazei (SOD – U/mg proteină), capacității antioxidante totale (TAC – mM Trolox) și a malondialdehidei (MDA – nmoli/mg proteină). Pentru determinarea acestor indicatori a fost necesară și determinarea conținutului de proteină (mg/mL) din țesuturile analizate. Stresul oxidativ la pești s-a determinat din țesut muscular (M), ficat (F) și intestin (I). La pești concentrația de SOD s-a determinat prin metoda colorimetrică imunoenzimatică competitivă cu ajutorul kit-ului *Fish Superoxide Dismutase (SOD) ELISA kit* (96 determinări) bazat pe tehnica ELISA. Determinarea capacității antioxidante totale (TAC) s-a efectuat prin metoda descrisă de Re (1999) și Van Den Berg (1999). Această metodă are la bază tehnica ABTS (2,2'-azinobis 3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) ce măsoară abilitatea antioxidantilor de a transforma radicalul cationic colorat ABTSO<sup>+</sup> (2,2'-azinobis 3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate).

## Rezultate și discuții scenarii tehnologice A și B

### Performanța creșterii biomasei sturionicele, modele de forecasting, compoziție biochimică țesut muscular

Valoare SGR pentru scenariul A, pentru întreaga secvență tehnologică, este de 2,37%BW/zi, în timp ce pentru scenariul B s-a înregistrat o valoare a SGR de 2,52%BW/zi, fapt ce relevă o capacitate mai bună de maximizare a producției asociată scenariului B. De asemenea, indicatorul FCR a înregistrat valoarea de 0,64 g furaj / g spor biomasă în cazul B, reliefând o eficiență superioară a hrănirii în cazul acestui scenariu tehnologic, comparativ cu A (0,68 g furaj / g spor biomasă). Aceste rezultate sunt confirmate de valorile medii ale ritmului de creștere (2,17±0,44g/ex/zi pentru A, respectiv 1,44±0,35g/ex/zi pentru B) și valorile RGR (0,025±0,003g/g/zi pentru A, respectiv 0,027±0,003g/g/zi pentru B). Având în vedere capacitatea sistemului de recunoaștere vizuală de a identifica dinamica biomasei sturionicele și acțiunile întreprinse de-a lungul secvenței tehnologice analizate în cazul A și B pentru a valida și a demonstra funcționalitatea în condiții industriale a noii tehnologii imagistice și a noului sistem multi-trofic, s-au realizat cântăriri periodice (1 dată la 3 zile) în scopul de a calibra output-ul noilor tehnici de inteligență artificială, folosind date reale, înregistrate în noile condiții industriale de operare. Astfel, în figurile 23, 24 se observă o scădere a SGR, RGR și o creștere a FCR, de-a lungul secvenței tehnologice, fapt ce relevă o scădere a eficienței tehnologice, situație firească în cadrul fiecărei tehnologii. Cu toate acestea, ritmul zilnic de creștere înregistrează o evoluție ascendentă, situație ce confirmă acumularea de biomasă la nivelul scenariilor tehnologice (figura 25). În cadrul tabelului 2 se observă faptul că modulul imagistic pentru creșterea biomasei sturionicele oferă o acuratețe mai ridicată în cazul variantei A, comparativ cu B, fapt ce relevă creșterea preciziei acestuia pe măsură ce biomasa piscicolă avansează în cadrul procesului de dezvoltare și creștere.

Tabel 1. Indicatorii procentuali de spor biomasă sturionicolă rezultați din măsurători convenționale vs imagistice

| Interval timp | Indicatori procentuali rezultați din măsurători convenționale (%) |                                | Indicatori procentuali rezultați din măsurători imagistice (%) |                                |
|---------------|-------------------------------------------------------------------|--------------------------------|----------------------------------------------------------------|--------------------------------|
|               | Sport procentual de creștere A                                    | Sport procentual de creștere B | Sport procentual de creștere A                                 | Sport procentual de creștere B |
| T1-3          | 8,49                                                              | 8,79                           | 8,58                                                           | 8,81                           |
| T3-6          | 8,18                                                              | 8,26                           | 7,74                                                           | 8,23                           |
| T6-9          | 8,68                                                              | 9,09                           | 8,12                                                           | 9,81                           |
| T9-12         | 8,49                                                              | 8,71                           | 8,84                                                           | 8,80                           |
| T12-15        | 8,08                                                              | 8,06                           | 8,44                                                           | 8,29                           |

|        |      |      |      |      |
|--------|------|------|------|------|
| T15-18 | 7,44 | 8,98 | 7,47 | 9,24 |
| T18-21 | 7,83 | 8,55 | 7,58 | 8,34 |
| T21-24 | 7,77 | 7,77 | 7,32 | 8,49 |
| T24-27 | 7,68 | 8,27 | 7,64 | 8,82 |
| T27-30 | 7,14 | 7,17 | 7,31 | 7,42 |
| T30-33 | 6,90 | 8,21 | 7,13 | 8,80 |
| T33-36 | 6,69 | 7,63 | 6,22 | 8,25 |
| T36-40 | 6,48 | 6,86 | 6,27 | 7,33 |
| T40-43 | 6,06 | 6,54 | 5,68 | 6,73 |
| Medie  | 7,57 | 8,06 | 7,45 | 8,38 |

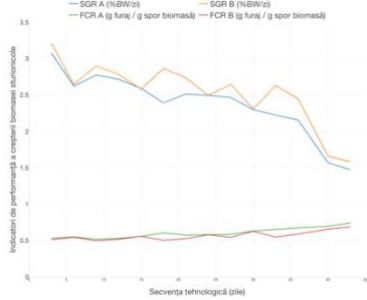


Figura 23. Dinamica parametrilor de performanță a creșterii biomasei sturionice de-a lungul secvenței tehnologice

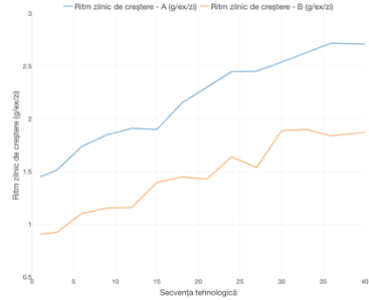


Figura 24. Dinamica ritmului zilnic de creștere a biomasei sturionice de-a lungul secvenței tehnologice

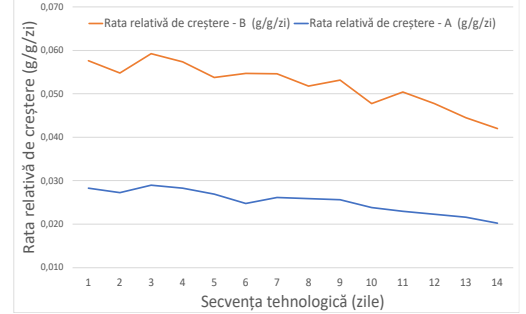


Figura 25. Dinamica ratei relative de creștere a biomasei sturionice de-a lungul secvenței tehnologice

Se constată faptul că, în contextul în scopul optimizării managementului operativ la nivelul noului sistem creat și a noii tehnologii, s-au folosit tehnici de inteligență artificială ce au presupus antrenarea datelor de creștere a biomasei sturionice, obținute de-a lungul secvenței tehnologice, sub formă de serie de timp, având drept deziderat obținerea unor modele de prognoză tehnologică ce pot indica dinamica viitoare a creșterii sturionilor. Au fost folosite modelele stohastice de prognoză, care într-o formulare generală se prezintă astfel:

$$y_t = \bar{y} + a_0 + a_1 y_{t-1} + a_2 y_{t-2} + \dots + a_p y_{t-p} - b_1 u_{t-1} - b_2 u_{t-2} - \dots - b_q u_{t-q} + u_t \quad (1)$$

,unde  $y_t$  reprezintă variabila staționară,  $a$  și  $b$  – parametrii care se vor estima. Prima parte a egalității reprezintă modelul linear autoregresiv (lag-urile), iar cea de-a doua include eroarea introdusă prin intermediul valorilor reziduale ( $u_{t-q}$ ) în vederea corectării prognozei (reprezintă partea mobilă a modelului). Un astfel de model reprezentat prin intermediul ecuației (ec. 1) este un model de tip ARIMA( $p,d,q$ ), unde  $p$  reprezintă partea autoregresivă,  $d$  este ordinul de staționaritate și  $q$  este ordinul mediei mobile. Pentru a stabili varianța seriilor, s-a folosit transformarea rădăcinii pătrate a acestora. Pentru investigarea staționarității seriilor de timp, s-a realizat testul ADF (tabelul 2). Cea de-a doua diferență, care este  $d=2$ , este optimă pentru a face seria staționară. După ce s-a realizat această diferență de ordinul 2, seriile de timp devin staționare. După ce seriile s-au stabilizat, se vor folosi coeficienții de autocorelație (AC) și cei de autocorelație parțiali (PAC) (figura A1-A4 din ANEXA VII) ale diferențelor de ordinul doi pentru a estima parametrii modelului ARIMA.

Tabelul 2. Valorilor  $p$  din testul ADF, după realizarea diferențelor rădăcinii pătrate

| Numărul de diferențe | ADF test (p-value) pentru seria A | ADF test (p-value) pentru seria B |
|----------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 0                    | 0.9825                            | 1.0000                            |
| 1                    | 0.5752                            | 0.6230                            |
| 2                    | 0.0407                            | 0.0008                            |

Ordinul coeficienților AC sunt utili în determinarea ordinului de medie mobilă, în timp ce ordinul PAC este folosit pentru stabilirea ordinului autoregresiv. Alegerea ordinului pentru partea autoregresivă și cea mobilă se realizează prin simularea diferitelor modele ARMA. Totuși, pentru a selecta cel mai apropiat model se pot încerca diferite ordine pentru cei doi coeficienți ai modelului ARMA ( $p$  și  $q$ ). În cazul nostru am investigat combinații de modele cu  $p=1:2$  și  $q=1:3$ , în cazul modelului A și  $p=1:4$  și  $q=1:4$ , în cazul modelului B. Rezultatele obținute pentru modelele investigate sunt prezentate în tabelul 3, împreună cu valorile coeficienților Akaike și s-a constatat faptul că modelele cu cel mai mic coeficient Akaike sunt: ARIMA(2,2,2) pentru seria A și ARIMA(1,2,2) pentru seria B. Folosind coeficientul Jarque-Bera pentru analiza distribuției seriilor reziduale, putem spune că ambele serii ale variabilei reziduale sunt normal distribuite, având medie nulă și dispersie constantă (Jarque-Bera=0.864 cu p-value=0.649; seria A și Jarque-Bera=1.575 cu p-value=0.455 – seria B). În modelele rezultate în urma estimărilor, predicția a fost făcută pentru 5 perioade la interval de 3 zile (figura 26, 27, ec. 2, ec. 3).

Tabelul 3. Coeficienții Akaike a modelelor testate ARIMA, bazate pe seriile ce relevă evoluția biomasei sturionice.

| Model        | Akaike coefficient for series A model | Akaike coefficient for series B model |
|--------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| ARIMA(1,2,1) | 0.143                                 | 0.642                                 |
| ARIMA(1,2,2) | 0.325                                 | -3.019                                |
| ARIMA(1,2,3) | -                                     | -0.947                                |
| ARIMA(2,2,1) | 0.325                                 | 0.719                                 |
| ARIMA(2,2,2) | -4.010                                | 0.363                                 |
| ARIMA(2,2,3) | -                                     | 0.264                                 |
| ARIMA(3,2,1) | -                                     | -0.849                                |
| ARIMA(3,2,2) | -                                     | -1.305                                |
| ARIMA(3,2,3) | -                                     | -1.391                                |

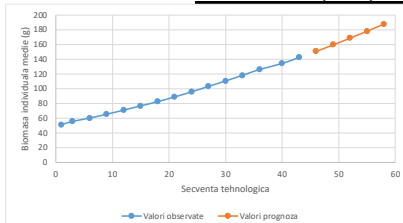


Figura 26. Analiză de prognoză pentru biomasa individuală aferentă scenariului tehnologic A

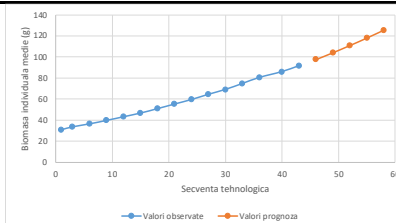


Figura 27. Analiză de prognoză pentru biomasa individuală aferentă scenariului tehnologic B

Modelul de prognoză a creșterii sturionilor pentru scenariul A  
 $d1a_t = 0.274 + 0.116 * d1a_{t-1} - 0.427 * d1a_{t-2} + 1.193 * u_{t-1} - 10.347 * u_{t-2}$  (2)

Modelul de prognoză a creșterii sturionilor pentru scenariul B  
 $d1a_t = 0.314 - 0.683 * d1a_{t-1} + 0.024 * u_{t-1} + 9.123 * u_{t-2}$  (3)

,unde  $d1a_t$  – seria staționară de ordin 2,  $d1a_{t-1}$  și  $d1a_{t-2}$  – seria staționară la momente anterioare de timp, iar  $u_{t-1}$  și  $u_{t-2}$  – este ordinul de medie mobilă care sunt reprezentate ca previziuni ale variabilei eroare.

Compoziția biochimică obținută din țesutul muscular al materialului sturionicol, consemnată la sfârșitul secvenței tehnologice, relevă diferențe semnificative statistic ( $p<0.05$ ) între cele scenarii tehnologice în ceea ce privește concentrația proteică și concentrația de lipide (Tabel 4).

Tabelul 4. Compoziția biochimică la nivelul țesutului muscular al materialului sturionicol, înregistrată la sfârșitul secvenței tehnologice

| Elementul compozit | VARIANTELE EXPERIMENTALE |            |
|--------------------|--------------------------|------------|
|                    | A                        | B          |
| Apa (%)            | 80,56                    | 82,57      |
| Proteine (%)       | 14,23±0,44               | 12,26±0,36 |
| Lipide (%)         | 1,17±0,09                | 1.02±0,05  |

|                                        |           |           |
|----------------------------------------|-----------|-----------|
| Cenușă (%)                             | 1,11±0,08 | 1,03±0,06 |
| Substanță uscată (%)                   | 19,44     | 17,43     |
| Apă/Proteine (A/P)                     | 5,66      | 6,73      |
| Substanțe extractive fara azot SEN (%) | 2,93      | 3,12      |

#### Performanța creșterii biomasei de busuioc, modele de forecasting

Analiza performanței de creștere a biomasei de busuioc relevă valori superioare pentru AR (61,40±10,24 cm), comparativ cu AH (57,67±9.96 cm), fapt confirmat și în cadrul variantelor acvaponice din cadrul secvenței tehnologice B, unde BR (43.67±5.59 cm) consemnează valori superioare ale înălțimii biomasei vegetale, la finalul ciclului de producție, comparativ cu BH (39.44±6.42 cm). Distribuția înălțimii busuiocului relevă un grad de dispersie ridicat în cazul AH și AR, comparativ cu BH și BR (Figura 28), fapt ce poate arăta o posibilă competiție pentru absorbția de nutrienți la nivelul variantelor acvaponice încadrate în secvența tehnologică B.

Biomasa individuală a busuiocului confirmă rezultatele biometrice asociate înălțimii busuiocului și prezentate anterior. Astfel, varianta AR consemnează o biomasă individuală medie de 35.23±14.43g, superioară celei înregistrate în cazul AH (27.27±8.99g), în timp ce și pentru BR se confirmă capacitatea GM R de a potența creșterea busuiocului, fiind înregistrată o valoare medie a biomasei individuale a busuiocului, la sfârșitul ciclului de producție, de 22.96±8.05g - BR, superioară celei de 19.2±4.71g din dreptul BH. Distribuția biomasei individuale a busuiocului relevă un grad de dispersie ridicat și o simetrie mai bună a valorilor în jurul mediei pentru AR și BR, comparativ cu AH și BH (Figura 29). Input-ul de nutrienți mai ridicat, consemnat în cazul scenariului tehnologic A, comparativ cu B, este reliefat prin valori superioare consemnate pentru numărul total de frunze per plantă (104 în cazul AR, 101 la AH, 86 la BR și 81 BH). De asemenea, suprafața foliară a consemnat valori superioare în cazul AR (6143,28 ± 2568,16 cm), comparativ cu AH (5629,86 ± 2813,59cm), respectiv în cazul BR (4123,49±2095,14cm), comparativ cu BH (3732,13±2630.09cm). Distribuția biomasei foliare indică o simetrie ridicată în cazul BH și BR, comparativ cu AR și AH – de asemenea, în cazul AR și AH, valorile sunt distribuite de-a lungul unui ecart mai larg (Figura 30). Raportul de masă rădăcină/suprafață foliară (R/S) reprezintă un indicator al gradului de sănătate a plantei (Blaxhall et al., 1973). Astfel, plantele atribuite AH înregistrează valorile cele mai ridicate de bunăstare în raport cu R/S, urmate de exemplarele crescute în cadrul AR, BH și BR (figura 31). Cu toate acestea, diferențele consemnate între variantele experimentale ce aparțin aceleiași scenariu tehnologic, dar se disting prin GM diferite, nu sunt semnificative din punct de vedere statistic ( $p < 0.05$ ). În cadrul tabelului 5 sunt prezentate diferențele procentuale asociate creșterii biomasei de busuioc de-a lungul ciclului de producție, obținute prin măsurători convenționale, precum și erorile/abaterile consemnate de modulul imagistic.

Tabel 5. Indicatorii procentuali asociați creșterii biomasei de busuioc și erorile modulului imagistic, raportate la determinările convenționale

| Interval timp | Conventional |              | Eroare modul imagistic |              | Conventional |              | Eroare modul imagistic |              | Conventional |              | Eroare modul imagistic |              | Conventional |              | Eroare modul imagistic |              |
|---------------|--------------|--------------|------------------------|--------------|--------------|--------------|------------------------|--------------|--------------|--------------|------------------------|--------------|--------------|--------------|------------------------|--------------|
|               | AH - LT (%)  | AH - ILS (%) | AH - LT (%)            | AH - ILS (%) | AR - LT (%)  | AR - ILS (%) | AR - LT (%)            | AR - ILS (%) | BR - LT (%)  | BR - ILS (%) | BR - LT (%)            | BR - ILS (%) | BH - LT (%)  | BH - ILS (%) | BH - LT (%)            | BH - ILS (%) |
| T1-3          | 14,65        | 38,35        | 2,86                   | 2,62         | 19,57        | 42,97        | 1,23                   | 0,64         | 9,00         | 23,35        | 3,60                   | 6,50         | 13,27        | 26,80        | 4,78                   | 3,89         |
| T3-6          | 9,03         | 34,14        | 2,62                   | 3,48         | 13,64        | 38,59        | 1,44                   | 1,00         | 4,59         | 26,20        | 3,44                   | 6,59         | 4,50         | 25,55        | 4,40                   | 4,37         |
| T6-9          | 18,03        | 78,52        | 3,01                   | 2,84         | 23,20        | 89,51        | 1,35                   | 1,33         | 14,91        | 55,00        | 3,71                   | 6,53         | 11,21        | 51,97        | 4,13                   | 4,37         |
| T9-12         | 14,58        | 85,38        | 3,51                   | 3,04         | 11,69        | 75,88        | 0,95                   | 0,96         | 12,21        | 53,57        | 4,27                   | 6,89         | 6,98         | 55,83        | 4,36                   | 3,97         |
| T12-15        | 21,03        | 35,30        | 2,91                   | 2,71         | 23,84        | 34,20        | 1,07                   | 0,71         | 17,01        | 61,02        | 3,65                   | 6,49         | 16,67        | 44,73        | 4,12                   | 4,30         |
| T15-18        | 14,32        | 38,35        | 3,60                   | 3,32         | 10,80        | 43,15        | 0,78                   | 1,40         | 12,21        | 44,27        | 3,70                   | 6,34         | 16,15        | 56,04        | 3,99                   | 4,39         |
| T18-21        | 10,12        | 25,83        | 3,13                   | 2,63         | 15,68        | 24,54        | 1,03                   | 1,37         | 21,76        | 20,52        | 3,59                   | 6,66         | 19,79        | 20,07        | 4,70                   | 4,58         |
| T21-24        | 17,54        | 33,25        | 3,55                   | 3,21         | 18,32        | 28,61        | 0,66                   | 1,01         | 16,60        | 38,61        | 3,73                   | 7,08         | 13,84        | 39,27        | 4,17                   | 4,27         |
| T24-27        | 18,78        | 14,80        | 3,38                   | 3,49         | 18,89        | 14,61        | 0,72                   | 1,46         | 7,66         | 17,60        | 3,43                   | 6,68         | 12,16        | 22,03        | 3,92                   | 4,73         |
| T27-30        | 7,98         | 25,03        | 3,42                   | 3,28         | 3,39         | 22,36        | 1,18                   | 0,96         | 9,15         | 27,84        | 3,68                   | 6,71         | 7,34         | 26,70        | 4,72                   | 4,00         |
| T30-33        | 11,90        | 17,44        | 3,44                   | 3,27         | 11,34        | 18,74        | 1,11                   | 1,48         | 9,94         | 11,70        | 4,14                   | 6,22         | 6,19         | 9,26         | 4,37                   | 4,32         |
| T33-36        | 10,16        | 14,25        | 3,25                   | 2,72         | 9,95         | 17,44        | 1,57                   | 0,94         | 8,76         | 11,54        | 4,15                   | 6,28         | 7,67         | 11,65        | 3,88                   | 4,26         |
| T36-40        | 9,44         | 19,85        | 2,71                   | 3,20         | 11,73        | 19,46        | 0,80                   | 1,20         | 8,31         | 15,53        | 3,53                   | 6,90         | 3,99         | 16,62        | 4,20                   | 4,19         |
| T40-43        | 12,85        | 29,45        | 3,00                   | 3,57         | 13,08        | 33,75        | 1,27                   | 0,89         | 4,72         | 22,12        | 4,03                   | 6,23         | 8,05         | 18,87        | 4,71                   | 4,43         |
| avg           | 13,60        | 35,00        | 3,17                   | 3,10         | 14,65        | 35,99        | 1,08                   | 1,10         | 11,20        | 30,63        | 3,76                   | 6,58         | 10,56        | 30,39        | 4,32                   | 4,29         |

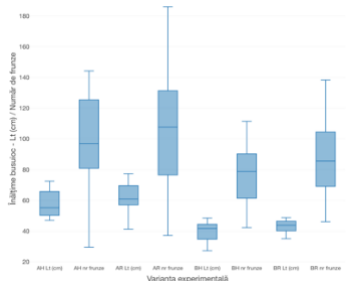


Figura 28. Distribuția înălțimii busuiocului și nr. de frunze per plantă

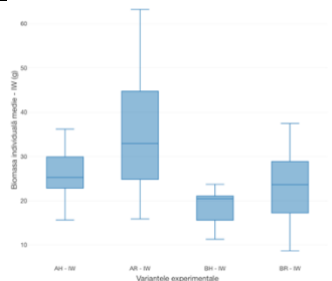


Figura 29. Biomasa individuală busuioc la sfârșitul ciclului de producție

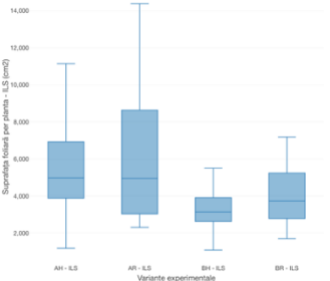


Figura 30. Suprafață foliară busuioc la sfârșitul ciclului de producție

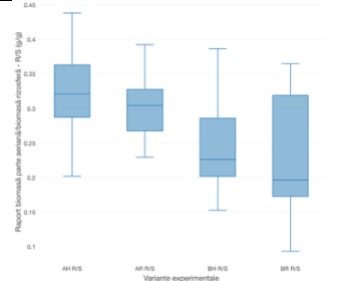


Figura 31. Raport biomasă parte aeriană / biomasă rădăcină busuioc

Modelul de prognoză dezvoltat, ce urmărește evoluția creșterii busuiocului în înălțime, folosind modele ARIMA, presupune stabilizarea seriilor de date, fapt ce a fost realizat prin transformarea rădăcinii pătrate a acestora. Pentru investigarea staționarității seriilor de timp, s-a realizat testul ADF (tabel 6), însă înainte au fost logaritmizate pentru că seria era exponențială și s-a dorit ca datele să fie de aceeași formă. După cum se poate observa în tabelul 6, pentru AH și AR seria se staționarizează la prima diferență ( $d=1$ ), în schimb, seria BH se staționarizează la diferența de ordinul 3 ( $d=3$ ), iar seria B.R se staționarizează la diferența de ordinul doi ( $d=2$ ). După ce s-au realizat diferențele de diferite ordine, seriile de timp devin staționare. Se folosesc coeficienții AC și PAC (figurile A5 – A12, ANEXA VII) ale diferențelor pentru a estima parametrii modelului ARIMA.

Ordinile coeficienților AC sunt utili în determinarea ordinului de medie mobilă, în timp ce ordinul PAC este folosit pentru stabilirea ordinului autoregresiv. Alegerea ordinului pentru partea autoregresivă și cea mobilă folosindu-ne doar de vizualizarea corelogramei poate fi uneori neconcludentă. Acest lucru poate fi văzut prin simularea diferitelor modele ARIMA. Totuși, pentru a selecta cel mai apropiat model se pot încerca diferite ordine pentru cei doi coeficienți ai modelului ARMA ( $p$  și  $q$ ). În cazul nostru am investigat combinații de modele cu  $p=1:2$  și  $q=1:2$ , în cazul modelului AH,  $p=1:2$  și  $q=1:2$  pentru modelul AR,  $p=1:3$  și  $q=1:3$  pentru modelul BH și  $p=1:4$  și  $q=1:4$ , în cazul modelului BR. Rezultatele obținute pentru modelele investigate sunt prezentate în tabelul 6 împreună cu valorile coeficienților Akaike.

Tabel 6. Coeficientul Akaike aferent modelelor de prognoză ARIMA testate

| Model        | Akaike coefficient for series A model | Akaike coefficient for series B model |
|--------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| ARIMA(1,2,1) | 0.143                                 | 0.642                                 |
| ARIMA(1,2,2) | 0.325                                 | -3.019                                |
| ARIMA(1,2,3) | -                                     | -0.947                                |
| ARIMA(2,2,1) | 0.325                                 | 0.719                                 |
| ARIMA(2,2,2) | -4.010                                | 0.363                                 |
| ARIMA(2,2,3) | -                                     | 0.264                                 |
| ARIMA(3,2,1) | -                                     | -0.849                                |
| ARIMA(3,2,2) | -                                     | -1.305                                |
| ARIMA(3,2,3) | -                                     | -1.391                                |

Aşa cum se poate observa în tabelul 6, modelele cu cel mai mic coeficient Akaike sunt: ARIMA(1,1,2) pentru seria AH, respectiv ARIMA(2,1,2) pentru seria AR şi ARIMA(2,3,2) pentru seria BH şi respectiv ARIMA(2,2,2) pentru seria BR. Folosind coeficientul Jarque-Bera pentru analiza distribuţiei seriilor reziduale, putem spune că toate seriile variabilei reziduale sunt normal distribuite, având medie nulă şi dispersie constantă (Jarque-Bera=0.597 cu p-value=0.742 – seria AH, Jarque-Bera=1.409 cu p-value=0.494 – seria AR, Jarque-Bera=0.558 cu p-value=0.756 – seria BH şi Jarque-Bera=3.644 cu p-value=0.162 – seria BR). Atunci când se dezvoltă modele ARIMA, scopul lor este de a prezice valorile viitoare ale variabilei ținând cont de datele existente. În acest caz, modelul ia în calcul două abordări: valorile care sunt folosite pentru estimarea modelului de prognoză şi valorile prognozate conform modelului identificat. În modelele rezultate în urma estimărilor, predicţia a fost făcută pentru cinci perioade (o perioadă reprezintă 3 zile) şi este reprezentă în cadrul figurilor 32 – 35.

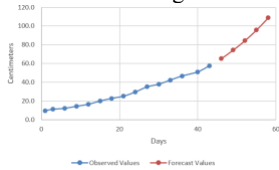


Figura 32. Prognoza înălțimii busuiocului pentru AH

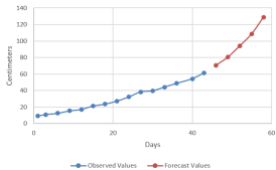


Figura 33. Prognoza înălțimii busuiocului pentru AR

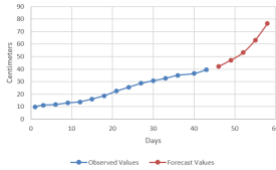


Figura 34. Prognoza înălțimii busuiocului pentru BH

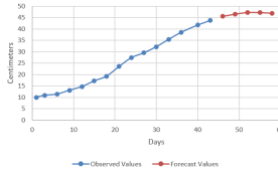


Figura 35. Prognoza înălțimii busuiocului pentru BR

Modelele de prognoză folosite pentru înălțimea busuiocului sunt următoarele:

AH:  $dlheight_t = 0.055 - 0.572 * dlheight_{t-1} + 0.97 * u_{t-1}$

AR:  $dlheight_t = 0.095 - 0.283 * dlheight_{t-1} + 1.091 * dlheight_{t-2} + 0.960 * u_{t-1} + 5.771 * u_{t-2}$

BH:  $dlheight2_t = 0.001 - 0.180 * dlheight2_{t-1} + 0.692 * dlheight2_{t-2} + 3.145 * u_{t-1} + 0.363 * u_{t-2}$

BR:  $dlheight1_t = -0.003 - 0.005 * dlheight1_{t-1} + 0.595 * dlheight1_{t-2} + 1.41 * u_{t-1} + 7.346 * u_{t-2}$

, unde  $dlheight1_t$  – reprezintă seria staționară la momentul curent,  $dlheight1_{t-1}$  – reprezintă seria staționară la un moment anterior,  $dlheight1_{t-2}$  – reprezintă seria staționară la două momente anterioare, iar  $u_{t-1}$  și  $u_{t-2}$  – reprezintă partea mobilă a relației și indică regresia variabilei reziduale.

Modelele pentru prognoza suprafeței foliare a busuiocului, în corelație cu prognoza înălțimii busuiocului, au următoarele forme:

$leaf_t = -609.9712 + 123.2459 * height_t$   $R^2 = 0.945$  pentru AH;  $leaf_t = -665.5813 + 126.1758 * height_t$   $R^2 = 0.916$  pentru AR;

$leaf_t = -369.8742 + 138.1249 * height_t$   $R^2 = 0.848$  pentru BH;  $leaf_t = -524.9811 + 125.0911 * height_t$   $R^2 = 0.891$  pentru BR.

Concentrația de elemente (Ca, Mg, Fe și K) la nivelul biomasei foliare a busuiocului

La sfârșitul secvenței tehnologice, concentrația de P din biomasa foliară a busuiocului a înregistrat valori medii superioare în cazul AR (86.64±7.06mg/100gFW) comparativ cu AH (83.09±5.32mg/100gFW), respectiv 57,55±3.43mg/100gFW pentru BR, comparativ cu 51,82±2.82mg/100gFW în cazul BH (Figure 36). În cazul concentrației de Ca din biomasa foliară a busuiocului, valori medii superioare sunt asociate AR (193.13±16.77mg/100gFW) comparativ cu AH (189.46±20.38mg/100gFW), respectiv 142,18±24.09mg/100gFW pentru BR, comparativ cu 138,79±21.11mg/100gFW în cazul BH (Figure X37). Concentrația de Mg din biomasa foliară a busuiocului confirmă relațiile cantitative reliefate mai sus, în cazul P și Ca, astfel, se înregistrează o concentrație medie de Mg de 92,75±4.02mg/100gFW pentru biomasa rezultată în cadrul AR, 86,18±3.11mg/100gFW pentru AH, 76,33±2.77mg/100gFW pentru BR, respectiv 70,12±2.81mg/100gFW pentru BH (Figure 38).

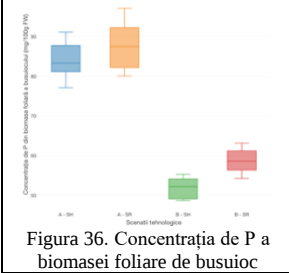


Figura 36. Concentrația de P a biomasei foliare de busuioc

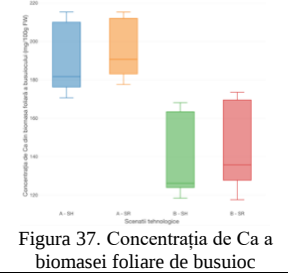


Figura 37. Concentrația de Ca a biomasei foliare de busuioc

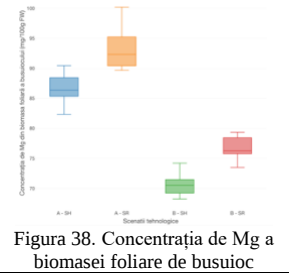


Figura 38. Concentrația de Mg a biomasei foliare de busuioc

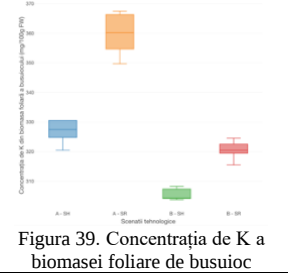


Figura 39. Concentrația de K a biomasei foliare de busuioc

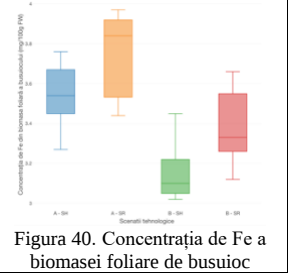


Figura 40. Concentrația de Fe a biomasei foliare de busuioc

Elementul K a fost identificat la nivelul biomasei foliare a busuiocului în concentrații superioare comparativ cu celelalte elemente analizate. Astfel, cea mai mare concentrație de K se asociază AR (355,41±7.13mg/100gFW), urmat fiind de AH (328,13±8.74mg/100gFW), BR (321,24±3.65mg/100gFW) și BH (303,25±2.25mg/100gFW) (Figure 39). Fierul este recunoscut drept principalul element limitativ la nivelul sistemelor acvaponice. Astfel, în cazul prezentului experiment a fost necesară adăugarea de fier chelat la nivelul sistemului (s-a urmărit asigurarea unei concentrații minime de aprox. 0,15 mg/L în dorința de a asigura o matrice nutrițională optimă, echilibrată, pentru dezvoltarea busuiocului. În aceste condiții s-au identificat concentrații de fier reduse la nivelul masei foliare a busuiocului, de 3,68±0,22mg/100gFW în cazul AR, 3,56±0,14mg/100gFW pentru AH, 3,24±0,13mg/100gFW pentru BR, respectiv 3,13±0,12mg/100gFW în cazul BH (Figure 40). Astfel, concentrația de P, Ca, Mg, Fe și K a biomasei foliare de busuioc a înregistrat valori superioare în cadrul variantelor aparținând bateriei de creștere A, comparativ cu B, fapt argumentat de input-ul de nutrienți superior. De asemenea, se confirmă capacitatea GM R de a asigura o mai bună fixare a nutrienților analizați, la nivelul biomasei foliare a busuiocului, comparativ cu GM H.

Evaluarea bunăstării biomasei piscicole

La pești, țesutul sanguin, împreună cu aparatul hematopoietic participă activ la procesele metabolice permanente ale organismului, asigurând, pe lângă schimburile gazoase și de substanțe dintre acestea și mediu, o adaptare constantă la diferite condiții nou apărute. Prin circulația sa sângele asigură legătura dintre diferite organe și funcțiile fiziologice (Cretu, 2013). Rezultatele privind indicii hematologici și unii indici biochimici ai sângelui pentru cele două scenarii tehnologice A și B sunt prezentați în Tabelul 7. Pe durata secvenței tehnologice numărul de eritrocite s-a încadrat în intervalul 0,455 și 0,694 eritr./ $\mu$ l sange  $\times 10^6$ , acesta fiind un interval optim pentru specia *A. baerii*, la finalul acesteia se observă o îmbunătățire cu 6,42% în scenariul A față de scenariul B (Tabelul 7). În ceea ce privește hematocritul se observă o creștere a acestuia la final cu 6,72% tot în scenariul A față de scenariul B (Tabelul 7). La momentul inițial valorile s-au încadrat în ecartul 22,00 – 27,60%, iar la momentul final în intervalul 21,93 – 27,39%. Concentrația de hemoglobină a înregistrat o creștere cu 16,84% în scenariul A și cu 8,72% la final față de momentul inițial al secvenței tehnologice (Tabelul 7). Referitor la constantele eritrocitare la finalul secvenței tehnologice s-a observat o reducere a constantei VEM și HEM și o ușoară creștere a constantei CHEM (Tabelul 7). La finalul acestei secvențe constanta VEM a prezentat valori ce s-au regăsit în intervalul 372,33 fL și 420,90 fL, constanta HEM între 92,60 pg și 108,52 pg, iar constanta CHEM între 23,58 g/dL și 28,32 g/dL.

Tabelul 7. Profilul hematologic și parametrii biochimici ai sângelui la începutul și finalul secvenței tehnologice

| Secvența tehnologică I | Scenariu tehnologic | Parametru analizat                                |                |                    |              |             |             |                 |                        |                |                  |
|------------------------|---------------------|---------------------------------------------------|----------------|--------------------|--------------|-------------|-------------|-----------------|------------------------|----------------|------------------|
|                        |                     | Nr. Eritr. (eritr./ $\mu$ l sange $\times 10^6$ ) | Hematocrit (%) | Hemoglobina (g/dL) | VEM (fL)     | HEM (pg)    | CHEM (g/dL) | Glucosa (mg/dL) | Proteine totale (g/dL) | Lizozim (U/mL) | Cortisol (ng/dL) |
| Inițial                | A                   | 0.51±0.07                                         | 24.63±2.3      | 5.76±0.89          | 485,25±35,77 | 112.39±4.46 | 23,33±2,39  | 93,68±2,91      | 4,65±0.58              | 7,41±0.83      | 50,01±0,98       |
|                        | B                   | 0.54±0.03                                         | 24,27±1,22     | 5,85±0,51          | 452,12±35,73 | 108,69±7,27 | 24,28±3,28  | 93,89±1,61      | 4,34±0,44              | 7,57±0,45      | 49,44±1,36       |
| Final                  | A                   | 0.66±0.04                                         | 26,37±0,92     | 6,73±0,57          | 402,77±12,84 | 102,76±7,20 | 25,51±1,60  | 81,07±1,36      | 5,1±0,54               | 10,34±1,11     | 41,9±2,65        |
|                        | B                   | 0.62±0.03                                         | 24,71±1,87     | 6,36±0,45          | 394,58±15,74 | 103,29±4,16 | 26,23±1,74  | 85,39±3,12      | 5,17±0,41              | 10,61±1,09     | 42,88±1,60       |

În ceea ce privește concentrația de GLU s-a observat o reducere semnificativă ( $p<0,05$ ) cu 15,55% în scenariul și o reducere nesemnificativă ( $p>0,05$ ) cu 9,95% în scenariul B față de momentul inițial (Tabelul 7). În cazul cortizolului reducerea a fost semnificativă ( $p<0,05$ ) cu 19,36% în scenariul A, respectiv cu 15,30% în scenariul B față de momentul inițial. Aceste analize arătându-ne faptul că introducerea în dietă a unei concentrații de 2% busuioc conduce are rolul de a reduce apariția stresului tehnologic.

Pe durata secvenței tehnologice s-a observat o ușoară creștere a concentrației de proteine totale, valoarea cea mai mare înregistrându-se în scenariul B ( $5,17\pm0,41$  g/dL) (Tabelul 7). La momentul inițial valorile s-au încadrat în intervalul 3,87 – 5,27 g/dL, iar la final în ecartul 4,52 – 5,91 g/dL. La finalul secvenței tehnologice s-a înregistrat o intensificare semnificativă ( $p<0,05$ ) a activității lizozimului cu 40,16% în cazul scenariului B, respectiv cu 39,54% în cazul scenariului A (Tabelul 7). Acest lucru denotând o îmbunătățire a sistemului imunitar al organismului, făcându-l mai rezistent la îmbolnăvire.

La finalul secvenței tehnologice putem trasa ca și concluzie faptul că în urma administrării în dieta biomasei piscicole a unei concentrații de 2% busuioc se observă o creștere a numărului de eritrocite, o îmbunătățire a hematocritului, a concentrației de hemoglobină și a constantelor eritrocitare, a proteinelor totale, o intensificare a activității lizozimului și o reducere a stresului prin obținerea unor concentrații mai mici de glucoză și cortisol în scenariul tehnologic A, urmat de cel B. Pentru o evaluare cât mai amănunțită a stării de sănătate a biomasei de cultură se recurge la analiza stresului oxidativ. Acesta poate fi definit ca fiind o creștere temporară sau permanentă a speciilor reactive de oxigen (ROS) ce perturbă buna desfășurare a metabolismul celular prin distrugerea/oxidarea diferitelor tipuri de celule (Bagnyukova et al. 2006). Acest fapt conduce la apariția radicalilor liberi în organism. La o primă analiză a parametrilor stresului oxidativ prezentați în tabelul 8 se poate observa faptul că administrarea în dieta speciei *A. baerii* a unei concentrații de 2% busuioc a condus la reducerea stresului oxidativ mai ales în scenariul A, față de scenariul B.

Tabelul 8. Parametrii stresului oxidativ la începutul și finalul secvenței tehnologice din țesut muscular (M), ficat (F) și intestin (I)

| Parametru analizat             | Scenariu tehnologic |              |              |             |              |              |
|--------------------------------|---------------------|--------------|--------------|-------------|--------------|--------------|
|                                | A                   |              |              | B           |              |              |
|                                | M                   | F            | I            | M           | F            | I            |
| Inițial secvența tehnologică I |                     |              |              |             |              |              |
| Proteina (mg/mL)               | 13,17±0,52          | 15,81±2,15   | 14,27±1,01   | 13,09±0,64  | 14,00±3,49   | 8,32±0,91    |
| CAT (U/mg proteina)            | 16,58±4,12          | 27,18±6,18   | 34,22±8,01   | 15,97±5,46  | 26,83±7,30   | 35,51±3,89   |
| SOD (U/mg proteina)            | 0,61±0,48           | 0,51±0,34    | 0,89±0,47    | 0,47±0,39   | 0,49±0,23    | 0,72±0,36    |
| MDA (U/mg proteina)            | 85,21±9,11          | 252,13±48,61 | 417,29±61,73 | 91,14±31,38 | 261,18±39,46 | 493,64±25,89 |
| TAC (mM Trolox)                | 9,98±2,68           | 11,02±2,11   | 14,05±3,14   | 10,23±3,54  | 12,57±1,89   | 14,11±2,97   |
| Final secvența tehnologică I   |                     |              |              |             |              |              |
| Proteina mg/mL                 | 16,36±0,87          | 19,30±1,08   | 22,31±0,71   | 14,99±0,59  | 14,51±2,96   | 10,11±0,61   |
| CAT (U/mg proteina)            | 21,36±3,85          | 48,96±4,13   | 89,20±6,75   | 18,99±3,84  | 34,69±4,28   | 38,41±7,52   |
| SOD (U/mg proteina)            | 1,19±0,39           | 1,25±0,52    | 2,49±0,67    | 0,53±0,31   | 0,59±0,37    | 0,91±0,28    |
| MDA (U/mg proteina)            | 49,17±5,22          | 149,38±16,54 | 261,82±38,99 | 79,61±21,27 | 203,05±25,18 | 425,81±30,16 |
| TAC (mM Trolox)                | 15,87±0,74          | 12,51±0,32   | 18,06±1,87   | 14,28±0,61  | 11,47±0,69   | 17,46±0,92   |

Astfel valori superioare ale activității catalazei, superoxid dismutazei și capacității antioxidante din țesutul muscular, ficat și intestin s-au remarcat la finalul secvenței tehnologice în scenariul A comparativ cu scenariul B, activități ce sunt corelate cu o reducere a peroxidării lipidice (MDA) (Tabelul 8). În ceea ce privește conținutul de proteine al fiecărui țesut analizat la finalul secvenței tehnologice s-a observat o creștere în toate țesuturile față de momentul inițial. Cea mai mare valoare a conținutului de proteine s-a înregistrat la nivelul ficatului de scenariul A (final), iar cea mai mică valoare la nivelul intestinului din scenariul B (inițial).

#### Dinamica nutrienților la nivelul apei tehnologice și rata de retenție a acestora la nivelul unităților acvaponice

Dinamica concentrației de  $\text{NH}_4^+$  a înregistrat valori mai scăzute la evacuare (0,058 mg/L în AH, 0,093 mg/L în AR, 0,056 mg/L în BH și 0,054 mg/L în BR) față de alimentare (0,074 mg/L în AH, 0,116 mg/L în AR, 0,070 mg/L în BH și 0,064 mg/L în BR), fapt ce confirmă absorbția nutrienților la nivelul unităților acvaponice. Același fenomen s-a evidențiat și în cazul concentrației de  $\text{NO}_2$ , respectiv Ca care a manifestat valori mai scăzute la evacuare (0,08 mg/L, respectiv 36,43 mg/L în AH, 0,10 mg/L, respectiv 39,19 mg/L în AR, 0,05 mg/L, respectiv 19,93 mg/L în BH, 0,10 mg/L, respectiv 20,92 în BR). În cazul concentrației de  $\text{NO}_3$ , diferențele dintre valorile înregistrate la alimentare vs evacuare au fost nesemnificative (Figura 41).

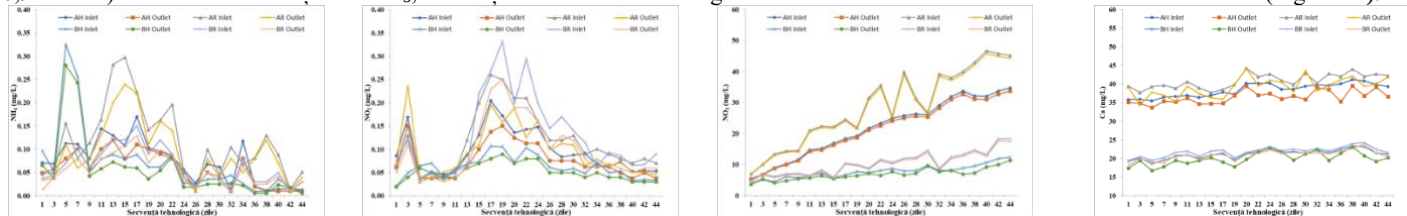


Fig. 41. Dinamica concentrației de  $\text{NH}_4$ ,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{NO}_3$ , respectiv Ca în cadrul diverselor scenariilor tehnologice

În ceea ce privește dinamica concentrației de Mg, aceasta a înregistrat valori medii de 16,80 mg/L în AH alimentare, de 15,99 mg/L în AH evacuare, 17,65 mg/L în AR alimentare, 16,90 mg/L în AR evacuare, 11,28 mg/L în BH alimentare, 10,85 mg/L în BH evacuare, 11,73 mg/L în BR alimentare și 11,39 în BR evacuare (Figura 42). Potențialul de hidrogen al apei nu a înregistrat diferențe semnificative în cadrul scenariilor tehnologice și a înregistrat valori cuprinse în ecartul 6,40 – 6,88 unități de pH (Figura 42). Același fenomen s-a consemnat și în cazul temperaturii apei tehnologice, întrucât valorile medii înregistrate nu au înregistrat diferențe semnificative la nivelul diferitelor scenarii tehnologice și au fost cuprinse în ecartul 23,3 – 23,5°C. Conductivitatea a înregistrat un trend ascendent de-a lungul desfășurării secvenței tehnologice, cu valori mai reduse la nivelul evacuărilor comparativ cu alimentările (Figura 42).

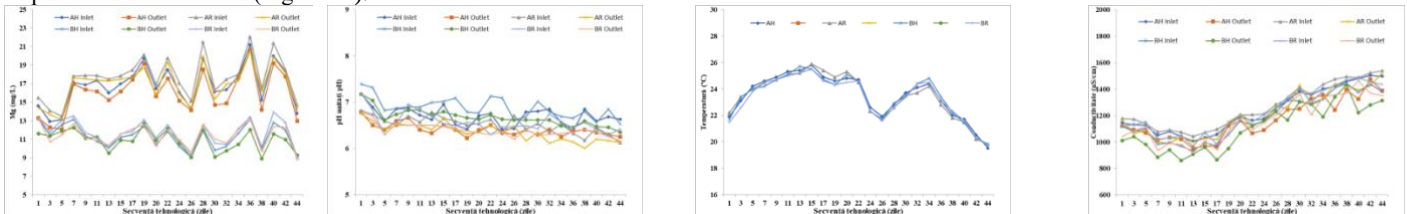


Fig. 42. Dinamica concentrației de Mg, a pH-ului, temperaturii și conductivității în cadrul diverselor scenariilor tehnologice

Concentrația de oxigen dizolvat a înregistrat un trend evident descendent spre finalul desfășurării secvenței tehnologice în fiecare variantă tehnologică. Valorile medii înregistrate au fost de 7,67 mg/L în AH alimentare, 7,53 mg/L în AH evacuare, 8,04 mg/L în AR alimentare, 7,98 mg/L în AR evacuare, 7,72 mg/L în BH alimentare, 7,68 mg/L în BH evacuare, 8,09 mg/L în BR alimentare și 8,07 mg/L în BR evacuare (Figura 43). Rata de retenție aferentă concentrației de  $\text{NH}_4$  a fost dinamică pe toată perioada desfășurării experimentului și a înregistrat valori medii de 20,75% în AH, 19,58% în AR, 26,53% în BH, respectiv 18,95% în BR. În ceea ce privește retenția de  $\text{NO}_2$ , s-au înregistrat valori medii de 19,23% în AH, 10,15% în AR, 15,20% în BH, 21,14% în BR (Figura 44). Rata de retenție aferentă concentrației de  $\text{NO}_3$  a fost constantă în AR pe toată perioada desfășurării experimentului și a înregistrat valoarea medie de 2,02%, în timp ce în AH valoarea medie a fost de 3,16%. În ceea ce privește retenția de  $\text{NO}_3$  în BH și BR, s-au înregistrat valori medii de 4,22%, respectiv 4,11% (Figura 45).

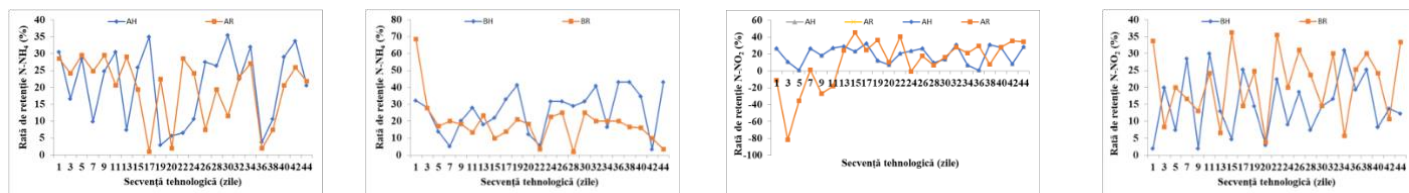


Fig. 44. Rata de retenție aferentă concentrației de  $\text{NH}_4$  și  $\text{NO}_2$

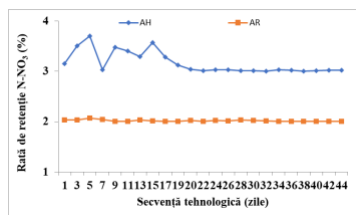


Fig. 45. Rata de retenție aferentă concentrației de  $\text{NO}_3$

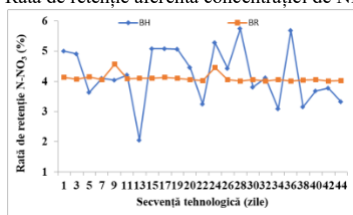


Fig. 43 Concentrația de oxigen solvit (DO)

#### Design demonstrare funcționalitate pentru scenarii tehnologice A1, A2, B1 și B2

Pentru realizarea dezideratului de demonstrare a funcționalității în condiții industriale a sistemului multi-trofic și a tehnologiei inovative, s-au luat în considerare 2 secvențe tehnologice ulterioare celor prezentate mai sus, în cadrul acestora fiind aplicate două concentrații de busuioc la nivelul furajului, de 1%, respectiv de 2%. Astfel, materialul biologic provenit din bateria de producție piscicolă A, a fost divizat în alte două baterii A1, respectiv A2, fapt valabil și pentru materialul asociat bateriei de producție piscicolă B, rezultând B1 și B2. În cadrul celor 4 baterii de producție piscicolă rezultate, au fost aplicate două concentrații de busuioc în scopul de a aditiva furajul administrat, după cum urmează: 2% pulbere busuioc în cadrul A1, 1% în cadrul A2, 2% în cadrul B1 și 1% în cadrul B2. Astfel, în cadrul infrastructurii de producție sturionicolă industrială deținută de beneficiarul prezentului proiect, SC SILURUS MARKET SRL, au fost surprinse 4 scenarii tehnologice (A1, A2, B1, B2) asociate unui număr de 2 secvențe tehnologice, după cum urmează: A1, A2 – creșterea biomasei sturionicole de la o biomasă inițială individuală medie (IW) de  $296,88 \pm 50,15$  g/ex - A1 și  $317,63 \pm 62,68$  g/ex - A2 la  $740,46$  g/ex - A1 și  $729,85$  g/ex - A2, respectiv B1, B2 – creșterea biomasei sturionicole de la IW inițial de  $174,81 \pm 47,37$  g/ex - B1 și  $174,69 \pm 30,25$  g/ex - B2 la  $396,93$  g/ex la B1 și  $374,75$  g/ex - B2. A fost aplicată o rație de furajare de 1,3% BW pentru fiecare din scenariile tehnologice. Furajul administrat are un conținut proteic de 56% (AllTech Coppens Supreme10®, de 2mm), iar pulberea de busuioc a fost aditivată la nivelul furajului conform protocolului descris mai sus, în cadrul secțiunii *design experimental* *scenarii tehnologice A și B*. Modulul imagistic destinat identificării indicelui asociat sporului de creștere a biomasei sturionicole este utilizat în totalitate, în mod independent, de-a lungul secvențelor tehnologice analizate, rezultatele fiind verificate numai la sfârșitul celor 90 zile. Cele patru baterii de producție piscicolă, aferente scenariilor tehnologice A1, A2, B1, B2, au fost conectate, de-a lungul întregii secvențe tehnologice, în cadrul sistemului multi-trofic integrat. Astfel, unitățile de creștere din cadrul A1 au fost conectate la unitățile acvaponice A1R1 și A1R2, cele din A2 la unitățile acvaponice A2R1 și A2R2, B1 la unitățile acvaponice B1R1 și B1R2, respectiv cele din B2 la unitățile acvaponice B2R1 și B2R2. Au fost aplicate două seturi de parametrii hidraulici, asociați modulelor acvaponice, după cum urmează: HLR de 6 m/zi și HRT de 0,7 h în cazul A1R1, A2R1, B1R1, B2R1, respectiv HLR de 10,74 m/zi și HRT de 0,5 h în cazul A1R2, A2R2, B1R2, B2R2. Testarea unor regimuri hidraulice diferite a fost considerată a fi o necesitate în condițiile investigării unor secvențe tehnologice diferite semnificativ ( $p < 0.05$ ) în ceea ce privește cantitatea de hrană administrată, respectiv input-ul de nutrienți la nivelul sistemului acvaponic.

Modulul imagistic destinat supervizării creșterii biomasei de busuioc (lungime totală plantă - LT și suprafață foliară totală - ILS), precum și pentru identificării eventualelor deficiențe nutriționale ce pot apărea de-a lungul procesului tehnologic la nivelul biomasei vegetale, a fost pus în funcțiune în momentul transplantării răsadurilor de busuioc la nivelul modulelor acvaponice menționate anterior, și anume în ziua 42 a secvenței tehnologice expuse pentru biomasa piscicolă. Astfel, din momentul transplantării, ciclul de producție a busuiocului a durat 48 zile, până la finalul secvenței tehnologice analizate. Dinamica înălțimii și suprafeței foliare a busuiocului pe fost monitorizată imagistic și demonstrarea acurateții metrice a modulului s-a realizat prin asocierea indicilor procentuali de creștere rezultați cu indicii consemnați în urma măsurătorilor manuale.

#### Rezultate și discuții scenarii tehnologice A1, A2, B1 și B2

În urma analizei indicatorilor de performanță a creșterii înregistrată pentru fiecare din cele 4 scenarii tehnologice, se constată faptul că folosirea unui furaj aditivat cu o concentrație superioară de busuioc de 2% nu are impact statistic semnificativ ( $p < 0.05$ ) în ceea ce privește îmbunătățirea performanțelor de creștere a *A. baerii*. Cu toate acestea, asociat A1, respectiv B1, variantele care au beneficiat de aditivarea cu busuioc în concentrație superioară (2%), au fost observate rezultate superioare în ceea ce privește IW (cu 1,45% în cazul A1 față de A2, respectiv cu 5,58% pentru B1 în raport cu B2), SIC (cu 7,61% în cazul A1 față de A2, respectiv cu 9,93% pentru B1 în raport cu B2), RGR (cu 15,12% în cazul A1 față de A2, respectiv cu 9,87% pentru B1 în raport cu B2) și SGR (cu 9,85% în cazul A1 față de A2, respectiv cu 6,92% pentru B1 în raport cu B2) (Tabel 9). De asemenea, valorile coeficientului Fulton sunt superioare celor raportate în cadrul altor studii științifice, pentru specia *A. baerii*, fapt ce confirmă condiția bună a biomasei sturionicole. De asemenea, variantele A1 și A2 au înregistrat o producție superioară, dar o eficiență inferioară a hrănirii, reliefată prin valorile superioare ale FCR (Tab 9).

Tabel 9. Indicatorii de performanță a creșterii pentru *A. baerii* crescut în cadrul celor 4 scenarii tehnologice (A1, A2, B1, B2)

| Indicator tehnologic                                             | Scenarii tehnologice |        |        |        |
|------------------------------------------------------------------|----------------------|--------|--------|--------|
|                                                                  | A1                   | A2     | B1     | B2     |
| Masă medie corporală - IW <sub>i</sub> (g) - Initial             | 296,88               | 317,63 | 174,81 | 174,69 |
| Masă medie corporală IW <sub>f</sub> (g) - Final                 | 740,46               | 729,85 | 396,93 | 374,75 |
| Lungime totală LT <sub>i</sub> (cm) - Initial                    | 47,80                | 48,50  | 40,50  | 40,70  |
| Lungime totală LT <sub>f</sub> (cm) - Final                      | 62,00                | 62,10  | 51,50  | 50,30  |
| Spor individual de creștere SIC (g/ex)                           | 443,58               | 412,22 | 222,12 | 200,06 |
| Perioada experimentală (zile)                                    | 90                   |        |        |        |
| Densitatea de stocare inițial (kg/m <sup>3</sup> )               | 10,10                | 10,20  | 5,60   | 5,60   |
| Densitatea de stocare final (kg/m <sup>3</sup> )                 | 19,25                | 18,98  | 11,91  | 11,99  |
| Ritm zilnic de creștere RC (g/ex/zi)                             | 4,93                 | 4,58   | 2,47   | 2,22   |
| Rata relativă de creștere RGR (g/g/zi)                           | 0,017                | 0,014  | 0,014  | 0,013  |
| Proteina brută furaj (%)                                         | 56                   |        |        |        |
| Rata specifică de creștere - SGR (%BW/zi)                        | 1,02                 | 0,92   | 0,91   | 0,85   |
| Factorul de conversie a hranei - FCR (g furaj / g spor biomasă)  | 0,61                 | 0,63   | 0,55   | 0,55   |
| Coeficientul de eficiență proteică - PER (g/g)                   | 1,38                 | 1,32   | 1,72   | 1,75   |
| Coeficientul de variație a masei corporale - CV <sub>m</sub> (%) | 22,42                | 24,85  | 28,28  | 32,91  |
| Coeficientul Fulton (CF)                                         | 0,51                 | 0,52   | 0,47   | 0,47   |

Distribuția valorilor LT pentru cele 4 scenarii tehnologice (Figura 46) releva o distribuție cu grad de simetrie superior în cazul scenariilor tehnologice B1 și B2, comparativ cu A și A2. De asemenea, se observă un grad ridicat de dispersie în cadrul B2 și A2, comparativ cu B1 și A1, fapt ce releva o probabilitate scăzută de apariție a valorilor extreme de LT atunci când este aplicată o concentrație de 1% pentru aditivarea cu busuioc a furajului administrat. În cazul

IW se observă o distribuție simetrică a datelor la finalul celor 90 zile, atât în cazul A1, cât și pentru A2 (Figura 47), comparativ cu B1, B2. Gradul de dispersie a valorilor în jurul mediei este mai redus în cazul B1, comparativ cu B2, fapt ce confirmă rezultatele obținute din analiza distribuției LT.

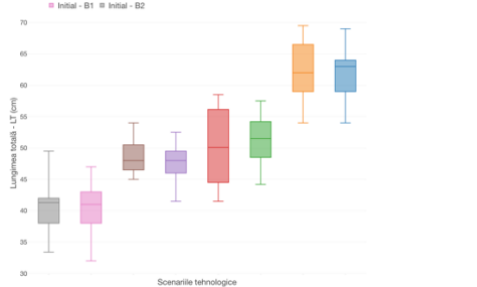


Figura 46. Distribuția lungimii totale (inițial-final) a materialului piscicol, crescut în cadrul celor 4 scenarii tehnologice

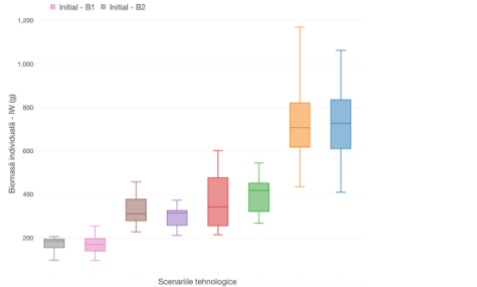


Figura 47. Distribuția biomasei individuale (inițial-final) a materialului piscicol, crescut în cadrul celor 4 scenarii tehnologice

Se înregistrează următoarele formule liniare de regresie IW-LT: IWA1=42,11 LT A1 – 1872 (Rs<sub>q</sub> = 0,85); IWA2=36,71 LT A2 – 1551,2 (Rs<sub>q</sub> = 0,84); IWB1=22,23 LT B1 - 747,35 (Rs<sub>q</sub> = 0,92); IWB2=19,71 LT B2 - 615,62 (Rs<sub>q</sub> = 0,94). Performanțele modulului imagistic de observație a biomasei sturionice sunt evidențiate în cadrul tabelului 10, cu raportare la valorile înregistrate prin metode convenționale.

Tabel 10. Indicatorii procentuali de spor biomasă sturionicolă rezultați din măsurători convenționale vs modul imagistic

| Variante experimentale                                     | A1     | A2     | B1     | B2     |
|------------------------------------------------------------|--------|--------|--------|--------|
| Conventional - Spor procentual creștere Initial -Final (%) | 149,41 | 129,78 | 127,06 | 114,52 |
| Imagistic - Spor procentual creștere Initial -Final (%)    | 128,42 | 131,69 | 113,52 | 98,50  |

Compoziția biochimică obținută din țesutul muscular al materialului sturionicol, consemnată la sfârșitul secvenței tehnologice, relevă diferențe semnificative statistic ( $p<0.05$ ) între A și A2, respectiv B1 și B2, în ceea ce privește concentrația de lipide (Tabel 11). Astfel, se poate concluziona importanța alegerii unei concentrații optime de busuioc aplicate pentru aditivarea furajului în cadrul fiecărei secvențe tehnologice, în condițiile practicării acvaculturii sturionice intensive, fapt ce implică adoptarea unor deziderate exacte în ceea ce privește compoziția biochimică a țesutului muscular dacă sturionii sunt crescuți în scopul comercializării ca produs finit, destinat consumului uman, rezultat în urma procesului tehnologic. De asemenea, din analiza matricei biochimice a țesutului se poate observa specificitatea acestuia, asociată fiecărei secvențe tehnologice în parte – astfel, se observă diferențe semnificative statistic ( $p<0.05$ ) între grupul de variante A1, A2 vs. grupul B1, B2.

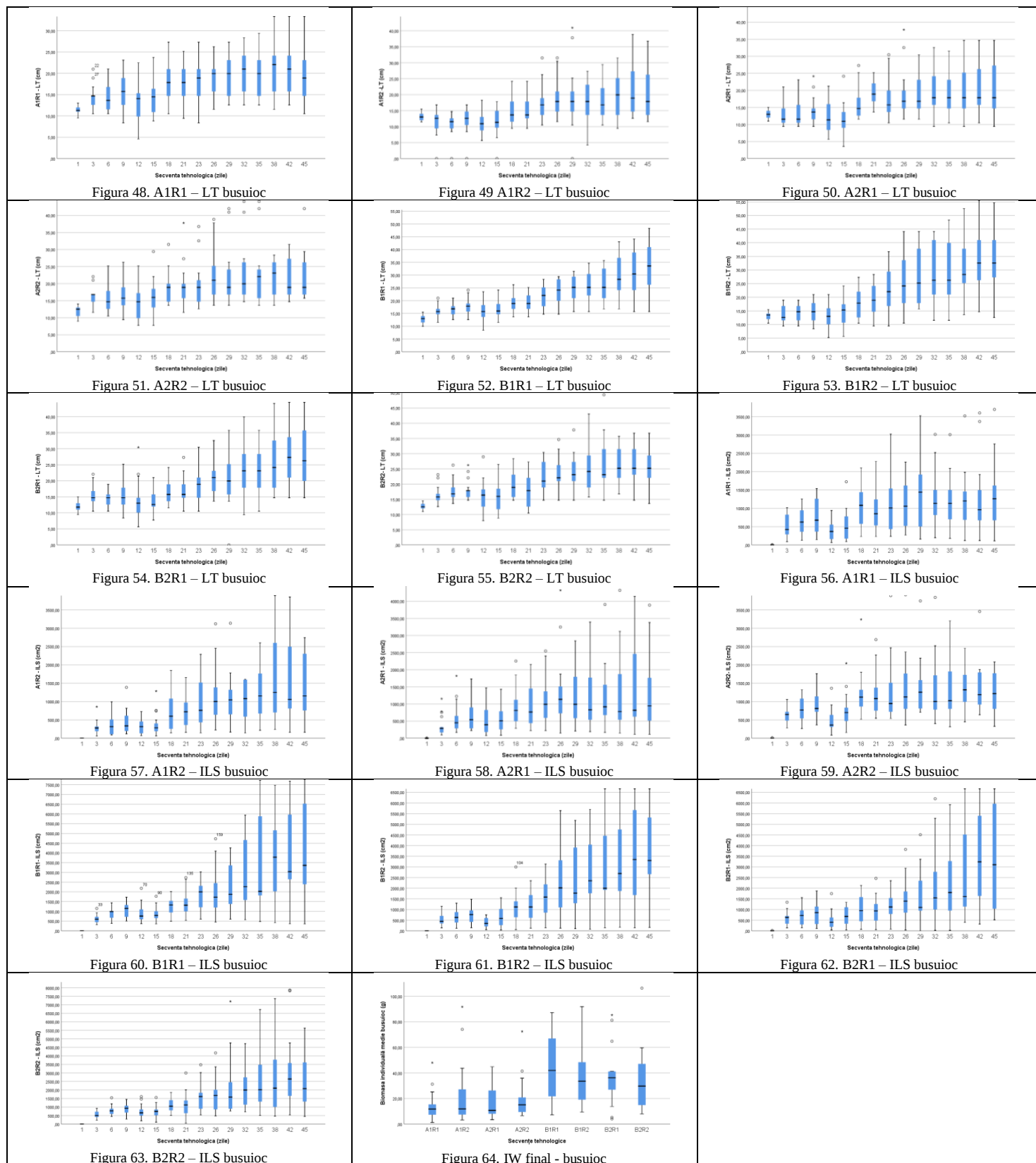
Tabel 11. Compoziția biochimică la nivelul țesutului muscular al materialului sturionicol, înregistrată la sfârșitul secvenței tehnologice

| Elementul compozit                     | VARIANTELE EXPERIMENTALE |            |            |            |
|----------------------------------------|--------------------------|------------|------------|------------|
|                                        | A1                       | A2         | B1         | B2         |
| Apa (%)                                | 76,14                    | 77,54      | 78,46      | 79,11      |
| Proteine (%)                           | 17,17±0,21               | 17,08±0,12 | 15,23±0,24 | 15,06±0,16 |
| Lipide (%)                             | 1,44±0,07                | 1,65±0,03  | 1,18±0,05  | 1,31±0,03  |
| Cenușă (%)                             | 1,33±0,11                | 1,39±0,06  | 1,26±0,09  | 1,29±0,05  |
| Substanță uscată (%)                   | 23,86                    | 22,46      | 21,54      | 20,89      |
| Apă/Proteine (A/P)                     | 4,38                     | 4,54       | 5,14       | 5,25       |
| Substanțe extractive fara azot SEN (%) | 3,92                     | 2,34       | 3,87       | 3,23       |

Modulul imagistic pentru observația dinamicii biomasei de busuioc înregistrează o abatere a ILS, la finalul ciclului de producție, de 11,34% în cazul A1R1, 9,83% în cazul A2R1, 12,76% la A1R2, 15,23% la A2R2, 7,99% la B1R1, 9,35% la B1R2, 6,98% la B2R1 și 10,43% la B2R2. Dinamica reliefată de modulul imagistic, pentru LT și ILS este prezentată în figura 48 – 64.

Astfel, dinamica creșterii în lungime totală a busuiocului este prezentată în cadrul figurilor 48-55. Astfel, se poate observa o dinamică apropiată de o evoluție liniară în cadrul B1R1 și B2R1, în special în a doua jumătate a ciclului de producție, comparativ cu restul variantelor experimentale. Variantele A1R1, A1R2, A2R1 și B2R2 prezintă o stagnare în dezvoltare a busuiocului în cadrul ultimelor 10 zile ale ciclului de producție. Un caz atipic se regăsește în cadrul A2R2 unde biomasa de busuioc prezintă semne de stres manifestate prin curbura plantei, fapt ce explică valorile descendente ale înălțimii, surprinse de modulul imagistic în ultimele 5 zile ale perioadei experimentale (Figura 51). Astfel, pentru biomasa de busuioc din cadrul A1R1 a fost înregistrată o valoare medie a LT la sfârșitul perioadei experimentale de 21,94±6,09cm, inferioară valorii înregistrată în cazul A1R2 (29,32±15,24cm). Acest fapt este confirmat și în cazul A2R1 (22,94±6,86cm), comparativ cu A2R2 (25,74±12,76cm). Astfel, se poate concluziona faptul că parametrii hidraulici superiori, utilizați în cadrul scenariilor tehnologice A1-A2 sunt recomandați a fi aplicați în vederea maximizării creșterii LT la nivelul biomasei de busuioc. Cu toate acestea, în cazul scenariilor tehnologice B1-B2 situația este diametral opusă, parametrii hidraulici inferiori asigurând o potențare mai bună a nutrienților în vederea susținerii creșterii în înălțime a busuiocului (Figura 48-51). Astfel, valorile LT a busuiocului înregistrate în B1R1 și B2R1 sunt superioare celor raportate de modulul imagistic în cazul B1R2 și B2R2 (Figura 52-55). Dinamica creșterii biomasei foliare a busuiocului (Figura 56 – 63) indica o dinamică ascendentă în cadrul B1R1, B1R2, B2R1 (Figura 60-62), fapt ce confirmă atingerea condițiilor optime din punct de vedere tehnologic în cazul acestor 3 scenarii tehnologice. Cu toate acestea, modulul imagistic a sesizat o dinamică relativ stagnantă a ILS (Figura 56-59, 63), fapt ce poate fi asimilat cu unul din primele semne de apariție a situațiilor cauzatoare de stres, ce se manifestă prin încetinirea vitezei de dezvoltare. Cu toate că input-ul de nutrienți este mai ridicat în cazul scenariilor tehnologice A1-A2, comparativ cu B1-B2, stresul poate fi asociat cu acumularea de substanță organică la nivelul substratului GM R, fapt ce inhibă activitatea bacteriilor autotrofe, nitrificatoare, propulsând dezvoltarea bacteriilor heterotrofe. Astfel, valorile medii cele mai ridicate ale ILS sunt asociate B1R2 (5039,74±3078,54 cm<sup>2</sup>), B2R1(5045,26±2988,26 cm<sup>2</sup>) și B1R1 (5138,58±3078,54 cm<sup>2</sup>). Biomasa individuală media a busuiocului (IW) la sfârșitul ciclului de producție a înregistrat valori superioare în cadrul scenariului tehnologic B1-B2 pentru variantele cu parametrii hidraulici de valori reduse HLR = 6 m/zi (R1), comparativ cu R2 (HLR de 10,74 m/zi). Astfel, pentru B1R1 avem asociat un IW mediu al busuiocului de 43,88g, B2R1 (41,53g), în timp ce la B2R2 se consemnează IW = 33,7g, respectiv B1R2 (37,10g). Cu toate acestea, în cazul A1-A2 nu au fost observate diferențe semnificative din punct de vedere statistic în ceea ce privește IW a busuiocului.

Concentrația de elemente (Ca, Mg, Fe și K) la nivelul biomasei foliare a busuiocului confirmă cele constatate în urma analizei performanțelor de creștere. Astfel, concentrația de P din biomasa foliară înregistrează o valoare maximă în cazul variantei B1R1 (60,13±8,91 mg/100gFW), urmat fiind de B2 R1 (58,73±7,07 mg/100gFW), în timp ce valori scăzute sunt înregistrate în cazul A1R1 și A2R1, de 47±6,35 mg/100gFW, respectiv 45±9,11 mg/100gFW. În cazul concentrației de K, valori de 271,73±24.85 mg/100gFW sunt asociate B1R1, în timp ce în cazul A2R1 se raportează cea mai scăzută valoare, de 231,58±44.17 mg/100gFW. Elementele Ca și Mg înregistrează cea mai crescută concentrație la nivelul biomasei foliare a busuiocului crescut în B1R1 (66,13±7,03mg Mg/100gFW, 114±33,16 mg Ca/100gFW). Fierul este un factor limitativ și în cazul prezentului studiu. Cu toate acestea, concentrațiile de Fe din biomasele foliare ale busuiocului s-au situat peste valoarea de 2,78mg/100g FW în cazul tuturor scenariilor tehnologice.



**Evaluarea bunăstării biomasei piscicole:** Datorită faptului că în cadrul unui sistem recirculant de acvacultură, în cazul nostru acvaponic, orice perturbare a condițiilor de mediu coroborate cu alți factori tehnologici ce pot conduce la apariția stresului, a devenit necesară pe lângă evaluarea performanței tehnologice și evaluarea biomasei de cultură din punct de vedere al stării de confort tehnologic. În tabelul 3 sunt prezentate rezultatele parametrilor hematologici și biochimici ai sângelui obținuți în cadrul celei de-a doua secvențe tehnologice. Față de momentul inițial se observă la final o creștere a numărului de eritrocite, hematocritului, a activității lizozimului și o reducere a constantelor eritrocitare, a glucozei și cortizolului.

Tabelul 12. Profilul hematologic și parametri biochimici ai sângelui la începutul și finalul secvenței tehnologice

| Secvența tehnologică II | Scenariu tehnologic | Parametru analizat                                |                  |                    |                    |                    |                  |                  |                        |                  |                  |
|-------------------------|---------------------|---------------------------------------------------|------------------|--------------------|--------------------|--------------------|------------------|------------------|------------------------|------------------|------------------|
|                         |                     | Nr. Eritr. (eritr./ $\mu$ l sange $\times 10^6$ ) | Hematocrit (%)   | Hemoglobina (g/dL) | VEM (fL)           | HEM (pg)           | CHEM (g/dL)      | Glucoza (mg/dL)  | Proteine totale (g/dL) | Lizozim (U/mL)   | Cortisol (ng/dL) |
| Inițial                 | A                   | 0,61 $\pm$ 0,06                                   | 26,14 $\pm$ 1,36 | 7,42 $\pm$ 0,70    | 433,68 $\pm$ 44,85 | 122,81 $\pm$ 13,08 | 28,32 $\pm$ 1,19 | 84,34 $\pm$ 3,65 | 4,69 $\pm$ 0,28        | 9,38 $\pm$ 0,79  | 45,82 $\pm$ 1,51 |
|                         | B                   | 0,60 $\pm$ 0,04                                   | 23,70 $\pm$ 2,01 | 6,77 $\pm$ 0,20    | 393,53 $\pm$ 21,56 | 112,98 $\pm$ 8,54  | 28,87 $\pm$ 3,45 | 89,93 $\pm$ 1,12 | 4,91 $\pm$ 0,16        | 9,74 $\pm$ 0,57  | 47,32 $\pm$ 1,62 |
| Final                   | A1                  | 0,79 $\pm$ 0,02                                   | 29,34 $\pm$ 0,65 | 6,95 $\pm$ 0,42    | 371,38 $\pm$ 2,10  | 87,98 $\pm$ 3,72   | 23,69 $\pm$ 1,08 | 82,17 $\pm$ 2,18 | 4,73 $\pm$ 0,20        | 10,84 $\pm$ 0,15 | 41,40 $\pm$ 1,28 |
|                         | A2                  | 0,77 $\pm$ 0,02                                   | 26,35 $\pm$ 2,06 | 7,43 $\pm$ 0,58    | 356,98 $\pm$ 19,11 | 96,79 $\pm$ 5,66   | 27,22 $\pm$ 2,48 | 84,68 $\pm$ 2,89 | 4,87 $\pm$ 0,19        | 10,13 $\pm$ 0,33 | 43,13 $\pm$ 1,21 |
|                         | B1                  | 0,81 $\pm$ 0,04                                   | 27,38 $\pm$ 1,70 | 7,51 $\pm$ 0,23    | 326,01 $\pm$ 15,49 | 92,93 $\pm$ 5,86   | 28,49 $\pm$ 0,59 | 85,43 $\pm$ 0,47 | 4,93 $\pm$ 0,07        | 10,07 $\pm$ 0,29 | 43,12 $\pm$ 0,93 |
|                         | B2                  | 0,75 $\pm$ 0,11                                   | 22,53 $\pm$ 1,75 | 7,83 $\pm$ 0,53    | 305,54 $\pm$ 21,04 | 106,53 $\pm$ 10,58 | 34,81 $\pm$ 1,37 | 86,44 $\pm$ 0,83 | 5,29 $\pm$ 0,43        | 9,85 $\pm$ 0,52  | 45,31 $\pm$ 0,98 |

Conform tabelului 12 s-a înregistrat o valoare superioară a numărului de eritrocite în scenariul B1, urmat de A1 comparativ cu scenariile A2 și B2, cu valorile inițiale. Hematocritul a înregistrat o creștere cu 12,25%, respectiv cu 15,53% în scenariul A1, respectiv B1 față de momentul inițial. La finalul secvenței tehnologice concentrația de hemoglobină a înregistrat valoarea maximă în scenariul B2, iar concentrația minimă în scenariul A1. În ceea ce privește constantele eritrocitare valorile minime au fost înregistrate în scenariul B2 pentru VEM, scenariul A1 pentru HEM și CHEM, iar valorile maxime în scenariul A1 pentru VEM și în scenariul B2 pentru HEM și CHEM (Tabelul 12). Concentrația minimă de glucoză s-a obținut în scenariul A1 și A2, iar pentru cortizol în scenariile A1, A2 și B1 (Tabelul 12). Referitor la proteinele totale, la finalul secvenței tehnologice concentrația a fost superioară în scenariul B2, comparativ cu scenariul A1 în care s-a obținut valoarea minimă (Tabelul 12). Totodată, s-a observat și o intensificare a activității lizozimului față de momentul inițial în toate cele 4 scenarii tehnologice. Activitatea lizozimului fiind mai mare față de valoarea inițială cu 15,57% în scenariul A1, 8,00% în scenariul A2, cu 3,39% în scenariul B1, respectiv cu 1,13% în scenariul B2 (Tabelul 12). În urma analizei profilului hematologic și a biochimiei sângelui putem spune că cele 4 scenarii au condus la îmbunătățirea stării de confort tehnologic a speciei *A. baerii*, însă într-o mai mare măsură scenariul A1, A2 și B1.

Cercetările recente au arătat faptul că introducerea în concentrații relativ mici a vitaminelor, probioticelor, prebioticelor și mai nou a fitobioticelor, în dieta peștilor poate conduce la asigurarea unor cerințe specifice sau poate influența în mod pozitiv bunăstarea materialului biologic (inclusiv prin reducerea stresului oxidativ) și totodată performanța de creștere (Denev, 2008; , Cristea et al., 2012; Antache et al., 2014; Antache et al., 2013a; Antache et al., 2013b; Maurilio et al., 2011). În tabelele de mai jos sunt prezentate rezultatele pentru parametrii stresului oxidativ dar și conținutul de proteină din fiecare țesut analizat la momentul inițial (Tabelul 13) și la finalul secvenței tehnologice (Tabelul 14).

Tabelul 13. Parametrii stresului oxidativ la începutul și finalul celei de-a doua secvențe tehnologice din țesut muscular (M), ficat (F) și intestin (I)

| Parametru analizat      | A (A1+A2)  |              |             | B (B1+B2)  |              |              |
|-------------------------|------------|--------------|-------------|------------|--------------|--------------|
|                         | M          | F            | I           | M          | F            | I            |
| Proteina (mg/mL)        | 15,68±0,19 | 18,52±1,57   | 20,12±1,54  | 15,2±1,35  | 12,21±1,85   | 7,97±1,1     |
| CAT (U/mg proteina)     | 19,14±2,31 | 41,2±1,18    | 72,53±3,51  | 17,52±1,96 | 31,12±4,05   | 36,15±2,59   |
| SOD (U/mg proteina)     | 0,84±0,27  | 0,98±0,44    | 2,17±0,56   | 0,48±0,36  | 0,49±0,41    | 0,71±0,18    |
| MDA (nmoli/mg proteina) | 51,94±5,12 | 154,22±18,41 | 269,27±41,2 | 86,37±1,18 | 214,22±35,71 | 459,31±51,87 |
| TAC (mM Trolox)         | 15,64±1,57 | 12,34±0,78   | 17,95±2,46  | 14,07±0,64 | 11,52±0,63   | 17,02±1,01   |

Conform rezultatelor se poate observa o tendință de creștere a conținutului de proteină de la nivelul fiecărui țesut (mușchi, ficat, intestin) din momentul inițial și până la finalul secvenței tehnologice. Valoarea maximă de la nivelul mușchiului și ficatului s-a înregistrat în scenariul A1, iar cea minimă în scenariul B2, iar la nivelul intestinului cea maximă în scenariul A1, iar cea minimă în scenariul B1.

Tabelul 14. Parametrii stresului oxidativ la începutul și finalul celei de-a doua secvențe tehnologice din țesut muscular (M), ficat (F) și intestin (I)

| Parametru analizat      | A1         |             |              | A2         |             |              | B1          |             |              | B2          |             |              |
|-------------------------|------------|-------------|--------------|------------|-------------|--------------|-------------|-------------|--------------|-------------|-------------|--------------|
|                         | M          | F           | I            | M          | F           | I            | M           | F           | I            | M           | F           | I            |
| Proteina (mg/mL)        | 16,98±1,15 | 21,67±2,97  | 24,96±0,98   | 16,76±2,76 | 18,47±2,13  | 19,61±3,74   | 14,84±1,32  | 14,94±3,22  | 9,02±0,71    | 13,83±2,31  | 12,05±0,62  | 9,46±2,48    |
| CAT (U/mg proteina)     | 22,54±5,47 | 53,48±2,96  | 99,77±4,47   | 20,7±5,56  | 42,93±6,03  | 80,86±21,23  | 20,9±1,27   | 40,76±2,53  | 57,37±10,38  | 18,1±7,56   | 35,75±6,23  | 44,95±2,55   |
| SOD (U/mg proteina)     | 1,26±0,38  | 1,73±0,63   | 2,92±0,7     | 1,07±0,77  | 1,3±0,48    | 2,35±0,02    | 0,51±0,40   | 0,63±0,5    | 1,05±0,29    | 0,69±0,49   | 0,60±0,43   | 0,86±0,18    |
| MDA (nmoli/mg proteina) | 44,03±6,96 | 135,39±6,00 | 234,66±29,47 | 55,73±0,32 | 139,7±26,12 | 257,38±51,74 | 73,72±17,23 | 167,01±8,78 | 312,01±18,04 | 88,97±14,75 | 205,4±54,26 | 391,08±42,81 |
| TAC (mM Trolox)         | 16,23±1,02 | 14,02±0,88  | 21,35±3,41   | 15,87±0,99 | 13,87±0,67  | 20,78±1,84   | 15,69±1,12  | 13,79±0,38  | 20,02±1,4    | 14,99±0,89  | 13,41±0,45  | 19,35±0,91   |

Catalaza, superoxid dismutaza și capacitatea antioxidantă totală au înregistrat o activitate superioară la nivelul țesutului muscular, ficatului și intestinului în scenariul A1, iar o activitate mai redusă în ficat și intestin în scenariul B2, iar în țesutul muscular în scenariul B1. Aceste rezultate fiind invers proporționale cu indicii de peroxidare lipidică (MDA) ceea ce înseamnă că o reducere a MDA-ului și o intensificare a CAT, SOD și TAC conduce la reducerea stresului oxidativ prin diminuarea radicalilor liberi din organism.

Dinamica concentrației de amoniu ( $\text{NH}_4^+$ ) de la nivelul apei tehnologice, pe parcursul secvenței monitorizate, a consemnat valoarea medie maximă în variantele A1 (0,241 mg/L) și A2 (0,213 mg/L), urmată de B1 (0,187 mg/L) și B2 (0,179 mg/L) (Figura 1, Anexa 9). De asemenea, în urma monitorizării acestui parametru s-au evidențiat valori mai ridicate în sursa de alimentare a unităților acvaponice (efluentul de acvacultură A1, A2, B1, respectiv B2) comparativ cu evacuarea unităților acvaponice (A1R1, A1R2, A2R1, A2R2, B1R1, B1R2, B2R1, B2R2), fapt ce reliefează capacitatea de epurare acestora (Figura 1, Anexa 9). În ceea ce privește dinamica concentrației de azotiți ( $\text{NO}_2^-$ ) de la nivelul apei tehnologice, pe parcursul secvenței monitorizate, aceasta a consemnat valoarea medie maximă în variantele A1 (0,04 mg/L) și A2 (0,029 mg/L), urmată de B1 (0,028 mg/L) și B2 (0,024 mg/L). De asemenea, în urma monitorizării acestui parametru s-au evidențiat valori mai ridicate în sursa de alimentare a unităților acvaponice (efluentul de acvacultură A1, A2, B1, respectiv B2) comparativ cu evacuarea unităților acvaponice (A1R1, A1R2, A2R1, A2R2, B1R1, B1R2, B2R1, B2R2), fapt ce reliefează capacitatea de epurare acestora (Figura 2, Anexa 9). Dinamica concentrației de azotați ( $\text{NO}_3^-$ ) de la nivelul apei tehnologice, pe parcursul secvenței monitorizate, a înregistrat valoarea medie maximă în variantele A1 (49,68 mg/L) și A2 (50,77 mg/L), urmată de B1 (43,38 mg/L) și B2 (41,31 mg/L). De asemenea, în urma monitorizării acestui parametru s-au evidențiat valori mai ridicate în sursa de alimentare a unităților acvaponice (efluentul de acvacultură A1, A2, B1, respectiv B2) comparativ cu evacuarea unităților acvaponice (A1R1, A1R2, A2R1, A2R2, B1R1, B1R2, B2R1, B2R2), fapt ce reliefează capacitatea de epurare acestora (Figura 3, Anexa 9). În cazul dinamicii concentrației de ortofosfați ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) de la nivelul apei tehnologice, pe parcursul secvenței monitorizate, s-a înregistrat valoarea medie maximă în variantele A2 (6,20 mg/L) și A1 (5,22 mg/L), urmată de B1 (4,88 mg/L) și B2 (4,13 mg/L). De asemenea, în urma monitorizării acestui parametru s-au evidențiat valori mai ridicate în sursa de alimentare a unităților acvaponice (efluentul de acvacultură A1, A2, B1, respectiv B2) comparativ cu evacuarea unităților acvaponice (A1R1, A1R2, A2R1, A2R2, B1R1, B1R2, B2R1, B2R2), fapt ce reliefează capacitatea de epurare acestora (Figura 4, Anexa 9). Dinamica potențialului de hidrogen de la nivelul apei tehnologice, pe parcursul secvenței monitorizate, a înregistrat valoarea medie maximă în variantele B2 (7,51 unități pH) și B1 (7,36 unități pH), urmată de A1 (6,74 unități pH) și A2 (6,45 unități pH). De asemenea, în urma monitorizării acestui parametru s-au evidențiat valori mai ridicate în sursa de alimentare a unităților acvaponice (efluentul de acvacultură A1, A2, B1, respectiv B2) comparativ cu evacuarea unităților acvaponice (A1R1, A1R2, A2R1, A2R2, B1R1, B1R2, B2R1, B2R2), fapt ce reliefează capacitatea de epurare acestora (Figura 5, Anexa 9). Dinamica concentrației de TDS de la nivelul apei tehnologice, pe parcursul secvenței monitorizate, a înregistrat valoarea medie maximă în variantele A2 (1724,5 mg/L) și A1 (1669,38 mg/L), urmată de B2 (1546,56 mg/L) și A1 (1469,06 mg/L). De asemenea, în urma monitorizării acestui parametru s-au evidențiat valori mai ridicate în sursa de alimentare a unităților acvaponice (efluentul de acvacultură A1, A2, B1, respectiv B2) comparativ cu evacuarea unităților acvaponice (A1R1, A1R2, A2R1, A2R2, B1R1, B1R2, B2R1, B2R2), fapt ce reliefează capacitatea de epurare acestora (Figura 6, Anexa 9). Dinamica conductivității manifestată la nivelul apei tehnologice, pe parcursul secvenței monitorizate, a înregistrat valoarea medie maximă în variantele A1 (1686,56  $\mu\text{S/cm}$ ) și A2 (1684,31  $\mu\text{S/cm}$ ), urmată de B1 (1502  $\mu\text{S/cm}$ ) și B2 (1466  $\mu\text{S/cm}$ ). De asemenea, în urma monitorizării acestui parametru s-au evidențiat valori mai ridicate în sursa de alimentare a unităților acvaponice (efluentul de acvacultură A1, A2, B1, respectiv B2) comparativ cu evacuarea unităților acvaponice (A1R1, A1R2, A2R1, A2R2, B1R1, B1R2, B2R1, B2R2), fapt ce reliefează capacitatea de epurare acestora (Figura 7, Anexa 9). În ceea ce privește rata de retenție de  $\text{NH}_4^+$ , s-a înregistrat o valoare medie de 25% în cazul scenariului tehnologic A1R1, în cazul scenariului A1R2 s-a consemnat o rată de 41%, în cazul A2R1 o rată de 23%, în cazul A2R2 o rată de 34%, în cazul B1R1 o rată de 39%, în cazul B1R2 o rată de 58%, în cazul B2R1, respectiv B2R2 o rată de 41% (Figura 8, Anexa 9). În urma calculării ratei de retenție de  $\text{NO}_2^-$ , se constată o valoare medie de 25% în cazul scenariului tehnologic A1R1, în timp ce în cazul scenariului A1R2 s-a consemnat o rată de 41%, în cazul scenariului A2R1 o rată de 25%, în cazul scenariului A2R2 o rată de 21%, în cazul scenariului B1R1 o rată de 22%, în cazul scenariului B1R2 o rată de 15%, în cazul scenariului B2R1 o rată de 36% iar în cazul scenariului B2R2 o rată de 37% (Figura 9, Anexa 9). În urma calculării ratei de retenție de  $\text{NO}_3^-$ , se constată o valoare medie de 14% în cazul scenariului tehnologic A1R1, în timp ce în cazul scenariului A1R2 s-a consemnat o rată de 21%, în cazul scenariului A2R1 o rată de 15%, în cazul scenariului A2R2 o rată de 23%, în cazul scenariului B1R1 o rată de

10%, în cazul scenariului B1R2 o rată de 17%, în cazul scenariului B2R1 o rată de 31% iar în cazul scenariului B2R2 o rată de 30% (Figura 10, Anexa 9).

*Profitabilitatea economică în condiții industriale a utilizării sistemului multi-trofic integrat, concomitent cu aplicarea tehnologia de administrare a fitobioticelelor în furajul destinat biomasei sturionicole, prin intermediul analizelor cost – beneficiu:*

Tabel 15. Cost investiție

| Nr. crt. | Componenta                                             | Cost investitie per m <sup>2</sup> (euro) |
|----------|--------------------------------------------------------|-------------------------------------------|
| 1        | Camera Intel Real Sense plante                         | 141,67                                    |
| 2        | Camera Intel Real Sense pești                          | 98,34                                     |
| 3        | Camera Rpi plante                                      | 21,74                                     |
| 4        | Sistem portabil Rpi                                    | 8,1                                       |
| 5        | Microcontroler Rpi                                     | 12,3                                      |
| 6        | Prize timer                                            | 5,8                                       |
| 7        | Sistem prindere modul imagistic biomasa piscicola      | 12,3                                      |
| 8        | Sistem prindere modul imagistic biomasa sturionicola   | 17,22                                     |
| 9        | Server, router și sistem de comunicație                | 11,67                                     |
| 10       | Transport și prelucrare substrat GM R                  | 0,6                                       |
| 11       | Module acvaponice                                      | 31,7                                      |
| 12       | Sistem alimentare/evacuare și pompe de recirculare     | 21,23                                     |
| 13       | Sistem iluminat                                        | 23,67                                     |
| 14       | Cost forta munca                                       | 4,7                                       |
| 15       | Cost infrastructura necesara prelucrare furaj aditivat | 13                                        |
|          | TOTAL                                                  | 424,04                                    |

Tabel 16. Cost operational, venituri și indicatori economici

| 1. Componenta cost operational | Cost operational lunar (euro) | Cost operational anual (euro) |
|--------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Cost electricitate             | 16,23                         | 194,76                        |
| Cost aditivare furaj           | 0,72                          | 8,64                          |
| Cost personal                  | 0,81                          | 9,72                          |
| Cost rasaduri                  | 0,34                          | 4,08                          |
| TOTAL                          | 18,1                          | 217,2                         |
| 2. Venituri                    | Lunar                         | Annual                        |
| Plante                         | 23,12                         | 277,44                        |
| Pesti                          | 1,2                           | 14,4                          |
| TOTAL                          | 24,32                         | 291,84                        |
| 3. Indicator economic          | Annual                        |                               |
| Profit brut anual per m2       | 74,64                         |                               |
| Profit net anual per m2        | 62,70                         |                               |
| Recuperare investitie (ani)    | 6,76                          |                               |
| Rentabilitate                  | 0,21                          |                               |
| Rata profit (%)                | 14,79                         |                               |

4. Raport de descriere a parametrilor de extracția uleiului din biomasa de busuioc obținută în regim acvaponic și de caracterizarea chimică a acestuia în vederea identificării compușilor bioactivi (realizare finală).
5. Raport de evaluare in-vitro a efectului antimicrobian al compușilor biologic activi ai extractului obținut din biomasa de busuioc crescută în regim acvaponic și de descriere a antioxidanților enzimatici și nonenzimatici (realizare finală).

4.1 Extracția selectivă a componentelor bioactive din biomasa de busuioc.

Obținerea extractelor vegetale. Produsul vegetal uscat și pulverizat (1,5 – 2 g rădăcină/parte aeriană) a fost extras cu 100 mL metanol timp de 30 min., la temperatura camerei, sub agitare continuă (agitator magnetic FALC F-30 ST). Extractele metanolice au fost filtrate și apoi concentrate la sec la presiune redusă și 40 °C (Rotavapor Büchi R-210, reglator de presiune Büchi V-850, pompa de vid Büchi V-700, baie termostatăată Büchi B-491).

Pentru efectuarea analizelor au fost analizate un număr de 26 probe de *Ocimum basilicum* L. (busuioc) crescute în sistem acvaponic: 1 - Plantă RA – rădăcină; 2 - Plantă HA – rădăcină; 3 - Plantă RB – rădăcină; 4 - Plantă HB – rădăcină; 5 - Plantă A1R1 – rădăcină; 6 - Plantă A1R2 – rădăcină; 7 - Plantă A2R1 – rădăcină; 8 - Plantă A2R2 – rădăcină; 9 - Plantă B1R1 – rădăcină; 10 - Plantă B1R2 – rădăcină; 11 - Plantă B2R1 – rădăcină; 12 - Plantă B2R2 – rădăcină; 13 - Plantă comerț crescută pe sol – rădăcină; 14 - Plantă RA – tulpină; 15 - Plantă HA – tulpină; 16 - Plantă RB – tulpină; 17 - Plantă HB – tulpină; 18 - Plantă A1R1 – tulpină; 19 - Plantă A1R2 – tulpină; 20 - Plantă A2R1 – tulpină; 21 - Plantă A2R2 – tulpină; 22 - Plantă B1R1 – tulpină; 23 - Plantă B1R2 – tulpină; 24 - Plantă B2R1 – tulpină; 25 - Plantă B2R2 – tulpină; 26 - Plantă comerț crescută pe sol – tulpină.

*Izolarea uleiurilor volatile.* Uleiurile volatile au fost izolate din partea aeriană provenită de la planta care a înregistrat cel mai mare conținut în polifenoli totali, respectiv proba 20 (planta din A2R1). Uleiurile volatile au fost izolate prin antrenare cu vapori de apă folosind un aparat de tip NeoClevenger (Carl Roth, Germania). Materialul vegetal uscat și mărunțit (100 g) a fost supus hidrodistilării cu 1000 mL apă timp de 4 ore (Lungu Apetrei et al., 2013). Ambele uleiurile volatile izolate, de culoare gălbuie, au prezentat miros caracteristic (busuioc).

*Analiza chimică calitativă și cantitativă a uleiurilor volatile.* Compoziția chimică a uleiurilor volatile a fost analizată prin gaz-cromatografie cu detecție prin ionizare în flacără (GC-FID) și spectrometrie de masă (GC-MS). Analiza GC-MS a uleiurilor volatile s-a realizat folosind un gaz-cromatograf Agilent 7890A cuplat cu un spectrometru de masă Agilent 5975C și o coloană capilară Teknokro TR-520232 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm). Analiza GC-FID a uleiurilor volatile s-a realizat folosind un gaz-cromatograf Agilent 6890 echipat cu un detector prin ionizare în flacără și același tip de coloană. Programul de temperatură comun în ambele analize a fost: 4 °C/min. de la 60 la 220 °C, 20 °C/min. de la 220 la 320 °C. Volumul de injecție a fost de 0,2 μL ulei volatil, iar debitul fază mobile (He), de 0,5 mL/min. Indicii de retenție au fost stabiliți prin analiza în aceleași condiții a unei soluții standard de n-alcani (C8-C20). Compușii au fost identificați prin compararea spectrelor de masă obținute cu cele din biblioteca Wiley și a indicilor de retenție corespunzători cu cei menționați în literatură (Lungu Apetrei et al., 2013).

4.2 Determinarea cantitativa a grupelor majore de principii active din fiecare extract./ 5.3. Analiza antioxidanților enzimatici (superoxidismutaza, catalaza, peroxidaza) prezenți în extract, cât și a antioxidanților non-enzimatici (polifenoli totali, flavonoide, capacitatea antioxidantă).

Analiza antioxidanților enzimatici (superoxidismutaza, catalaza, peroxidaza) prezenți în extract.

*Extracția de enzime și antioxidanți neenzimatici.* Plantele de busuioc (partea aeriană) au fost mojarate și antrenate cu tampon fosfat disodic (pH-7) iar omogenatul obținut a fost folosit pentru determinarea activității superoxid dismutazei (SOD), catalazei (CAT) și glutatión peroxidazei (GPx). Pentru polifenolii totali, capacitatea antioxidantă și flavonoide probele de busuioc au fost uscate, iar extractia s-a realizat cu metanol 80%.

*Activitatea superoxid dismutazei (SOD)* a fost determinată conform metodei Winterbourn (1975) cu modificări minore, pe baza capacității enzimatică de a inhiba reducerea Tetrazolium Nitro Blue (NBT) de către radicalii superoxid generați în amestecul de reacție prin fotoreducerea riboflavinei. Toate variantele au fost expuse la iluminare pentru exact 5 minute folosind lampă de neon de 20W la o distanță de 10 cm. Gradul de inhibiție produs de enzimă, în condiții standard, este estimat prin determinarea extincțiilor probei și a matorului la 560 nm. O unitate de activitate SOD a fost definită ca cantitatea de enzimă necesară pentru a inhiba 50% reducerea fotochimică a NBT.

*Activitatea catalazei (CAT)* a fost evaluată prin procedeul Sinha (1972) pe baza determinării acidului cromatic obținut prin reducerea K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, în mediu acid, în prezența H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nedescompusă, la λ=570nm.

*Activitatea peroxidazei (PER)* a fost măsurată utilizând kitul de testare a activității celulare GPx CGP-1 (Sigma Chemicals). Această metodă indirectă se bazează pe oxidarea glutatiónului (GSH) în glutatión oxidat (GSSG), care este catalizat de GPx și cuplat cu reciclarea GSSG la GSH de către glutatión reductază (GR) în prezența NADPH. Scăderea NADPH la 340 nm în timpul oxidării la NADP<sup>+</sup> este un indicator al activității GPx.

*Analiza conținutului de proteine solubile.* Conținutul de proteine solubile a fost evaluat utilizând tampon Tris-HCl 50 mM, pH 7, conform metodei Bradford folosind albumină serică bovină ca standard (Bradford, 1976). Analiza constă în legarea Coomassie Brilliant Blue G-250 la radicalii de aminoacizi aromatici și măsurarea absorbției la λ=595nm. Rezultatul a fost exprimat în mg proteină/g greutate proaspătă.

*Analiza pigmentilor clorofilieni (Chl "a", Chl "b") și a carotenoizilor.* Extracția pigmentilor clorofilieni și a carotenoizilor din busuioc s-a realizat cu ajutorul metanolului, iar citirile s-au determinat spectrofotometric (662nm, 645nm pentru clorofilă și la 470nm pentru carotenoizi) (Velichkova și Sirakov, 2018).

*Determinarea cantitativă a polifenolilor totali* din extractele metanolice s-a realizat prin metoda Folin-Ciocalteu (Wangenstein et al., 2004; Singleton et al., 1999). Extractul vegetal (20 μL, 20 mg/mL în DMSO) a fost amestecat cu 3,16 mL apă ultrapură și 0,2 mL reactiv Folin-Ciocalteu (Merck, Darmstadt, Germania). După 5 min. s-au adăugat 0,6 mL soluție de carbonat de sodiu 20%. După 2 ore repaus, a fost măsurată absorbanta amestecului de reacție la 765 nm (spectrofotometru SPECORD 210 PLUS, Analytik Jena, Germania). În paralel, s-a realizat o curbă etalon din soluții de concentrații diferite de acid galic (1000 – 31,25 μg/mL). Conținutul în polifenoli totali al extractelor vegetale s-a exprimat în echivalenți de acid galic (mg acid galic/g extract). Determinările au fost efectuate în triplicat. Rezultatele au fost exprimate ca media a trei determinări ± deviația standard.

**Analiza conținutului de flavonoide.** Conținutul de flavonoide a fost măsurat prin metoda spectrofotometrică DEWANTO (2002). Soluției de culoare roz rezultată a fost citită la 510 nm față de blanc. Conținutul de flavonoide a fost exprimat ca mg echivalent catechină (mg CE/g) ( $R^2 = 0,98$ ). Au fost efectuate trei citiri pentru fiecare probă și rezultatul mediat.

**Studiul acțiunii antioxidante.** Acțiunea antioxidantă a extractelor vegetale a fost evaluată prin determinarea capacității de inactivare a radicalului liber 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germania) prin reducerea acestuia la difenilpicrilhidrazilină, reacție însoțită de un viraj de culoare de la violet la galben (Wangenstein et al., 2004; Molyneux, 2004). În acest scop, extractul vegetal (50  $\mu$ L, 20 mg/mL în DMSO) a fost amestecat cu 2,95 mL soluție metanolică DPPH ( $A_{517\text{ nm}} = 1,00 \pm 0,05$ ). Absorbanța amestecului de reacție la 517 nm a fost determinată după 5 min. Capacitatea de inactivare a radicalului liber DPPH (%) a fost calculată după formula:  $(A_i - A_f) / A_i \times 100$ , unde  $A_i$  este absorbanța soluției de DPPH înainte de adăugarea probei (extract vegetal) și  $A_f$  este absorbanța amestecului de reacție după 5 min.. Determinările au fost efectuate în triplicat.

Analize statistice. Datele au fost prezentate ca medii și erori standard (SE). Toate probele au fost analizate în trei repetiții; media și erorile standard SE au fost calculate folosind Excel pachete software.

Generarea de specii reactive de oxigen (ROS) poate fi indusă de diverse tipuri de stres abiotic, precum cel salin, secetă, căldură sau stresul metalelor grele. ROS este un termen colectiv folosit atât pentru radicalii liberi, cum ar fi radical hidroxil ( $\bullet\text{OH}$ ), anion superoxid ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) și radicali alcoxi ( $\text{RO}\bullet$ ), precum și pentru forme (moleculare) precum peroxidul de hidrogen ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) și oxigenul singlet ( $^1\text{O}_2$ ) (Vanhoudt et al., 2011; Ozgur et al., 2013). Pentru a face față diferitelor tipuri de stres de mediu, plantele au dezvoltat diverse strategii. Astfel, ca răspuns la supraproducția de ROS, celulele țesuturilor vegetale activează mecanisme enzimatice endogene de apărare împotriva stresului oxidativ (Mittler et al., 2004). Pentru a menține echilibrul nivelurilor de ROS, plantele sintetizează diverși antioxidanți enzimatici și neenzimatici care echilibrează dar nu elimină ROS, deoarece eradicarea completă a ROS înseamnă pierderea unui al doilea mesager important în cascade de semnalizare intracelulară (Afzal et al., 2014). Excesul de ROS poate duce la disfuncții metabolice ireparabile și chiar moartea celulară prin atacul direct asupra pigmentilor fotosintetici, lipidelor membranare, proteinelor și acizi nucleici (Bailey-Serres și Mittler, 2006).

• Dintre enzimele antioxidante care intervin în mecanismul stresului oxidativ pentru îndepărtarea radicalilor liberi, **superoxid dismutaza (SOD) (EC 1,15,1,1)** este prima enzimă care are un rol important în dismutarea radicalilor superoxid în apă oxigenată. Rezultatele obținute în acest experiment au evidențiat că activitatea SOD a variat între 0,45 U/mg proteină și 1,15 U/mg proteină, în cadrul primei secvențe tehnologice (Tabelul 17). Dintre scenariile tehnologice din cadrul celei de-a doua secvențe tehnologice concentrațiile de SOD s-au înregistrat în intervalul 0,88 – 3,04 U/mg proteină. Cele mai bune valori obținându-se în scenariul B (respectiv B1R1 urmat de B2R1, B1R2, B2R2 și apoi de A1R2) față de scenariul A (Tabelul 18).

Tabel 17. Activitatea catalazei (CAT), superoxid dismutazei (SOD), peroxidazei (PER) și conținutul de malondialdehidă (MDA) și proteină solubilă în plante de busuioc provenite din acvaponie în cazul primei secvențe tehnologice (A-B)

| Parametru analizat      | RA               | HA                | RB                | HB                |
|-------------------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| CAT (U/mg proteină)     | 7,76 $\pm$ 0,32  | 7,55 $\pm$ 2,43   | 3,32 $\pm$ 2,38   | 3,08 $\pm$ 3,98   |
| SOD (U/mg proteină)     | 0,86 $\pm$ 0,41  | 0,61 $\pm$ 0,02   | 0,50 $\pm$ 0,069  | 0,49 $\pm$ 0,073  |
| PER (U/mg proteină)     | 0,19 $\pm$ 0,08  | 0,16 $\pm$ 0,07   | 0,13 $\pm$ 0,13   | 0,0912 $\pm$ 0,07 |
| MDA (nmoli/mg proteină) | 67,33 $\pm$ 3,91 | 68,77 $\pm$ 27,82 | 94,52 $\pm$ 33,46 | 98,39 $\pm$ 5,84  |
| Proteina (mg/mL)        | 2,60 $\pm$ 0,63  | 2,39 $\pm$ 0,43   | 2,11 $\pm$ 0,16   | 2,22 $\pm$ 0,61   |

Tabel 18. Activitatea catalazei (CAT), superoxid dismutazei (SOD), peroxidazei (PER) și conținutul de malondialdehidă (MDA) și proteină solubilă în plante de busuioc provenite din acvaponie în cazul celei de-a doua secvențe tehnologice (A1-A2-B1-B2)

| Parametru analizat      | A1R1              | A2R1             | A1R2             | A2R2             | B1R1             | B1R2             | B2R1             | B2R2             | Busuioc comerț   |
|-------------------------|-------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| CAT (U/mg proteină)     | 9,27 $\pm$ 1,03   | 7,82 $\pm$ 2,39  | 13,81 $\pm$ 5,12 | 13,64 $\pm$ 1,42 | 25,41 $\pm$ 4,74 | 14,67 $\pm$ 2,63 | 16,47 $\pm$ 6,08 | 14,31 $\pm$ 2,32 | 12,74 $\pm$ 1,72 |
| SOD (U/mg proteină)     | 1,16 $\pm$ 1,1    | 1,14 $\pm$ 0,36  | 1,42 $\pm$ 0,34  | 1,35 $\pm$ 0,97  | 2,21 $\pm$ 1,18  | 1,95 $\pm$ 0,46  | 1,95 $\pm$ 0,46  | 1,49 $\pm$ 0,53  | 1,32 $\pm$ 0,47  |
| PER (U/mg proteină)     | 0,25 $\pm$ 0,05   | 0,25 $\pm$ 0,01  | 0,30 $\pm$ 0,03  | 0,27 $\pm$ 0,05  | 0,51 $\pm$ 0,12  | 0,36 $\pm$ 0,1   | 0,43 $\pm$ 0,01  | 0,33 $\pm$ 0,03  | 0,05 $\pm$ 0,01  |
| MDA (nmoli/mg proteină) | 65,67 $\pm$ 12,79 | 65,35 $\pm$ 1,63 | 59,79 $\pm$ 0,06 | 62,62 $\pm$ 0,09 | 42,50 $\pm$ 1,89 | 46,25 $\pm$ 5,46 | 41,31 $\pm$ 4,86 | 47,65 $\pm$ 6,45 | 48,67 $\pm$ 2,52 |
| Proteina (mg/mL)        | 2,75 $\pm$ 0,05   | 2,63 $\pm$ 0,49  | 3,56 $\pm$ 0,02  | 3,38 $\pm$ 0,13  | 4,95 $\pm$ 0,37  | 3,64 $\pm$ 0,06  | 4,31 $\pm$ 0,46  | 3,60 $\pm$ 0,55  | 3,52 $\pm$ 0,01  |

• **Catalaza (CAT) (EC 1,11,1,6),** enzimă implicată în îndepărtarea speciilor reactive de oxigen (ROS), convertește  $\text{H}_2\text{O}_2$  (care este toxic), care rezultă din reacția catalizată de SOD, în  $\text{H}_2\text{O}$  și  $\text{O}_2$  în peroxizomi. Activitatea CAT poate fi modificată semnificativ cu participarea moleculelor de semnalizare,  $\text{H}_2\text{O}_2$  nu este doar o moleculă de semnalizare, ci și singurul substrat pentru catalază. În același timp, efectul său asupra activității catalazei la plante este dual deoarece, în funcție de concentrație poate stimula sau inhiba activitatea catalazei. În prima secvență tehnologică, nivelul activității catalazei în părțile aeriene de busuioc a variat între 0,27 și 9,27 U/mg proteină (Tabelul 18). În cea de-a doua secvență tehnologică, nivelul activității catalazei în părțile aeriene de busuioc a variat între 6,13 și 28,76 U/mg proteină. Concentrațiile cele mai bune s-au înregistrat în scenariul tehnologic notat cu B1, respectiv B2 (B1R1>B2R1>B1R2>B2R2) (Tabelul 18). În cazul plantei crescute pe sol, din comerț, activitatea catalazei a înregistrat o valoare mai mică față de cea înregistrată în scenariile tehnologice B1 și B2 (Tabelul 18).

• **Peroxidaza (EC 1,11,1,9)** este implicată în oxidarea multor substraturi, în prezența  $\text{H}_2\text{O}_2$  cu producerea de  $\text{H}_2\text{O}:\text{AH}_2 + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{A} + 2\text{H}_2\text{O}$ . Această enzimă este stimulată de acumularea de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , fiind capabilă de a îndepărta acest compus toxic. În comparație cu CAT, peroxidaza posedă o afinitate crescută față de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , dar are o rată scăzută de procesare.

Activitatea peroxidazei a fost extrem variată în cadrul scenariilor tehnologice, valoarea minimă fiind obținută în scenariul tehnologic HB (0,0912 $\pm$ 0,07 U/mg proteină) (Tabelul 17) din prima secvență tehnologică, iar cea mai mare intensitate a activității peroxidazei s-a înregistrat în cazul scenariilor B1R1 (0,51 $\pm$ 0,12 U/mg proteină) și B2R1 (U/mg proteină) din cea de-a doua secvență tehnologică (Tabelul 18).

• **Malondialdehida.** Peroxidarea lipidelor indusă de radicalii liberi este de asemenea importantă în deteriorarea membranelor celulare. Nivelul peroxidării lipidelor indusă de ROS, măsurat prin conținutul în MDA, a fost considerat un indicator al deteriorării membranelor la nivel celular induse de diferite tipuri de stres. Conținutul scăzut de MDA în plantele de busuioc oferă dovezi ale deteriorării mai scăzute a membranei celulare cauzate de stres. Conținutul de MDA în cazul primei secvențe tehnologice a variat între 49,10 și 118,18 nmoli/mg proteină, stresul asupra plantelor de busuioc fiind mai mic în cazul scenariului tehnologic RA (67,33 $\pm$ 3,91 nmoli/mg proteină) (Tabelul 17). În cazul celei de-a doua secvențe tehnologice (Tabelul 18), conținutul de MDA a variat în cadrul scenariilor tehnologice între 37,09 și 102,52 nmoli/mg proteină. Cele mai mici concentrații s-au înregistrat în cazul scenariilor tehnologice B2R1 și B1R1, iar cele mai mari concentrații s-au obținut în cazul A1R1 și A2R1 (Tabelul 18). Conținutul de MDA în busuiocul crescut pe sol din comerț este asemănător celui obținut în cadrul scenariului tehnologic B2R2 (Tabelul 18). Însă, valoarea minimă, respectiv maximă a conținutului de MDA înregistrată în cadrul scenariului B2R2 a fost 43,09 nmoli/mg proteină, respectiv 52,22 nmoli/mg proteină, iar în cazul plantei din comerț a fost 46,89 nmoli/mg proteină, respectiv 50,45 nmoli/mg proteină.

• Conținutul de **proteine solubile** la variantele de busuioc analizate a prezentat concentrația minimă în scenariul tehnologic RB (2,11 $\pm$ 0,16 mg/mL) din prima secvență tehnologică (Tabelul 17), și în scenariul A2R1 (2,63 $\pm$ 0,49 mg/mL) din cea de-a doua secvență (Tabelul 2). În prima secvență tehnologică valorile s-au încadrat în ecartul 1,80 – 3,04 mg/mL, iar în cea de-a doua secvență în ecartul 2,72 – 4,95 mg/L. În cazul busuiocului din comerț, conținutul în proteine s-a încadrat în intervalul 3,51 – 3,53 mg/mL cu o medie de 3,52 $\pm$ 0,01 (Tabelul 18). Rezultatul obținut în cazul busuiocului din comerț fiind apropiat de cel obținut în scenariul tehnologic A1R2 (Tabelul 18).

• **Clorofila "a".** Din rezultatele obținute se observă faptul că un conținut mai mare de clorofilă "a" s-a înregistrat în cadrul celei de-a doua secvențe tehnologice în scenariile tehnologice B1R1, B1R2, B2R1 și B2R2 (Tabelul 20), iar în prima secvență tehnologică valorile mai mari s-au înregistrat în scenariile RA și HA (Tabelul 19). În ceea ce privește busuiocul din comerț (0,62 $\pm$ 0,17 g/L) acesta a avut un conținut de clorofilă "a" asemănător celui obținut în scenariul A2R2 (0,61 $\pm$ 0,07 g/L).

Tabel 19. Clorofila a, b și carotenoizii în plante de busuioc provenite din acvaponie în cazul primei secvențe tehnologice (A-B)

| Parametru analizat | HA        | RA        | HB        | RB        |
|--------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Chl a (g/L)        | 0,49±0,27 | 0,51±0,12 | 0,46±0,19 | 0,48±0,15 |
| Chl b (g/L)        | 0,15±0,11 | 0,16±0,17 | 0,10±0,21 | 0,11±0,14 |
| Caroteni (g/L)     | 0,17±0,15 | 0,19±0,2  | 0,16±0,13 | 0,18±0,11 |

Tabel 20. Clorofila a, b și carotenoizii în plante de busuioc provenite din acvaponie în cazul celei de-a doua secvențe tehnologice (A1-A2-B1-B2)

| Parametru analizat | A1R1      | A1R2      | A2R1      | A2R2      | B1R1      | B1R2      | B2R1      | B2R2      | Busuioc comert |
|--------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------------|
| Chl a (g/L)        | 0,59±0,18 | 0,75±0,18 | 0,58±0,13 | 0,61±0,07 | 0,95±0,12 | 0,86±0,15 | 0,79±0,09 | 0,78±0,11 | 0,62±0,17      |
| Chl b (g/L)        | 0,20±0,09 | 0,22±0,08 | 0,19±0,11 | 0,21±0,12 | 0,31±0,05 | 0,28±0,1  | 0,30±0,07 | 0,23±0,14 | 0,23±0,07      |
| Caroteni (g/L)     | 0,20±0,12 | 0,21±0,14 | 0,20±0,08 | 0,22±0,15 | 0,31±0,17 | 0,27±0,13 | 0,27±0,15 | 0,24±0,14 | 0,22±0,09      |

● **Clorofila "b"**, la nivelul primei secvențe tehnologice a înregistrat cea mai mare valoare în scenariul RA (0,51±0,12 g/L) și cea mai mică valoare în scenariul HB (0,10±0,21 g/L). În cazul celei de-a doua secvențe conținutul cel mai mare de clorofilă "b" s-a înregistrat în scenariul B1R1 (0,31±0,05), iar cea mai mică concentrație în cazul scenariului A2R1 (0,19±0,11). Referitor la concentrația de clorofilă "b", din busuiocul din comerț 0,23±0,07 g/L acesta a avut un conținut de clorofilă "a" asemănător celui obținut în scenariul B2R2 (0,23±0,14 g/L), respectiv A1R2 (0,22±0,08 g/L).

● Concentrația de **caroteni** a prezentat cele mai bune valori în scenariul RA și RB (Tabelul 19) în cadrul primei secvențe tehnologice. În cadrul celei de-a doua secvențe cele mai mari concentrații de caroteni s-au întâlnit în scenariile B1R1 (0,31±0,17 g/L) și B2R1 (0,27±0,15 g/L), iar cele mai mici concentrații în cazul scenariilor A1R1 (0,20±0,12 g/L) și A2R1 (0,20±0,08 g/L) (Tabelul 20). În cazul busuiocului din comerț (0,22±0,09 g/L) concentrația de caroteni a fost la fel ca în scenariul A2R2 (0,22±0,15 g/L) în care rata hidraulică a fost mai mare (Tabelul 20).

**Obținerea și studiul extractelor metanolice.** Randamentele de obținere și conținutul în polifenoli totali al extractelor vegetale sunt redată în Tabelul 21.

Randamentele de obținere ale extractelor din rădăcini (5,55 – 17,49%) au fost mai mici decât cele ale extractelor din părți aeriene (12,22 – 31,19%). Pentru extractele din rădăcini, randamentul cel mai ridicat (17,49%) a fost obținut pentru proba 5 (reprezentând rădăcina plantei din A1R1 conform codificării primite de la furnizor). În cazul extractelor din părți aeriene, randamentul cel mai ridicat (31,19%) a fost obținut pentru proba 21 (reprezentând partea aeriană a plantei din A2R2 conform codificării primite de la furnizor). Un randament ridicat (29,04%) a fost obținut și pentru proba 15 (reprezentând partea aeriană a plantei din HA conform codificării primite de la furnizor).

Tabel 21. Randamentele de obținere și conținutul în polifenoli totali al extractelor metanolice

| Probă | Randament de obținere (g%) | Conținut în polifenoli totali (mg/g extract) | Conținut în flavonoide (mg CE /g extract) | Activitate antioxidantă (%) |
|-------|----------------------------|----------------------------------------------|-------------------------------------------|-----------------------------|
| 1     | 5,95                       | 12,34 ± 0,74                                 | 0.104±0.001                               | 12,44 ± 0,64                |
| 2     | 11,79                      | 12,17 ± 0,57                                 | 0.101±0.002                               | 16,67 ± 0,56                |
| 3     | 9,46                       | 9,41 ± 0,28                                  | 0.084±0.001                               | 14,70 ± 0,58                |
| 4     | 8,37                       | 7,69 ± 0,42                                  | 0.081±0.001                               | 30,42 ± 0,61                |
| 5     | 17,49                      | 16,30 ± 0,88                                 | 0.108±0.001                               | 24,83 ± 0,68                |
| 6     | 7,32                       | 28,74 ± 0,99                                 | 0.127±0.001                               | 19,74 ± 0,37                |
| 7     | 14,56                      | 14,02 ± 0,80                                 | 0.112±0.002                               | 15,91 ± 0,80                |
| 8     | 8,96                       | 17,10 ± 0,42                                 | 0.124±0.001                               | 17,25 ± 0,51                |
| 9     | 5,55                       | <b>50,40 ± 1,22</b>                          | 0.174±0.001                               | 22,86 ± 0,55                |
| 10    | 7,75                       | 40,23 ± 0,92                                 | 0.159±0.001                               | 22,80 ± 0,53                |
| 11    | 9,83                       | <b>48,93 ± 1,08</b>                          | 0.165±0.002                               | 21,59 ± 0,51                |
| 12    | 11,87                      | 28,88 ± 0,75                                 | 0.160±0.001                               | 23,17 ± 0,25                |
| 13    | 9,19                       | 119,28 ± 2,57                                | 0.816±0.014                               | 89,93 ± 0,45                |
| 14    | 15,62                      | 8,25 ± 0,13                                  | 0.045±0.001                               | 16,77 ± 0,60                |
| 15    | 29,04                      | 20,28 ± 0,88                                 | 0.047±0.002                               | 4,84 ± 0,60                 |
| 16    | 19,23                      | <b>30,13 ± 0,57</b>                          | 0.024±0.004                               | 16,01 ± 0,68                |
| 17    | 12,22                      | 23,09 ± 0,55                                 | 0.023±0.001                               | 16,30 ± 0,25                |
| 18    | 18,80                      | 20,41 ± 0,82                                 | 0.066 ± 0,004                             | 5,75 ± 0,53                 |
| 19    | 23,93                      | 25,43 ± 0,28                                 | 0.069 ± 0,004                             | 9,80 ± 0,46                 |
| 20    | 19,42                      | <b>78,56 ± 1,02</b>                          | 0.064 ± 0,001                             | 7,06 ± 0,51                 |
| 21    | 31,19                      | 9,35 ± 0,30                                  | 0.068 ± 0,005                             | 10,90 ± 0,31                |
| 22    | 21,94                      | 19,73 ± 0,67                                 | 0.089 ± 0,003                             | 8,74 ± 0,41                 |
| 23    | 19,87                      | 19,12 ± 1,15                                 | 0.074 ± 0,007                             | 14,54 ± 0,21                |
| 24    | 16,09                      | 25,15 ± 0,58                                 | 0.087 ± 0,002                             | 15,41 ± 0,33                |
| 25    | 17,76                      | 20,97 ± 0,50                                 | 0.074 ± 0,0001                            | 18,04 ± 0,80                |
| 26    | 14,90                      | 36,25 ± 1,37                                 | 0.086±0.011                               | 91,72 ± 0,73                |

În ceea ce privește conținutul în polifenoli totali, se remarcă extractele obținute din rădăcinile probelor 9 (reprezentând partea aeriană a plantei din B1R1 conform codificării primite de la furnizor) și 11 (reprezentând partea aeriană a plantei din B2R2 conform codificării primite de la furnizor) și părțile aeriene ale probelor 20 (reprezentând partea aeriană a plantei din A2R1 conform codificării primite de la furnizor) și 16 (reprezentând partea aeriană a plantei din RB conform codificării primite de la furnizor) pentru care au fost determinate valori de 50,40, 48,93 și respectiv, 78,56 și 30,13 mg polifenoli/g extract. Extractele obținute din rădăcini de busuioc crescut în condiții de acvaponie au fost mai sărace în polifenoli totali decât extractele obținute din rădăcini de busuioc crescut pe sol (proba 13). În schimb, extractul metanolic obținut din părțile aeriene ale probei 20 a fost de peste două ori mai bogat în polifenoli totali decât extractul metanolic obținut din părțile aeriene provenite de la exemplare crescute pe sol (proba 16) (78,56 vs. 36,25 mg polifenoli/g extract). Ca urmare, scenariul tehnologic aplicat probei 20 (reprezentând partea aeriană a plantei A2R1 conform codificării primite de la furnizor) a determinat o creștere importantă a conținutului în polifenoli totali în părțile aeriene, dar nu și în rădăcini (proba 7 – rădăcina plantei din A2R1 conform codificării primite de la furnizor cu un conținut de 14,02%). Referitor la conținutul în flavonoide, s-au remarcat extractele de la nivelul rădăcinii în cazul probelor P9, P11 și P12 (respectiv din scenariile tehnologice B1R1, B2R1, B1R2), iar la nivelul părților aeriene s-au remarcat probele P22, P24, P23, respectiv P25 (din scenariile tehnologice B1R1, B2R1, B1R2, respectiv B2R2) (Tabelul 21).

Generarea de specii reactive de oxigen (ROS) poate fi indusă de diverse tipuri de stres abiotic, precum cel salin, secetă, căldură sau stresul metalelor grele. ROS este un termen colectiv folosit atât pentru radicalii liberi, cum ar fi radicalul hidroxi (•OH), anion superoxid (•O<sub>2</sub><sup>-</sup>) și radicali alcoxil (RO•), precum și pentru forme (moleculare) precum peroxidul de hidrogen (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) și oxigenul singlet (¹O<sub>2</sub>) (Vanhoudt et al., 2011; Ozgur et al., 2013). Pentru a face față diferitelor tipuri de stres de mediu, plantele au dezvoltat diverse strategii. Astfel, ca răspuns la supraproducția de ROS, celulele țesuturilor vegetale activează mecanisme.

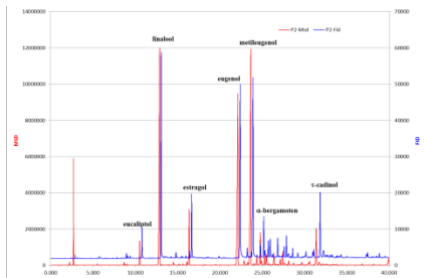
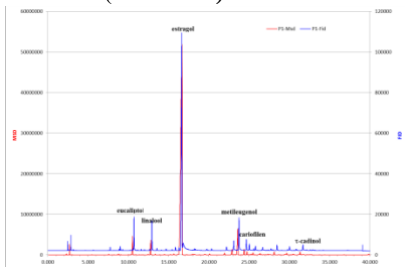
Antioxidanții sunt substanțe vitale care posedă capacitatea de a proteja membrana celulară de daune cauzate de stresul oxidativ indus de radicalii liberi (Rao et al., 2010). Astfel, este un interes din ce în ce mai mare pentru antioxidanții naturali, de exemplu, polifenoli, prezent în plantele medicinale și aromatice, care ar putea ajuta la prevenirea deteriorării oxidative (Wojdylo et al., 2007; Filip, 2017). Polifenolii posedă o chimie structurală ideală pentru activitatea de captare a radicalilor liberi și s-a dovedit a fi antioxidanți mai eficienți in vitro comparativ cu tocoferolii și ascorbatul. Proprietățile antioxidante ale polifenolilor provin din reactivitatea lor ridicată ca donatori de hidrogen sau electroni și din capacitatea polifenolului, radical derivat pentru a stabili și delocaliza electronul nepereche (funcția de rupere a lanțului) și din capacitatea lor de a chela tranziția ionii metalici (Rice-Evans et al., 1997).

Activitatea antioxidantă a extractelor obținute din probe de busuioc crescut în condiții de acvaponie (atât rădăcini, cât și părți aeriene) a fost mai redusă decât activitatea antioxidantă a extractelor obținute din busuiocul crescut pe sol. Astfel, extractele metanolice obținute din rădăcinile și părțile aeriene de busuioc crescut pe sol (probele 13 și 26) au inactivat radicalul liber DPPH în proporție de 89,93% și respectiv, 91,72% în timp ce efectele antioxidante ale extractelor obținute din probele de busuioc crescut în condiții de acvaponie au variat între 4,84% și 30,42%. Activitatea antioxidantă a extractelor nu variază direct proporțional cu valoarea conținutului în polifenoli totali ceea ce sugerează prezența unor polifenoli cu bune efecte antioxidante în proporții diferite în extractele analizate.

#### 4.3 Analiza uleiurilor volatile prin gaz cromatografie, cuplata cu spectrometrie de masă.

Randamente de obținere a uleiurilor volatile: 0,44 mL ulei volatil/100 g produs vegetal (părți aeriene de busuioc crescut pe sol – P13) și 0,22 mL ulei volatil/100 g produs vegetal (părți aeriene de busuioc crescut în condiții de acvaponie – P20). Analiza compoziției chimice a uleiurilor volatile din probele

de busuioc a evidențiat 46 compusi în proba P13 (ulei volatil izolat din părți aeriene de busuioc crescut pe sol) ceea ce reprezintă 92,91% din totalul uleiului volatil și 39 compusi în proba P20 (ulei volatil izolat din părți aeriene de busuioc crescut în condiții de acvaponie), reprezentând 78,56% din componența totală a uleiului volatil (Tabelul 22).



Compușii majori identificați în probele P13 și P20 sunt: **estragol** (54,79 și respectiv, 4,87%), **eugenol** (0,94 și respectiv, 19,08%), **metileugenol** (6,84 și respectiv, 17,78%), **linalool** (4,79 și respectiv, 16,56%), **eucaliptol** (5,16 și respectiv, 2,15%), **τ-cadinol** (1,41 și respectiv, 5,91%), **α-bergamoten** (1,23 și respectiv, 3,12%) și **β-cariofilen** (2,26 și respectiv, 1,10%). Uleiul volatil izolat din părți aeriene de busuioc crescut pe sol (proba P13) se caracterizează prin predominanța componentelor aromatice (63,42%) și a monoterpenelor oxigenate (18,04%). În uleiul volatil izolat din părți aeriene de busuioc crescut în condiții de acvaponie (proba P20) componenta aromatică este mai redusă (42,95%) în timp ce procentul de sescviterpene (hidrocarburi și compuși oxigenați) este mai ridicat decât în proba P13 (22,43% vs. 8,88%) (Tabel 22). Se remarcă o reducere considerabilă a nivelului de estragol și creșterea nivelului de linalool și derivați de eugenol în proba P20 față de proba P13 (4,87% vs. 54,79%, 4,79 vs. 16,56% și respectiv, 7,78% vs. 36,86%) (tabelul 6).

Tabelul 22. Compoziția chimică a uleiurilor volatile din probe de busuioc (TR, timp de retenție; KI, Kovats retention index)

| TR<br>(min) | KI   | Compus                     | %            |              |
|-------------|------|----------------------------|--------------|--------------|
|             |      |                            | P1           | P2           |
| 7,32        | 928  | α-tuien                    | 0,04         | -            |
| 7,55        | 936  | α-pinen                    | 0,46         | 0,06         |
| 7,98        | 952  | camfen                     | 0,06         | -            |
| 8,20        | 959  | benzaldehida               | 0,07         | -            |
| 8,65        | 975  | sabinen                    | 0,21         | -            |
| 8,80        | 981  | β-pinen                    | 0,60         | 0,14         |
| 9,07        | 990  | β-mircen                   | 0,14         | 0,11         |
| 9,98        | 1019 | 4-caren                    | 0,08         | -            |
| 10,22       | 1026 | o-cimen                    | 0,12         | -            |
| 10,40       | 1031 | D-limonen                  | 0,34         | 0,07         |
| 10,52       | 1035 | <b>eucaliptol</b>          | <b>5,16</b>  | <b>2,15</b>  |
| 10,79       | 1043 | benzenacetaldehida         | 0,11         | -            |
| 10,93       | 1046 | β-ocimen                   | 0,13         | -            |
| 11,37       | 1060 | γ-terpinen                 | 0,22         | -            |
| 12,44       | 1091 | fencona                    | 0,28         | -            |
| 12,78       | 1101 | <b>linalool</b>            | <b>4,79</b>  | <b>16,56</b> |
| 13,35       | 1117 | fenchol                    | 0,45         | -            |
| 13,88       | 1132 | 4-acetil-1-metilciclohexen | 0,10         | 0,11         |
| 14,48       | 1149 | camfor                     | 0,30         | 0,46         |
| 15,64       | 1181 | terpinen-4-ol              | 0,63         | 0,11         |
| 16,10       | 1194 | α-terpineol                | -            | 0,55         |
| 16,59       | 1210 | <b>estragol</b>            | <b>54,79</b> | <b>4,87</b>  |
| 17,21       | 1225 | acetat de fenchil          | 5,90         | -            |
| 18,00       | 1247 | carvona                    | 0,27         | -            |
| 18,20       | 1253 | chavicol                   | 0,15         | -            |
| 18,83       | 1271 | citral                     | 0,05         | -            |
| 19,45       | 1288 | anetol                     | 0,10         | -            |
| 19,53       | 1290 | acetat de bornil           | 0,21         | 0,14         |
| 20,10       | 1307 | cinamat de metil           | 0,30         | 0,74         |
| 21,80       | 1356 | α-cubeben                  | 0,21         | -            |
| 21,95       | 1360 | <b>eugenol</b>             | <b>0,94</b>  | <b>19,08</b> |
| 23,14       | 1394 | β-bourbonen                | 0,11         | -            |
| 23,30       | 1399 | β-elemen                   | -            | 0,11         |
| 23,60       | 1408 | <b>metileugenol</b>        | <b>6,84</b>  | <b>17,78</b> |

| TR<br>(min)                  | KI   | Compus                         | %            |              |
|------------------------------|------|--------------------------------|--------------|--------------|
|                              |      |                                | P1           | P2           |
| 24,05                        | 1422 | 1,2,3,4-tetrametil-benzen      | -            | 0,17         |
| 24,39                        | 1432 | <b>β-cariofilen</b>            | <b>2,26</b>  | <b>1,10</b>  |
| 24,75                        | 1443 | <b>α-bergamoten</b>            | <b>1,23</b>  | <b>3,12</b>  |
| 24,92                        | 1448 | α-guaien                       | -            | 0,60         |
| 25,28                        | 1459 | (E)-β-farnesen                 | -            | 1,24         |
| 25,50                        | 1466 | humulen                        | 0,92         | 1,57         |
| 25,76                        | 1474 | β-copaen                       | 0,09         | -            |
| 25,78                        | 1474 | (+)-epibiciclo-sescvifelandren | -            | 0,22         |
| 26,37                        | 1492 | germacren D                    | 0,74         | 1,71         |
| 26,58                        | 1498 | α-selinen                      | -            | 0,19         |
| 27,06                        | 1514 | β-bisabolen                    | 0,18         | -            |
| 27,15                        | 1517 | δ-guaien                       | -            | 1,10         |
| 27,38                        | 1524 | γ-muurolen                     | 0,42         | 1,81         |
| 27,63                        | 1532 | (E)-calamenen                  | -            | 0,63         |
| 28,13                        | 1548 | α-bisabolen                    | 1,13         | 0,71         |
| 28,69                        | 1566 | nerolidol                      | 0,11         | 0,41         |
| 30,47                        | 1624 | humulen epoxid                 | -            | 0,50         |
| 31,32                        | 1652 | <b>τ-cadinol</b>               | <b>1,41</b>  | <b>5,91</b>  |
| 31,73                        | 1666 | β-eudesmol                     | -            | 1,30         |
| 32,09                        | 1678 | metil-p-metoxicinamat          | -            | 0,31         |
| 32,47                        | 1691 | α-bisabolol                    | 0,07         | 0,20         |
| 36,80                        | 1845 | hexahidrofarnesil acetona      | 0,07         | 0,43         |
| 39,53                        | 1950 | izofitol                       | -            | 0,12         |
| 42,65                        | 2117 | fitol                          | 0,12         | 1,91         |
| 43,89                        | 2221 | fitol acetat                   | -            | 0,06         |
| Clasa chimică de compuși (%) |      |                                |              |              |
| Monoterpene                  |      |                                | 2,28         | 0,38         |
| Monoterpene oxigenate        |      |                                | 18,04        | 19,97        |
| Sescviterpene                |      |                                | 7,29         | 14,11        |
| Sescviterpene oxigenate      |      |                                | 1,59         | 8,32         |
| Compuși aromatici            |      |                                | 63,42        | 42,95        |
| Compuși alifatici            |      |                                | 0,17         | 0,54         |
| Altele                       |      |                                | 0,12         | 2,09         |
| Total (%)                    |      |                                | <b>92,91</b> | <b>88,36</b> |

În concluzie, cultura în condiții de acvaponie a determinat o creștere a biosintezei de linalool și derivați de eugenol, dar și o reducere importantă a biosintezei de estragol. Eugenolul are proprietăți antibacteriene, antifungice, antivirale, antiinflamatoare, antitumorale și antioxidante. Linaloolul are un profil farmacologic complex dezvoltând efecte antiinflamatoare, antioxidante, anestezic locale, analgezice, sedative, anxiolitice și anticonvulsivante (Aprotosoae et al., 2014; Stănescu et al., 2018).

#### 4.4 Analiza extractelor nevolatile prin cromatografie in faza lichida de inalta performanta cu detectie UV-VIS

Extratele din rădăcini și părți aeriene au fost analizate prin cromatografie în fază lichidă de înaltă performanță cu detecție UV-VIS și prin spectrometrie de masă (ionizare prin electrospray și analizor quadrupol al timpului de zbor, HPLC-DAD-ESI-Q-TOF MS/MS). S-a utilizat un sistem HPLC Agilent 1200 cuplat cu un spectrometru de masă Agilent G6530B (coloană cromatografică Phenomenex C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 microm); fază mobilă: A) 1% acid formic și B) acetonitril cu 1% acid formic; gradient: 0 min – 10% B, 5 min – 10% B, 55 min – 60% B, 75 min – 95% B, 85 min – 95% B, 110 min – 100% B; detecție 280 nm; volum injectat 20 microL; debit 0,6 mL/min; mod de ionizare pozitiv; voltaj capilar 4200 V; energie de fragmentare 200 V; energie de coliziune 40 V; skimmer 65 V; debit gaz uscarea 12 L/min; temperatură gaz 300°C; m/z 100-1700 (Singleton et al., 1999; Ullah, 2022). Analiza a indicat spectre polifenolice asemanatoare ale extractelor din radacini, pe de o parte, și ale extractelor din parti aeriene, pe de alta parte. Inainte de injectare, extratele au fost dizolvate in metanol in concentratie de 20 mg/mL si filtrate prin filtre Whatman Spartan (30 mm, celuloza regenerata, 0.45 microm) (Anexa 8 figura 3). Pe baza procedului EIC (Extracted Ion Chromatogram, extractia [M+H]+ pentru diferiti polifenoli), au fost identificati

urmatorii compusi: în extractele metanolice din rădăcini: acizii clorogenici și acidul galic; în extractele metanolice din părți aeriene: catehina, acidul cafeic (Anexa 8 figurile 4-9).

#### 5.1. Testarea activității antimicrobiene al extractului obținut în cadrul A. 2.4., față de specii Gram-pozitive și Gram negative.

Materialul biologic a fost reprezentat de 26 de probe din rădăcini și părți aeriene de *Ocimum basilicum* L. În tabelul 1 sunt prezentate codificările extractelor. Pe lângă busuiocul provenit din acvaponie s-a analizat și busuioc crescut pe sol achiziționat din comerț.

Materialul microbiologic a fost reprezentat de culturi de *Escherichia coli* ATCC 25922 și *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, utilizate în determinarea activității antibacteriene a uleiurilor esențiale și a extractelor metanolice de *Ocimum basilicum* L., obținute din colecția de microorganisme a Laboratorului de Microbiologie de la Facultatea de Biologie din cadrul Universității „Alexandru Ioan Cuza” din Iași.

Testarea sensibilității și a rezistenței speciilor bacteriene utilizate (*Escherichia coli* ATCC 25922 și *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) în acest experiment la acțiunea uleiurilor volatile și a extractelor de *Ocimum basilicum* L. s-a determinat in vitro, realizându-se pe baza diametrului zonei de inhibiție rezultat în urma utilizării metodei difuzimetrică Kirby - Bauer, completată cu metoda diluțiilor seriate (C.M.I.) adoptată de CLSI M07-A11 (Clinical & Laboratory Standard Institute, 2021).

Metoda difuzimetrică Kirby – Bauer este o metodă simplă și rapidă, utilizată în mod curent în multe laboratoare pentru testarea sensibilității și/sau rezistenței antimicrobiene (Subhash, 2012; Balouiri et al., 2016; Dumitrescu et al., 2021). Citirea rezultatelor se face cu ochiul liber, măsurând diametrul zonelor de inhibiție de 2 - 3 ori în diferite direcții cu ajutorul unei rigle gradate (mm). La citire s-a inclus în măsurători și discul de hârtie de filtru (6 mm) (Figura 67). Dacă în apropierea discului nu s-au observat zone de inhibiție aceasta a fost raportată ca fiind de 0 mm.

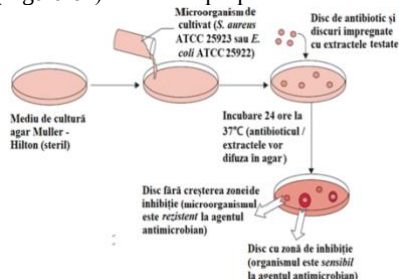


Figura 67. Diagrama schematică a testării sensibilității la antibiotice prin metoda difuzimetrică Kirby-Bauer (Subhash, 2012)

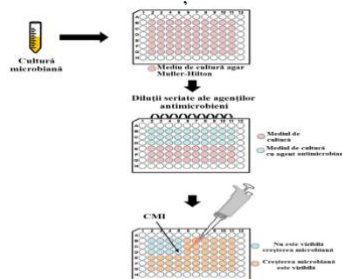


Figura 68. Reprezentarea schematică a stabilirii C.M.I. (Wang et al., 2017)

Metoda diluțiilor seriate (determinarea concentrației minime inhibitorii - C.M.I.) este definită ca cea mai mică concentrație a unui agent antimicrobian care inhibă creșterea microorganismelor în tuburi sau godeuri de microdiluție, fiind detectată cu ochiul liber. Cele mai recunoscute standarde sunt furnizate de CLSI (The Clinical and Laboratory Standards Institute) și EUCAST (European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing), oferind o procedură uniformă de testare care este practică și efectuată în majoritatea laboratoarelor clinice (Figura 68).

Citirea se realizează cu ochiul liber, observându-se o virare a culorii în roz pentru creșterea bacteriană sau în albastru - violet când nu prezintă o dezvoltare bacteriană. C.M.I. pentru tulpina testată este dată de concentrația soluției antibacteriene din ultimul godeu fără creștere evidentă a culturii.

Rezultatele acestui studiu, privind testarea activității antimicrobiene prin metoda difuzimetrică Kirby - Bauer pentru extractele și uleiurile volatile de *Ocimum basilicum* L. evidențiază următoarele:

- În cazul extractelor metanolice de *Ocimum basilicum* L. în concentrație de 10  $\mu$ L/mL, activitatea antimicrobiană evidențiată prin metoda difuzimetrică Kirby - Bauer, arată că din totalul de 30 de probe, cinci probe au prezentat activitate antimicrobiană în cazul testării speciei *Escherichia coli* ATCC 25922 și o probă în cazul testării speciei *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Figurile 12 - 21, Anexa 10; Tabelul 23):
  - cod 2: busuioc rădăcină (sistem acvaponic, având drept material sturionicol sturioni) - cu diametrul zonei de inhibiție de 8 mm la *Escherichia coli* ATCC 25922;
  - cod 16: busuioc parte aeriană (sistem acvaponic, având drept material sturionicol sturioni) - cu diametrul zonei de inhibiție 9 mm la *Escherichia coli* ATCC 25922;
  - cod 17: busuioc parte aeriană (sistem acvaponic, având drept material sturionicol crapi) - cu diametrul zonei de inhibiție 9 mm la *Escherichia coli* ATCC 25922.
  - cod 19: busuioc parte aeriană (sistem acvaponic, având drept material sturionicol sturioni) - cu diametrul zonei de inhibiție 7 mm la *Escherichia coli* ATCC 25922;
  - cod 26: busuioc parte aeriană - probă crescută pe sol - cu diametrul zonei de inhibiție de 7 mm la *Escherichia coli* ATCC 25922 și 9 mm la *Staphylococcus aureus* ATCC 25923;
- În cazul controlului pozitiv (Gentamicină 10  $\mu$ g/mL - antibiotic de referință) diametrul zonei de inhibiție înregistrat a fost 15 mm în cazul testării speciei *Staphylococcus aureus*, respectiv de 14 mm în cazul testării speciei *Escherichia coli*. Testarea probei control negative, reprezentată de DMSO 3 %, a confirmat absența zonei de inhibiție în cazul acestei probe (Figurile 69-71).

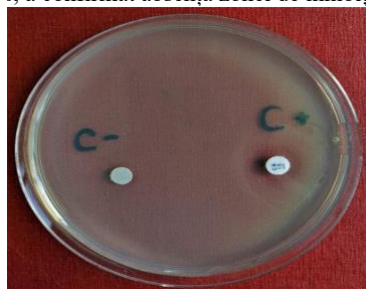


Figura 69. Metoda de difuzie calitativă (Kirby - Bauer) a controlului pozitiv (C+: gentamicină) și negativ (C-: DMSO 3 %) față de *E. coli*



Figura 70. Metoda de difuzie calitativă (Kirby - Bauer) a controlului pozitiv (C+: gentamicină) și negativ (C-: DMSO 3 %) față de *S. aureus*

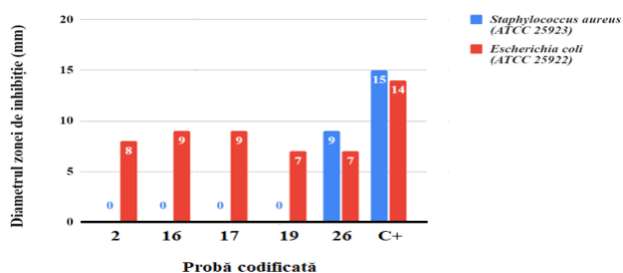


Figura 71. Diametrul zonei de inhibiție (mm) evidențiat prin metoda Kirby - Bauer a extractelor metanolice de *Ocimum basilicum* L. (codificarea 2, 16, 17, 19, 26 și a controlului pozitiv (C+))

Prin metoda Kirby – Bauer a extractelor metanolice de *O. basilicum* L. s-a evidențiat activitatea antimicrobiană, în special în cazul bacteriei Gram negative (*E. coli*).

În cazul probelor de ulei volatile de *Ocimum basilicum* L. testate (părți aeriene - probă crescută pe sol - **M** și planta care a prezentat cele mai bune rezultate - planta A1R2 - **P**), s-a realizat diluarea acestora în DMSO 3 %, obținându-se o concentrație de 25  $\mu$ L/mL, rezultatele obținute sunt prezentate în Figurile 72- 74, evidențindu-se următoarele: uleiul volatil de *O. basilicum* L. (cod 26) – induce un diametru al zonei de inhibiție de 14 mm pentru specia *Escherichia coli* și 12 mm pentru specia *Staphylococcus aureus*; iar uleiul volatil de *O. basilicum* L. (cod 19) – induce un diametru al zonei de inhibiție de 20 mm pentru specia *Escherichia coli* și 13 mm pentru specia *Staphylococcus aureus*. Se poate observa că în cazul uleiului volatil din proba cu codul 19 activitatea antimicrobiană evidențiată a fost mult mai față de uleiul volatil obținut din părțile aeriene de *O. basilicum* crescut pe sol, efect confirmat de zonele de inhibiție dezvoltate în urma incubării microorganismelor (Figura 74).

Tabelul 23. Testarea activității antibacteriene prin metoda difuzimetrică Kirby – Bauer a extractelor metanolice de *Ocimum basilicum* L. și a probelor de control

| Cod (notare convențională) | Denumirea probei                         | Diametrul zonei de inhibiție (mm)         |                                      |
|----------------------------|------------------------------------------|-------------------------------------------|--------------------------------------|
|                            |                                          | <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923) | <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922) |
| 1                          | Plantă RA - rădăcină                     | 0                                         | 0                                    |
| 2                          | Plantă HA - rădăcină                     | 0                                         | 8                                    |
| 3                          | Plantă RB - rădăcină                     | 0                                         | 0                                    |
| 4                          | Plantă HB - rădăcină                     | 0                                         | 0                                    |
| 5                          | Plantă A1R1 - rădăcină                   | 0                                         | 0                                    |
| 6                          | Plantă A1R2 - rădăcină                   | 0                                         | 0                                    |
| 7                          | Plantă A2R1 - rădăcină                   | 0                                         | 0                                    |
| 8                          | Plantă A2R2 - rădăcină                   | 0                                         | 0                                    |
| 9                          | Plantă B1R1 - rădăcină                   | 0                                         | 0                                    |
| 10                         | Plantă B1R2 - rădăcină                   | 0                                         | 0                                    |
| 11                         | Plantă B2R1 - rădăcină                   | 0                                         | 0                                    |
| 12                         | Plantă B2R2 - rădăcină                   | 0                                         | 0                                    |
| 13                         | Plantă comerț crescută pe sol - rădăcină | 0                                         | 0                                    |
| 14                         | Plantă RA - tulpină                      | 0                                         | 0                                    |
| 15                         | Plantă HA - tulpină                      | 0                                         | 0                                    |
| 16                         | Plantă RB - tulpină                      | 0                                         | 9                                    |
| 17                         | Plantă HB - tulpină                      | 0                                         | 0                                    |
| 18                         | Plantă A1R1 - tulpină                    | 0                                         | 0                                    |
| 19                         | Plantă A1R2 - tulpină                    | 0                                         | 7                                    |
| 20                         | Plantă A2R1 - tulpină                    | 0                                         | 0                                    |
| 21                         | Plantă A2R2 - tulpină                    | 0                                         | 0                                    |
| 22                         | Plantă B1R1 - tulpină                    | 0                                         | 0                                    |
| 23                         | Plantă B1R2 - tulpină                    | 0                                         | 0                                    |
| 24                         | Plantă B2R1 - tulpină                    | 0                                         | 0                                    |
| 25                         | Plantă B2R2 - tulpină                    | 0                                         | 0                                    |
| 26                         | Plantă comerț crescută pe sol - tulpină  | 9                                         | 7                                    |
| C+                         |                                          | 15                                        | 14                                   |
| C-                         |                                          | 0                                         | 0                                    |

Legendă:

C+ - control pozitiv; C- - control negativ

## 5.2. Stabilirea concentrației minime inhibitorii a fitobioticului utilizat față de bacteriile Gram-pozitive și Gram-negative.

Testarea calitativă a activității antibacteriene a fost completată cu testarea cantitativă, prin care a fost evaluată concentrația minimă inhibitoare (C.M.I.) a uleiurilor volatile și extractelor metanolice de *Ocimum basilicum* L. pentru fiecare microorganism testat (Tabelul 24).

Tabelul 24. Testarea activității antibacteriene prin C.M.I. a extractelor metanolice de *Ocimum basilicum* L. (codificarea 2, 16, 17, 19, 26) față de *S. aureus* și *E. coli*

| Probă notare convențională | C.M.I. (μL/mL)                            |                                      |
|----------------------------|-------------------------------------------|--------------------------------------|
|                            | <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923) | <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922) |
| 2                          | -                                         | 1,25                                 |
| 16                         | -                                         | 0,019                                |
| 17                         | -                                         | 2,5                                  |
| 19                         | -                                         | 0,019                                |
| 26                         | 10                                        | 1,25                                 |

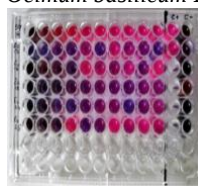


Figura 75. Stabilirea concentrației minime inhibitorii (C.M.I.) a extractelor metanolice de *Ocimum basilicum* L. (codificarea 2, 16, 17, 19, 26) față de *S. aureus* și *E. coli*

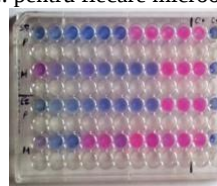


Figura 76. Stabilirea concentrației minime inhibitorii (C.M.I.) a uleiurilor volatile de *Ocimum basilicum* L. față de *Staphylococcus aureus* și *Escherichia coli* (M și P)

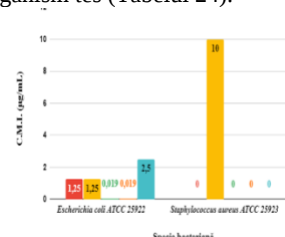


Figura 77. Concentrația minimă inhibitoare (C.M.I.) a extractelor metanolice de *Ocimum basilicum* L. față de *S. aureus* și *E. coli* (codificarea 2, 16, 17, 19, 26)

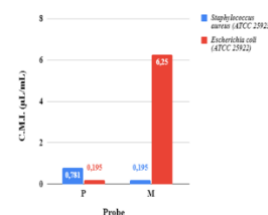


Figura 78. Concentrația minimă inhibitoare (C.M.I.) a uleiurilor volatile de *Ocimum basilicum* L. față de *Staphylococcus aureus* și *Escherichia coli* (M - plantă crescută pe sol; P - plantă A1R2)

La determinarea C.M.I. pentru uleiul volatil din părțile aeriene de *O. basilicum* L. (crescută pe sol) (proba M) și din planta din A1R2 (proba P), de concentrație 25 μL/mL, s-au înregistrat următoarele valori (Figura 28-31): **Proba P** – valoarea 0,781 μL/mL pentru specia *S. aureus* și valoarea 0,195 μL/mL pentru specia *E. coli*; respectiv **Proba M** – valoarea 0,195 μL/mL pentru specia *S. aureus* și valoarea de 6,25 μL/mL pentru specia *E. coli*.

**Concluzii.** În urma analizei rezultatelor experimentale privind activitatea antibacteriană a uleiurilor volatile și a extractelor metanolice de *Ocimum basilicum* L. crescute în sistem acvaponic față de două bacterii testate (*S. aureus* și *E. coli*) se pot desprinde următoarele concluzii:

- Studiul a 26 de extracte metanolice (aduse la sec) de *O. basilicum* L. demonstrează prezența activității antibacteriene la 5 din probele testate față de *E. coli* (busuioc rădăcină și partea aeriană, sistem acvaponic, având drept material sturionicol sturioni *Acipenser* sp. și o probă (busuioc parte aeriană - probă crescută pe sol) cu activitate față de ambele microorganisme (*S. aureus* și *E. coli*).
- Uleiul volatil de *O. basilicum* L. provenit din planta din A1R2 a prezentat o activitate antimicrobiană semnificativ mai mare față de proba de ulei de *O. basilicum* L. (plantă crescută pe sol) pentru ambele tulpini bacteriene testate.
- Bacteriile Gram-negative s-au dovedit a fi mai sensibile la activitatea antimicrobiană a extractelor metanolice și a uleiului volatil de *Ocimum* sp. față de bacteriile Gram-pozitive, fenomen corelat cu arhitectura deosebită a peretelui celular care condiționează permeabilitatea selectivă a învelișului bacterian și mecanismele de sinteză ale acestuia, cu consecințe în ceea ce privește sensibilitatea și/sau rezistența bacteriilor la diverși compuși bioactivi.
- Evaluarea cantitativă a activității antibacteriene prin stabilirea concentrației minime inhibitorii (C.M.I.) a evidențiat valoarea de 10 μL/mL pentru *S. aureus* la proba de busuioc (crescut pe sol), iar pentru *E. coli* valori ce variază între 0,019 μL/mL și 2,5 μL/mL.
- S-au stabilit valorile concentrațiilor minime inhibitorii (C.M.I.) pentru uleiurile volatile obținute din probele reprezentate de părțile aeriene (crescute pe sol) 0,195 μL/mL pentru *S. aureus* și 6,25 μL/mL pentru *E. coli*, precum și pentru amestecul de probe (părți aeriene) obținute prin cultivarea în sistem acvaponic 0,781 μL/mL pentru *S. aureus* și 0,195 μL/mL pentru *E. coli*.

## 6. Dezvoltarea unei aplicații software în scopul diseminării către mediul industrial a noilor tehnologii dezvoltate, precum și a posibilităților viitoare tehnologii dezvoltate sau optimizate (realizare finală).

Aplicația software are drept deziderat diseminarea, contra cost, a noilor tehnologii dezvoltate ca urmare a activității de cercetare dezvoltare ce a fost întreprinsă de către SILURUS MARKET în cadrul prezentului proiect și urmează a fi dezvoltată de-a lungul următorilor ani, folosind infrastructura,

cunoașterea și know-how-ul dobândit în perioada de implementare. Astfel, aplicația poate fi accesată prin <https://multiaquaaiot.com>. Structura aplicației este bazată pe trei pagini principale și anume Acasa, Tutorial utilizare platformă și Platformă tehnologii. (Figura 79). Aplicația are o opțiune de login ce oferă posibilitatea de a conecta și debloca conținut nou disponibil doar pentru persoanele cu rolul de administrator. Pagina *Tutorial utilizare platformă* reprezintă o demonstrație a cum platforma funcționează. Acesta propune niște alegeri *default* care, cumulativ, rezulta la selecția unei tehnologii. După confirmarea selecțiilor *default*, platforma redirecționează utilizatorul către o altă pagina pe care se află tehnologia potrivită, corespunzătoare alegerilor selectate, însă *blurată*. Pentru a o putea debloca este necesar *următorul pas* și anume accesarea butonului “*Deblocheaza Tehnologia*” care ne explica exact pașii necesari a fi parcurși pentru a obține fișierul, aceștia fiind: Plata, completarea cu adresa de email și submit. Următorul element al navigației este “Platformă Tehnologii”, mai exact, testul de descoperire al variantei tehnologice și tehnice care se potrivește specificului clientului, pe baza propriilor selecții ale acestuia. Dacă va fi găsită o platforma care să se potrivească cu valorile selectate, acesta va prelua comportamentul din secțiunea de Tutorial, afișând tehnologia *blurată* și buton cu informații exacte despre cum se poate obține. De asemenea, utilizatorul este asistat cu informații legate de avantajele și dezavantajele eventualelor decizii luate în vederea identificării soluției care se pliază cel mai bine nevoilor acestuia. Platforma cuprinde informații tehnice despre modul de proiectare a sistemelor multi-trofice integrate, tehnologice și economice. Se recomandă accesarea link-ului menționat mai sus pentru familiarizarea cu structura aplicației software.

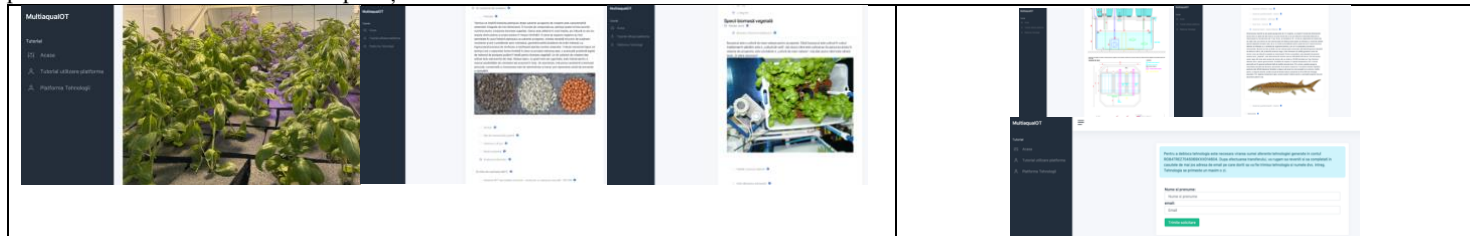


Figura 79. Structură aplicație software pentru diseminare date

Proiectul a fost realizat prin framework-ul *Laravel*, unul dintre cele mai folosite pentru dezvoltare web, alături de *Symfony* și este găzduit pe o platforma de *shared Hosting*. Fiecare tabela dispune de propria sa migrare (ceea ce înseamnă ca niciodată nu se va putea pierde structura bazei de date, schema acestuia fiind păstrată în fișiere, alături de tipul și proprietățile coloanelor. Valorile mama (opțiunile superioare) sunt conectate de cele secundare prin chei străine, de aici și legătura din acestea. Fiecare tabel, de asemenea, are asociat un model în cadrul căruia pot fi trecute, ulterior, asocieri dintre tabele care ne pot ajuta pentru o extracție mai facilă a informației. Figura 79 ilustrează schema tabelii “*users*”, coloanele acestuia sunt: id, name, email, email\_verified\_at (data și ora la care s-a validat adresa de email, id\_admin (precizăm dacă userul este sau nu admin, în cazul în care se va decide înregistrarea clienților pentru a-și accesa propriile date din “Contul meu”, “Password” (parola care este cryptată în baza de date). În ANEXA 10 este prezentată partea conceptuală, de arhitectură de cod, a platformei.

## 6. Diseminarea rezultatelor finale ale proiectului

Diseminarea întreprinsă în cadrul etapei a constat într-un număr de 6 articole publicate (un articol în Q1 – zona roșie cu IF 3,408, un articol în Q3 – zona albă cu IF 2,690 și 4 articole indexate ISI), 5 articole acceptate spre a fi publicate (un articol în Q2 – zona galbenă cu IF 5,411, 3 articole indexate ISI și un articol BDI), 2 articole aflate în evaluarea (un articol în Q1 – zona roșie cu IF 4,658, respectiv un articol în Q2 – zona galbenă cu IF 3,847), 12 lucrări comunicate în cadrul Conferințelor Internaționale (din care 7 conferințe indexate ISI), 1 platformă web pentru diseminarea rezultatelor tehnologice către mediul industrial), 1 cerere de brevet și 1 produs inovativ realizat și transferat către mediul economic. ANEXA XIII prezintă pe larg rezultatele diseminate.

**7. Scrierea și depunerea cererii de brevet pentru echipamentul inteligent bazat pe tehnici inteligente de recunoaștere vizuală pentru estimarea în timp real a biomasei sturionice, validat și demonstrat la nivel industrial prin noile tehnologii de creștere obținute în urma optimizării.**

**Cerere brevet invenție depusă cu titlul *SISTEM ACVAPONIC CU SUBSTRAT PENTRU CREȘTEREA DURABILĂ A BUSUIOCULUI (OCIMUM BASILICUM) ȘI A STURIONULUI SIBERIAN (ACIPENSER BAERII)*, Cerere de brevet depusă OSIM nr. A00671 / 24 octombrie 2022.** (ANEXA XII)

**Direcții viitoare de dezvoltare:** utilizarea tehnicilor de recunoaștere vizuală pentru studiul comportamentului biomasei sturionice în vederea asocierii acestuia cu diverse situații de stres la care biomasa sturionicolă poate fi supusă de-a lungul unui ciclu îndelungat de producție.

Prezentul raport cuprinde un număr de **13 ANEXE**, atașate pe platforma Evoc UEFISCDI.

Director Proiect: ing. Răzvan DROGEANU

Responsabil Partener 1: S.L. dr. ing. ec. Ștefan-Mihai PETREA

Responsabil Partener 2: conf. univ. dr. Lăcrămioara OPRICĂ

Responsabil Partener 3: prof. univ. dr. Anca MIRON

## Bibliografie

- Afzal F., Khurshid R., Ashraf N., Kazi A.G, (2014): Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Response to Pathogens and Wounding, In *Oxidative Damage to Plants, Antioxidant Networks and Signaling*; Ahmad, P., Ed.; Academic Press: London, UK, 397–424
- Alina ANTACHE, Cristea, V., Grecu, I., Dediu, L., Docan, A., Mocanu (Crețu), M., Plăcintă (Ion), S., Coadă, M.T., The influence of some phytobiotics on oxidative stress at *Oreochromis niloticus* grown in an intensive recirculating aquaculture system, *Revista "Lucrări științifice. Seria Zootehnie"*, 2013, Volume 59 (18) [http://www.uaiasi.ro/revista\\_zoo/ro/documente/Pdf\\_Vol\\_59/Alina\\_ANTACHE.pdf](http://www.uaiasi.ro/revista_zoo/ro/documente/Pdf_Vol_59/Alina_ANTACHE.pdf)
- Alina ANTACHE, Cristea, V., Grecu, I., Petrea, Ș.M., Plăcintă, S., Coadă, M.T, The Evaluation Of Synergistic Effect Of Hippophae Rhamnoides And Vitamin E On Growth Performance And Oxidative Stress At *Oreochromis Niloticus* - LINNAEUS, 1758, *Scientific Papers Animal Science And Biotechnologies*, 2014, Volume 47(2), In Press.
- Alina ANTACHE, Cristea, V., Grecu, I.R., Ion (Plăcintă), S., Mocanu (Cretu), M., The Influence of Rosemary, Sea Buckthorn and Ginger on Oxidative Stress at *Oreochromis niloticus* Reared in a Recirculating Aquaculture System, *Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies*, 2013, Volume 70(1), p. 110-116, <http://journals.usamvcluj.ro/index.php/zootehnie/article/view/9292/7803>
- Aprotosoiaie AC, Hancianu M, Costache II, Miron A. Linalool: a review on a key odorant molecule with valuable biological properties. *Flavour Fragr J* 2014; 29: 193-219.
- Bagnyukova, T.V., Chahrak, O.I., Lushchak, V.I., Coordinated response of goldfish antioxidant defenses to environmental stress, *Aquat. Toxicol.*, 2006, Volume 78(4), p. 325-331.
- Bailey-Serres J., Mittler R., (2006): The roles of reactive oxygen species in plant cells, *Plant Physiol.*, 141, 311,
- Blaxhall, P.C., Daisley, K.W., Routine haematological methods for use fish blood, *Journal of Fish Biology*, 1973, Volume 5(6), 771 – 778.
- Bradford M., (1976): A rapid and sensitive method for microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding *Anal. Biochem.*, 72 (1–2), 248-254
- Crețu (Mocanu) M., Teză de doctorat: Cercetări privind elaborarea modelului creșterii păstrăvului curcubeu (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792) într-un sistem recirculant de acvacultură industrială, Universitatea "Dunărea de Jos" Galați, 2013.
- Crețu (Mocanu) M., Teză de doctorat: Cercetări privind elaborarea modelului creșterii păstrăvului curcubeu (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792) într-un sistem recirculant de acvacultură industrială, Universitatea "Dunărea de Jos" Galați, 2013.
- Cristea, V., Antache, A., Grecu, I., Docan, A., Dediu, L., Mocanu (Crețu) M., Review: The Use of Phytobiotics in Aquaculture, *Lucrări Științifice, Seria Zootehnie*, Iași, 2012, Volume 57 (17).
- Denev, S.A., Ecological alternatives of antibiotic growth promoters in the animal husbandry and Aquaculture. DSc. Thesis, Department of Biochemistry Microbiology, Trakia University, Stara Zagora, Bulgaria, 2008, p. 294.
- Filip S (2017): Basil (*Ocimum basilicum* L.) a Source of Valuable Phytonutrients. *Int J Clin Nutr Diet* 3: 118. doi: <https://doi.org/10.15344/2456-8171/2017/118>
- Khalid M. Hosny, Taher Magdy, Nabil A. Lashin, Kyriakos Apostolidis, George A. Papakostas, "Refined Color Texture Classification Using CNN and Local Binary Pattern", *Mathematical Problems in Engineering*, vol. 2021, Article ID 5567489, 15 pages, 2021.
- Lungu Apetrei C, Șpac A, Brebu M *et al.* Composition, and antioxidant and antimicrobial activities of the essential oils of a full-grown *Pinus cembra* L. tree from the Calimani Mountains (Romania). *J Serb Chem Soc* 2013; 78: 27-37.
- Maurilio, L.F., Review – The use of probiotic in aquaculture:an overview, *Journal of Microbio.*, 2011, Volume 2(12), p. 471-478.
- Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M., Van Breusegem F, (2004): Reactive oxygen gene network of plants, *Trends Plant Sci*, 9, 490–498,
- Molyneux P. (2004): The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, 26(2):211-219
- Ozgur A., Uzilday B., Sekmen A.H., Turkan I, (2013): Reactive oxygen species regulation and antioxidant defence in halophytes, *Funct. Plant Biol.*, 40, 832–847,
- Rao KS, Chaudhury PK, Paradhan A (2010) Evaluation of antioxidant activities and total phenolic content of *Chromolaena odorata*. *Food Chem Toxicol* 48: 729-732.
- 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. 1231-1237.
- Rice-Evans C, Miller N, Paganga G (1997): Antioxidant properties of phenol compounds. *Trends Plant Sci* 2: 152-159.
- Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R.M. (1999): Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.*, 299:152-178.
- Stănescu U (ed.), Hancianu M, Cioanca O, Aprotosoiaie AC, Miron A. *Plante medicinale de la A la Z*, ed. a III-a, Ed. Polirom, 2018.
- Svobodova, Z., Fravda, D., Palakova, J., Unified methods of haematological examination of fish, Research Institute of fish Culture and Hydrobiology, VURH Vodnany, Edice Metodik, Czechoslovakia, 1991.
- Ullah S. et al. *International Journal of Plant Based Pharmaceuticals*, 2022, 2(2), 205-209.
- 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, Volume 66, p. 511-517. [256] Bagnyukova, T.V., Chahrak, O.I., Lushchak, V.I., Coordinated response of goldfish antioxidant defenses to environmental stress, *Aquat. Toxicol.*, 2006, Volume 78(4), p. 325-331.
- Vanhoudt N., Cuypers A., Vangronsveld J., Horemans N., Wannijn J., Van Hees M., Vandenheve H., (2011): Study of biological effects and oxidative stress related responses in gamma irradiated *Arabidopsis thaliana* plants. *Radioprotection*, 46, S401–S407.
- Velichkova Katya, Ivaylo Sirakov, 2018. Growth parameters, protein and photosynthetic pigment content of *Chlorella vulgaris* cultivated under photoautotrophic and mixotrophic conditions. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 24 (Supplement 1) 2018, 150-155.
- Wangenstein H, Samuelsen AB, Malterud KE. Antioxidant activity in extracts from coriander. *Food Chem* 2004; 88: 293-297.
- Winterbourn C.C., R.E, Hawkins, M, Brian, R.W, (1975): Carrell The estimation of red cell superoxide dismutase activity *J, Lab, Clin, Med.*, 85 (2), 337-341
- Wojdylo A, Oszmianski J, Czemerys R (2007) Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chem* 105: 940-949.