

UNIVERSITATEA DE VEST „VASILE GOLDIȘ”

DIN ARAD

FACULTATEA DE ȘTIINȚE ALE NATURII

Biol. Mihaela Ostan (căs. Bădiliță)

TEZĂ DE DOCTORAT

**CERCETĂRI PRIVIND INFLUENȚA FACTORILOR
FIZICO-CHIMICI AI MEDIULUI ACVATIC ASUPRA
EMBRIONILOR DE CYPRINIDAE**

**Conducător științific:
Prof. univ. dr. Aurel ARDELEAN**

**Arad
- 2011 -**

CUPRINS

Introducere

PARTEA GENERALĂ

I. Factorii fizico-chimici ai mediului acvatic și influența lor asupra dezvoltării embrionare la ciprinide

- 1.1. Factori fizici
 - 1.1.1. Temperatura
 - 1.1.2. Lumina
 - 1.1.3. Mișcarea apei
- 1.2. Factori chimici
 - 1.2.1. Oxigenul din apă
 - 1.2.2. Bioxidul de carbon
 - 1.2.3. Reacția chimică a apei
 - 1.2.4. Salinitatea
 - 1.2.5. Duritatea apei
 - 1.2.6. Substanțele azotate din apă

II. Metode și tehnici utilizate în cercetarea factorilor fizico-chimici ai apei

- 2.1. Determinarea însușirilor organoleptice
- 2.2. Determinarea culorii
- 2.3. Determinarea turbidității
- 2.4. Determinarea luminii
- 2.5. Determinarea pH-ului apei
- 2.6. Determinarea durității apei
- 2.7. Determinarea amoniacului
- 2.8. Determinarea nitriților
- 2.9. Determinarea nitraților
- 2.10. Determinarea hidrogenului sulfurat
- 2.11. Determinarea sulfatilor
- 2.12. Determinarea oxigenului dizolvat

III. Caracterizarea și particularitățile ciprinidelor

- 3.1. Încadrarea sistematică
- 3.2. Caracterele generale ale ciprinidelor
- 3.3. Dezvoltarea embrionară la ciprinide

PARTEA EXPERIMENTALĂ

IV. Scopul și obiectivele cercetării

V. Materiale și metode de cercetare

VI. Rezultate și discuții

- 6.1. Influența luminii asupra dezvoltării embrionare la ciprinide
 - 6.1.1. Descrierea experimentului particularități de metodică
 - 6.1.2. Rezultate și discuții
 - 6.1.3. Concluzii parțiale

- 6.2. Influența mișcării apei asupra dezvoltării embrionare la ciprinide
 - 6.2.1. Descrierea experimentului particularități de metodică
 - 6.2.2. Rezultate și discuții
 - 6.2.3. Concluzii parțiale

- 6.3. Influența pH-ului asupra dezvoltării embrionare la ciprinide
 - 6.3.1. Descrierea experimentului particularități de metodică
 - 6.3.2. Rezultate și discuții
 - 6.3.3. Concluzii parțiale

- 6.4. Influența durtății apei asupra dezvoltării embrionare la ciprinide
 - 6.4.1. Descrierea experimentului particularități de metodică
 - 6.4.2. Rezultate și discuții
 - 6.4.3. Concluzii parțiale

- 6.5. Influența nitriților din apă asupra dezvoltării embrionare la ciprinide
 - 6.5.1. Descrierea experimentului particularități de metodică
 - 6.5.2. Rezultate și discuții
 - 6.5.3. Concluzii parțiale

- 6.6. Influența nitraților din apă asupra dezvoltării embrionare la ciprinide
 - 6.6.1. Descrierea experimentului particularități de metodică
 - 6.6.2. Rezultate și discuții
 - 6.6.3. Concluzii parțiale

VII. Concluzii generale

Bibliografie

Rezumatul tezei de doctorat

Cercetări privind influența factorilor fizico-chimici ai mediului acvatic asupra embrionilor de Cyprinidae

Cuvinte cheie: dezvoltare embrionară, crap (*Cyprinus carpio*), peștele zebură (*Danio rerio*), lumina, mișcarea apei, pH - ul apei, duritatea apei, nitriți, nitrați.

Introducere

Un ecosistem acvatic reprezintă o unitate formată din viețuitoare și mediul în care trăiesc, respectiv, din biocenoză și biotop. Ambele componente ale sistemului se întrepătrund și se influențează reciproc, conferind sistemului unitate și individualitate.

Prezența poluanților chimici în apă poate duce la consecințe ecologice deosebit de grave prin restructurări ale biocenozelor, alterând integritatea lor, și implicit, a ecosistemelor acvatice.

Ațiunea nocivă a substanțelor chimice poluante se poate manifesta indirect, prin diminuarea oxigenării, modificarea pH-ului și a celorlalte proprietăți fizice și chimice ale apei dar și direct, asupra organismelor ce populează bazinul acvatic respectiv. Unele substanțe ajunse în mediu acvatic pot induce mutații, de obicei dăunătoare, cu consecințe grave pentru generațiile viitoare, cu implicații profunde în stabilitatea ecosistemului.

Omul utilizează produsele mediului acvatic ca sursă de alimente din cele mai vechi timpuri. Acvacultura ca îndeletnicire practică apare mai târziu, remarcându-se ca formă de acvacultură cultura peștilor din familia Cyprinidae (ciprinicultura).

Ciprinidele sunt morfologic, ecologic și comportamental foarte diverse, datorită flexibilității la adaptarea la un număr mare de condiții, totuși, embrionii și larvele tinere au cerințe stricte față de factorii fizico-chimici ai mediului acvatic, stadiile de dezvoltare embrionară la pești fiind extrem de sensibile la acțiunea a variați factori.

Teza de doctorat abordează diferite aspecte legate de influența factorilor fizico-chimici ai mediului acvatic asupra dezvoltării embrionare la ciprinide în vederea obținerii datelor care să releve mediul cel mai optim de dezvoltare, respectiv modificările apărute în momentul abaterilor de la optim. Studiile efectuate ar putea fi considerate de mare valoare teoretică și practică, și având în vedere interdisciplinaritatea temei propuse, unde se intersectează hidrobiologia, piscicultura, biotehnologiile, fiziologia, chimia, ecologia și ecotoxicologia, ele constituie o direcție pe cât de nouă pe atât de interesantă a cercetării de la noi din țară.

Teza de doctorat intitulată „**Cercetări privind influența factorilor fizico-chimici ai mediului acvatic asupra embrionilor de Cyprinidae**” elaborată de doctorand **biol. Mihaela Ostan (căs. Bădiliță)**, sub îndrumarea domnului **Prof. univ. dr. Aurel ARDELEAN**, este divizată în două părți, structurate pe 7 capitole, incluzând concluziile generale cu recomandările și bibliografia abordată. Teza cuprinde **178** pagini din care prima parte (Partea generală– reprezintă 33,15% din lucrare) se întinde pe **59** de pagini, iar partea a doua (Partea experimentală– reprezintă 66,85% din lucrare) însumează **119** de pagini.

Partea I, PARTEA GENERALĂ abordează trei capitole, structurate astfel:

Capitolul I - „Factorii fizico-chimici ai mediului acvatic și influența lor asupra dezvoltării embrionare la ciprinide” abordează în descrierea sa factorii fizici și chimici care controlează biologia dezvoltării speciilor acvatice. După consultarea bibliografică factorii fizici citați sunt: temperatura, lumina, mișcarea apei, iar dintre factorii chimici: oxigenul din apă, bioxidul de carbon, pH-ul apei, salinitatea, duritatea apei și substanțele azotate din apă.

Capitolul II - „Metode și tehnici utilizate în cercetarea factorilor fizico-chimici ai apei” face referire la descrierea principalelor metode de analiză a apelor, prelevarea și conservarea probelor de apă și tehnici folosite pentru determinarea însușirilor fizice și chimice ale apelor.

Capitolul III - „Caracterizarea și particularitățile ciprinidelor” tratează încadrarea sistematică și caracterele generale ale ciprinidelor și, mai pe larg, procesele de dezvoltare embrionară.

Partea a II-a, PARTEA EXPERIMENTALĂ, cuprinde patru capitole, inclusiv concluziile generale și la final bibliografia.

Capitolul IV - „Scopul și obiectivele cercetării”, prezintă scopul lucrării și obiectivele cercetării.

Scopul lucrării este de a evidenția cele mai importante aspecte ale modului în care unii factori fizici și chimici ai mediului acvatic influențează dezvoltarea embrionilor de ciprinide, în condiții experimentale de laborator.

Pentru că influența temperaturii asupra dezvoltării embrionare la pești a fost amplu cercetată, s-au luat în studiu alți doi factori fizici importanți: lumina și mișcarea apei, iar pentru factorii chimici s-au ales: pH-ul, duritatea apei, nitriții și nitrații. Factorii chimici au fost selectați în contextul problemelor actuale de poluare a mediului acvatic și nu numai.

Obiectivele cercetării au urmărit:

- observarea aspectului morfologic al embrionilor (pentru a putea determina eventualele schimbări de aspect)
- stabilirea stadiului embrionar în care se află embrionii la un moment dat
- durata incubației (posibila asincronie a dezvoltării embrionare)
- rata de ecloziune (aceasta fiind procentul de larve tinere din totalul de ouă incubate).

Capitolul V - “Materiale și metode de cercetare” prezintă materialul și condițiile de experimentare, schema de organizare a experimentelor, metode de determinare și prelucrare a rezultatelor.

Materialul biologic luat în studiu a fost constituit din icre embrionate obținute de la două specii de ciprinide: peștele zebră (*Danio rerio*) și crapul comun (*Cyprinus carpio*).

Cultivarea icrelor s-a efectuat, după caz, în cutiute Nunk de 80 ml sau în cutiute Petri de 8x15 mm, în care s-au introdus 30 ml mediu și 10 icre fecundate, asigurându-se 1 icră/ 3 ml mediu.

În cadrul acestei lucrări s-au efectuat un număr de 6 experimente:

- Experimentul 1 - Influența luminii asupra dezvoltării embrionare la ciprinide;
- Experimentul 2 - Influența mișcării apei asupra dezvoltării embrionare la ciprinide;
- Experimentul 3 - Influența pH-ului asupra dezvoltării embrionare la ciprinide;
- Experimentul 4 - Influența durității asupra dezvoltării embrionare la ciprinide;
- Experimentul 5 - Influența nitriților asupra dezvoltării embrionare la ciprinide;
- Experimentul 6 - Influența nitraților asupra dezvoltării embrionare la ciprinide;

Diferit pentru fiecare specie, temperatura apei s-a menținut constantă, deoarece aceasta joacă rol de regulator al vitezei proceselor embriogenetice.

Monitorizarea a cuprins toate perioadele de dezvoltare a embrionilor, observațiile făcându-se la lupa NIKON, la stereomicroscopul OPTIKA sau la microscopul de laborator OLYMPUS CX41 dotat cu o cameră foto digitală tip CAMEDIA, pentru achiziția digitală a imaginilor statice la rezoluție de 8.0 mil Pixeli.

La fiecare citire s-a determinat mortalitatea și stadiul de dezvoltare în care au ajuns embrionii, apoi la finalul fiecărui experiment s-a calculat durata de incubație și rata de ecloziune.

În prelucrarea statistică a datelor s-au utilizat teste neparametrice (testul χ^2 de corespondență „goodness-of-fit”).

Capitolul VI - „Rezultate și discuții” prezintă, rând pe rând, toate informațiile noi obținute în urma experimentărilor privind influența luminii, mișcării apei, pH-ului, durității apei, nitriților și nitraților dizolvați în apă asupra dezvoltării embrionare la ciprinidele luate în studiu. La fiecare dintre factorii testați se păstrează același protocol de lucru, sunt prezentate particularitățile metodologice, datele obținute fiind înscrise în tabele și figuri, se descriu rezultatele, iar la finalul fiecărui subcapitol se redau concluziile specifice factorului analizat.

Pentru **primul experiment** privind **influența luminii** asupra embrionilor de ciprinide au fost pregătite trei variante experimentale:

- varianta 1 (V1) reprezintă proba martor la care intensitatea luminii a variat astfel: la ora 8 a.m. 10 lucși, la ora 11 a.m. 18 lucși; la ora 14 p.m. 20 lucși; la ora 18 p.m. 13 lucși; la ora 20 p.m. 5 lucși (lumină naturală);

- varianta 2 (V2) reprezintă proba care a fost supusă iluminării continue. Iluminarea s-a realizat cu un neon de 40 watt, intensitatea luminii fiind constantă de 36 lucși/ 24ore;

- varianta 3 (V3) reprezintă proba care a fost ținută în permanență la întuneric, pe întreaga perioadă de incubație.

Pentru fiecare variantă s-au realizat 3 repetiții, astfel că în total, în cadrul fiecărei variante a experimentului, au fost studiați 30 de embrioni, rezultând deci per total 90 embrioni de *Danio rerio* și 90 de embrioni de *Cyprinus carpio*.

Prima serie a experimentului 1, cu icre embrionate de pește zebra, s-a desfășurat pe o perioadă de 57 ore, iar a doua serie, cu icre embrionate de crap, pe o perioadă de 144 de ore.

La 10 ore de la fecundație, în toate variantele, cei mai mulți embrioni de *Danio rerio* se găsesc în stadiul de mugurele cozii (30-53,3%), iar cel mai avansat stadiu de dezvoltare s-a întâlnit în varianta martor (V1), stadiul de 6 somite.

La 13 ore de la debutul experimentului s-a constatat o creștere a numărului de embrioni morți, de până la 40% în varianta în care embrionii au fost ținuți la întuneric și 53,3% în varianta cu lumină intensă. Stadiile de dezvoltare sunt foarte diferențiate în cele trei variante, cel mai avansat întâlnindu-se în varianta martor (V1), stadiul de 14 somite.

După 24 de ore de la fecundație, procentul mortalității este același, în varianta martor majoritatea embrionilor (83,3%) au ajuns în stadiul de faringulă, iar în celelalte două variante se constată o mică întârziere, embrionii ajungând aproape de sfârșitul perioadei de segmentare (20 somite).

La 48 de ore de fecundație, majoritatea embrionilor se află în stadiul de ecloziune (33,3-60%), iar în primele două variante embrionii au trecut de faza de ecloziune și se află în perioada larvei tinere.

La 57 de ore de la fecundație, aceasta fiind de fapt ultima citire care s-a efectuat în cadrul acestei serii experimentale, s-a constatat că rata mortalității în V2 și V3 a fost ridicată (40-56,7%), față de martor (16,7%).

La *Cyprinus carpio*, la 10 de ore de fecundație, majoritatea embrionilor se află în perioada de gastrulă (90%, în toate variantele), iar în prima variantă 76,7% din embrioni sunt cei mai avansați în acest moment, fiind în stadiul de epibolie 70%. În nici o variantă nu sunt embrioni nedevelopați sau morți.

La 24 ore de la fecundație, embrionii se găsesc în perioada de segmentare, în V3 observându-se o mică întârziere 13,7% dintre ei găsindu-se în stadii mai incipiente ale segmentării, la 48 de ore de incubație sunt în perioada de faringulă cu ochii și corpul pigmentat (100%), iar la 60 de ore au intrat în perioada de ecloziune.

După 75 ore de la fecundație embrionii au eclozat, sunt deja larve tinere. În varianta V2 cu lumină continuă toți embrionii au eclozat (100%), în V1 aproape 70%, iar în V3 - 80%.

La 83 de ore de la fecundație avem 100% larve tinere și în V1, iar în V3 sunt 10% dintre embrionii încă în perioada de ecloziune. După 5 zile de incubație, la 120 ore de la fecundație, acești embrionii nu sunt morți, pentru că se poate observa circulația sanguină.

La 144 de ore de la fecundație, aceasta fiind de fapt ultima citire care s-a efectuat în cadrul seriei 2 a acestui experiment, s-a constatat că rata mortalității în V3 a fost de 10%, deci embrionii care au stagnat peste 60 de ore în perioada de ecloziune, până la urmă nu au eclozat și au murit în interiorul icrei.

La peștele zebură, începând cu 5 ore de la fecundație și până la ecloziune, s-a observat o diferențiere a dezvoltării între cele trei variante experimentale.

La crap asincronia dezvoltării între variante a apărut târziu la 60-65 de ore după fecundație, la sfârșitul perioadei embrionare, când pentru dezvoltarea embrionilor ținută la întuneric, perioada de ecloziune s-a înregistrat ca cea mai sensibilă perioadă.

Din punct de vedere statistic, experimentul privind influența luminii asupra embrionilor de *Danio rerio* a arătat diferențe foarte semnificative ($p < 0,001$) între varianta martor și varianta cu lumină continuă, iar între varianta martor și varianta cu întuneric diferențe semnificative ($p = 0,001-0,01$). La *Cyprinus carpio* nu există diferențe între varianta martor și celelalte două variante ($p > 0,05$).

Analizând statistic și comparând rezultatele privind rata de ecloziune sub influența luminii la cele două specii s-a constatat că între variantele martor nu există diferențe ($p > 0,05$), în schimb la celelalte două variante există diferențe semnificative ($p = 0,001-0,01$).

Cel mai potrivit mediu pentru susținerea, creșterea și dezvoltarea embrionilor de *Danio rerio* este cel cu lumină naturală, iar embrionii de *Cyprinus carpio* suportă foarte bine și lumina continuă.

În ceea ce privește **experimentul 2**, pentru a monitoriza **efectul pe care îl are mișcarea apei** asupra embrionilor de ciprinide au fost utilizate două variante experimentale din care:

- varianta martor (V1) menținută în condiții normale de dezvoltare;
- varianta a doua (V2) supusă procesului de barbotare continuă.

Pentru fiecare variantă s-au realizat 3 repetiții, astfel că în total, în cadrul fiecărei variante a experimentului, au fost studiați 30 de embrioni, rezultând deci per total 60 embrioni de *Danio rerio* și 60 de embrioni de *Cyprinus carpio*.

Prima serie a experimentului 2 s-a desfășurat pe o perioadă de 55 ore, iar a doua serie pe o perioadă de 83 de ore.

La *Danio rerio*, după 10 ore de la fecundație, în varianta martor a crescut rata mortalității, 53,3% din embrionii viabili se găsesc la sfârșitul perioadei de gastrulă, iar 30% dintre embrioni se găsesc la începutul perioadei de segmentare. În V2 embrionii cei mai avansați în dezvoltare se găsesc abia la sfârșitul perioadei de gastrulă, în stadiul de scut (20%), ceilalți 13,3% fiind în perioada de blastulă.

La 24 de ore de la fecundație s-a putut observa diferența mare între ritmul de dezvoltare a embrionilor din cele două variante, gradul mai avansat de dezvoltare fiind în varianta martor (primul stadiu al perioadei de faringulă), cei 23,3% embrioni viabili din V2 fiind de abia la începutul perioadei de segmentare.

La 48 ore de la debutul acestei serii experimentale, embrionii viabili din V2 sunt tot în perioada de faringulă, dar mai avansați, având ochii pigmențați. În varianta martor au apărut primele larve (30%).

La 55 de ore după fecundație, aceasta fiind ultima citire din cadrul seriei 1 a acestei serii experimentale, în varianta cu barbotarea continuă a apei toți embrionii au murit, rata de ecloziune fiind de 0%.

La *Cyprinus carpio*, după 10 ore de la fecundație, în varianta V2 sunt 20% embrioni morți, restul de 80% fiind în perioada de gastrulă. În prima variantă există și embrioni în perioada de blastulă (10%).

La 24 ore de incubație embrionii au trecut în următoarea perioadă a dezvoltării embrionare, segmentarea, stadiile de 16-18 somite (80-100%).

La 48 de ore de la fecundație toți embrionii primei variante sunt la sfârșitul perioadei de faringulă cu corpul și ochii pigmențați (100%), iar în V2 se observă o întârziere a dezvoltării embrionilor, 30% găsindu-se de abia la sfârșitul perioadei de segmentare, iar 50% sunt în perioada de faringulă, având doar ochii pigmențați.

La 77 de ore toți embrionii viabili din V2 au eclozat (80%), iar în V1 doar 80% din 100% au eclozat, iar la finalul seriei 2 a experimentului, de abia la 83 de ore după fecundație au eclozat toți embrionii din varianta martor (100%).

La peștele zebră asincronia dezvoltării între cele două variante s-a observat încă de la 7 ore după fecundație și în ceea ce privește creșterea mortalității au existat două momente critice: perioada de clivaj → începutul perioadei de blastulă și al doilea în perioada de ecloziune.

La crap ușoara diferențiere a dezvoltării embrionare între cele două variante, în favoarea variantei martor, a avut loc doar pe durata a 70 de ore de incubație, apoi în perioada finală a dezvoltării, perioada de ecloziune, această diferențiere s-a inversat în favoarea variantei a doua.

Analiza statistică arată diferențe foarte semnificative ($p < 0,001$) între variante la *Danio rerio*, iar la *Cyprinus carpio* nu sunt diferențe semnificative ($p = 0,01-0,05$).

Comparația statistică între seriile experimentale arată că între variantele martor nu sunt diferențe ($p > 0,05$), dar între variantele V2 sunt diferențe foarte semnificative ($p < 0,001$).

În **experimentul 3**, în care am determinat **influența pH-ului** asupra embrionilor de ciprinide, am utilizat medii cu diferite reacții chimice. Pentru obținerea acestor medii cu pH diferit s-a utilizat apa purificată și HCl pentru reducerea pH-ului, respectiv NaOH pentru creșterea pH-ului. Determinarea valorii pH-ului s-a făcut cu pH-metrul electronic cu sondă. S-au realizat 6 variante experimentale, dintre care V4 a fost martorul cu un pH de 7. Celelalte variante au fost cu pH 5,5 (V1), pH 6 (V2), pH 6,5 (V3), pH 7,5 (V5), pH 8 (V6).

Pentru fiecare variantă s-au realizat 3 repetiții, astfel că în total, în cadrul fiecărei variante a experimentului, au fost studiați 30 de embrioni, rezultând deci per total 180 embrioni de *Danio rerio* și 180 de embrioni de *Cyprinus carpio*.

Prima serie a experimentului 3 cu icre embrionate de pește zebră s-a desfășurat pe o perioadă de 53 ore, iar a doua serie cu icre embrionate de crap, pe o perioadă de 96 de ore.

La *Danio rerio*, la 10 ore de la fecundație, în toate variantele cei mai mulți embrioni se găsesc în stadiul de apariție a mugurelui cozii (46,7-70%). Rata de mortalitate cea mai ridicată, de 50%, se observă în V1, varianta cu pH-ul cel mai acid din experimentul nostru. Stadiul cel mai avansat de dezvoltare, apariția somitelor din perioada de segmentare, se găsește la embrionii din V4 în proporție de 33,3%, V5 - 16,7% și V6 - 10%.

La 24 de ore embrionii din toate variantele au trecut într-o nouă perioadă de dezvoltare, cea de faringulă (40-76,6%). Deocamdată, cel mai nefavorabil mediu pare să fie cel cu pH=5,5 unde au supraviețuit doar 40% dintre embrioni.

La 48 de ore de la fecundație, majoritatea embrionilor sunt în perioada de ecloziune. Au apărut și primele larve 10-33,3%, excepție făcând varianta V3. Procentul mortalității este neschimbat de la citirea de 24 ore.

După 53 de ore de monitorizare, la finalul acestei serii a experimentului 3 cu icre de *Danio rerio*, putem constata că mortalitatea cea mai ridicată a fost în V1 70%. Doar între V4 și V3 nu sunt diferențe din punct de vedere statistic ($p > 0,05$). Între V4 și V1 sunt diferențe foarte semnificative ($p < 0,001$), între V4 și V2, V5, respectiv V6 sunt diferențe nesemnificative ($p = 0,01-0,05$).

După 10 ore de la fecundație embrionii de *Cyprinus carpio* se găsesc în perioada de gastrulă, excepție 33,3% din V3 care sunt la sfârșitul perioadei de blastulă. În acest moment mortalitatea este 0% în toate variantele.

La 24 de ore după fecundație mortalitatea apare deja în proporție de 20% în V1 și V2, respectiv 16,7% în V5. Majoritatea embrionilor viabili sunt în diferite stadii ale perioadei de segmentare. Stadiul de dezvoltare cel mai avansat în acest moment se poate observa la pH=6,5 (V3), unde toți embrionii au aproximativ 20 de somite.

După 48 ore de incubatie majoritatea embrionilor sunt la sfârșitul perioadei de faringulă (50-100%). Rata mortalității este de 30% în V1 și V5, respectiv 20% în V2.

După alte 12 ore de monitorizare toți embrionii viabili (70-100%) au trecut în perioada de ecloziune, iar la 72 ore de la fecundație au apărut larvele tinere (33,3-100%).

La 96 ore după fecundație, aceasta fiind ultima citire din cadrul seriei 2 a experimentului 3 cu icre embrionate de *Cyprinus carpio*, au eclozat și embrionii viabili din V1. Conform analizei statistice nu există diferențe între V4 și V1, V2, V3, V5 ($p>0,05$), dar există diferențe foarte semnificative între V4 și V6 ($p<0,001$).

Analizând statistic și comparativ cele două specii în ceea ce privește rata de ecloziune s-au calculat diferențe foarte semnificative ($p<0,001$) între variantele V1 și variantele V6, între variantele V2 ale ambelor serii sunt diferențe semnificative ($p=0,001-0,01$), iar între variantele V3, V4, V5 nu sunt diferențe ($p>0,05$).

Studiul influenței pH-ului asupra dezvoltării embrionare la ciprinide relevă faptul că abaterile de la optim pot duce la modificări ireversibile în interiorul icrei, uneori chiar letale, unele stadii fiind mai sensibile.

În ceea ce privește **experimentul 4**, în care am determinat **influența durității** asupra embrionilor de ciprinide am utilizat medii cu diferite grade de duritate. Pentru obținerea acestora s-a folosit carbonatul de calciu anhidru, în diferite cantități, obținându-se 5°dH – apă moale (V2); 10°dH – apă mijlociu de dură (V3); 15°dH – apă moderat de dură (V4); și 20°dH - apă dură (V5); Varianta martor (V1) a fost cu apă foarte moale.

Pentru fiecare variantă s-au realizat 3 repetiții, astfel că în total, în cadrul fiecărei variante a experimentului, au fost studiați 30 de embrioni, rezultând deci per total 150 embrioni de *Danio rerio* și 150 de embrioni de *Cyprinus carpio*.

Prima serie a experimentului 4 s-a desfășurat pe o perioadă de 85 ore, iar a doua serie pe o perioadă de 144 de ore.

La 10 ore după fecundație se constată o creștere a procentului de embrioni morți, cu excepția variantei martor. Acest procent este de 26,7% - V2, 10% - V3, 50% - V4, 30% - V5. Toți embrionii viabili se găsesc la sfârșitul perioadei de gastrulă, în epibolie 90% (20-63,3%) sau chiar li se poate observa mugurele cozii V1 – 50%, cei mai avansați.

Embrionii cu blastodiscul nediferențiat au fost observați pe o perioadă de 10 ore, această stare de „stand-by” fiind o situație nemaiîntâlnită de noi pe parcursul experimentelor.

Peste încă alte 3 ore de monitorizare embrionii cu blastodisc nediferențiat i-am declarat morți, astfel încât procentele mortalității au crescut la 40-80%, cu excepția variantei martor, unde procentul este neschimbat 16,7%.

După 24 de ore de incubație embrionii viabili din toate cele 5 variante sunt în perioada de segmentare, cu stadii de la 16→20 somite. Mortalitatea a rămas neschimbată pe parcursul ultimelor 10 ore de observare în toate variantele (40-80%).

La 48 ore de la fecundație rata mortalității este aceeași ca acum 24 de ore, embrionii viabili trec în perioada de ecloziune (V2 și V3 - 60%, V4 – 26,7% și V5 - 20%). În V4 au apărut primele larve (6,7%).

La 76 ore după fecundație, se poate observa creșterea procentului de larve (30% în V2 și V5, 33,3% în V4, 60% varianta martor). În cea de-a treia variantă nu a eclozat nici un embrion.

Peste alte 3 ore, la 79 ore de la fecundație, monitorizarea s-a încheiat pentru V1, V3 și V4, unde rata de ecloziune este de 83,3%, 60%, respectiv 33,3%. La 82 ore de la fecundație și în V2 s-a calculat rata de ecloziune de 50%.

După 85 ore de la fecundație, aceasta fiind de fapt și ultima citire care s-a efectuat în cadrul seriei experimentale s-a constatat că rata mortalității a fost de 80% în varianta cu duritatea de 20° dH, mortalitate intervenită de la 13 ore după fecundație, în varianta cu duritatea de 15° dH, pierderile au fost de 66,7%, în V2 (5° dH) - 50%, în V3 (10° dH) - 40%, iar în varianta martor de 16,7%.

Embrionii de *Cyprinus carpio*, după 10 ore de la fecundație, se găsesc în diferite stadii ale perioadei de gastrulă. Cei mai avansați în dezvoltare sunt 10% din varianta martor în stadiul de epibolie 70%.

La 24 de ore de incubație, rata mortalității este tot de 0% în toate variantele, toți embrionii sunt în perioada de segmentare, cu mențiunea că în V3 și V5 sunt puțin mai întârziți 50%, respectiv 90% fiind în stadiul incipient de apariție a somitelor.

La 48 de ore după fecundație în V1, V2 și V4 toți embrionii se găsesc în perioada de faringulă cu ochii și corpul pigmentat. În V3 10% au murit, ceilalți 70% sunt încă în perioada de segmentare, iar 20% sunt la începutul perioadei de faringulă.

După 72 de ore de incubație au apărut larvele tinere, 33,3% în V1, 40% în V2 și V3, 60% în V4. La 78 de ore de la fecundație larvele din V4 au murit în totalitate (100%). Larvele nu au mai fost apărute de corion și în contact direct cu acest mediu au murit, deci, luând în calcul bariera formată de corion, larvele pot fi considerate mai sensibile decât embrionii.

După 83 de ore de monitorizare în V1 procentul ecloziunii a atins cifra de 100%, iar în V3 încă mai există embrioni neclozați (6,7%). La 96 de ore procentul scade la 3,3%.

La finalul seriei experimentale, după 144 de ore de monitorizare embrionul din V3 aflat în perioada de ecloziune peste 60 de ore a murit în interiorul icrei.

Cercetările privind influența durtății apei asupra embrionilor de ciprinide au scos în evidență faptul că acest element poate induce ritmuri diferite de creștere și dezvoltare a embrionilor în timpul perioadei de incubație, dar în ce sens decurg aceste schimbări depinde de specie.

La pește zebra, în urma analizei statistice, între varianta martor și V3 există diferențe semnificative ($p=0,001-0,01$), iar între varianta martor și celelalte trei variante sunt diferențe foarte semnificative ($p<0,001$). La crap între V1 și V4, respectiv V5 există diferențe foarte semnificative ($p<0,001$), iar între V1 și V2, respectiv V3 nu există diferențe ($p >0,05$).

Analiza statistică comparativă a celor două specii, arată că între variantele V1, V3 și V5 ale ambelor serii experimentale nu sunt diferențe ($p >0,05$), dar între variantele V2, respectiv V4 sunt diferențe foarte semnificative ($p<0,001$).

Cel mai potrivit mediu pentru susținerea, creșterea și dezvoltarea embrionilor de ciprinide luate în studiu este cel cu o durtate de 0-10°dH.

În **experimentul 5**, în care am determinat **influența nitriților** asupra embrionilor de ciprinide am utilizat medii cu soluție de nitrit de sodiu în diferite concentrații. Pentru cercetările efectuate pe icre embrionate de pește zebra concentrațiile au fost de: 0,1 mg/l (V2); 0,2 mg/l (V3); 0,3 mg/l (V4); 0,4 mg/l (V5); 0,5 mg/l (V6). Pentru cercetările efectuate pe embrioni de crap concentrațiile au fost mărite de 10 ori: 1 mg/l (V2); 2 mg/l (V3); 3 mg/l (V4); 4 mg/l (V5); 5 mg/l (V6). Această diferență se datorează schimbării în 2006 a legislației privind calitatea apei. Până în 2006 din punct de vedere al calității apei de categoria a II-a trebuiau să aibă maxim 3 NO₂ mg/l conform STAS 4706-88, iar apoi conform OM 161-2006 această concentrație a fost modificată la maxim 0,03 NO₂ mg/l.

Am dorit să observăm dacă, la *Cyprinus carpio* față de *Danio rerio*, vor apărea schimbări semnificative în ceea ce privește rezultatele și într-adevăr acestea s-au modificat drastic.

Pentru fiecare variantă s-au realizat 3 repetiții, astfel că în total, în cadrul fiecărei variante a experimentului, au fost studiați 30 de embrioni, rezultând deci per total 180 embrioni de *Danio rerio* și 180 de embrioni de *Cyprinus carpio*.

Prima serie a experimentului 5 s-a desfășurat pe o perioadă de 145 ore, iar a doua serie pe o perioadă de 85 de ore.

La 11 ore după fecundație, procentul mortalității a crescut treptat în toate variantele, în V1 este de 16,7%, în V6 - 23,3%, în V4 și V5 - 33,3%, în V2 - 36,7%, iar în V3 - 80%. Toți embrionii viabili sunt în perioada de gastrulă.

La 28 de ore 16,7% din embrionii variantei V4 au trecut în primul stadiu al perioadei de faringulă, fiind cei mai avansați în acest moment, iar în celelalte variante embrionii sunt încă în perioada de segmentare cu 25 somite, ca stadiu predominant.

La 49 de ore de incubație, embrionii sunt în perioada de faringulă cu ochii și corpul pigmentat.

După 76 ore de la debutul acestui experiment, rata de ecloziune în V1 este de 60%, iar în V6 de 10%. În celelalte 3 variante cu embrioni viabili încă nu s-a declanșat ecloziunea.

La finalul seriei experimentale remarcăm că doar în V1, V2, V4, V6 a avut loc ecloziunea embrionilor. Statistic între V1 și V2, sunt diferențe nesemnificative ($p=0,01-0,05$), iar între V1 și V3, V4, V5, V6 sunt diferențe foarte semnificative ($p<0,001$). În ultimele 3 variante embrionii au stat în perioada de ecloziune aproape 4 zile (90 ore) ca în final, după 145 ore de incubație, să moară în interiorul icrelor. Constatăm că prelungirea duratei de incubație, peste limite normale, influențează rata de ecloziune.

La crap încă din primele ore ale observațiilor în V3, V4, V5 și V6 s-a înregistrat o mortalitate foarte ridicată, astfel încât la 10 ore după fecundație, în aceste variante mortalitatea a atins cifra maximă de 100%. În V2 40% dintre embrioni sunt perioada de blastulă, iar ceilalți 60% sunt în perioada de gastrulă, dar la următoarea citire, care s-a efectuat după 15 ore, toți embrionii erau morți.

Ca atare, din punct de vedere statistic, la finalul seriei 2 a experimentului 5, între varianta martor și celelalte 5 variante sunt diferențe foarte semnificative ($p<0,001$).

Creșterea și dezvoltarea embrionilor de ciprinide este influențată direct, unele stadii embrionare fiind însă mai sensibile. Concentrații ale nitriților $\geq 0,1$ NO₂ mg/l determină o întârziere a diferențierii discului embrionar.

Cel mai potrivit mediu pentru susținerea, creșterea și dezvoltarea embrionilor de *Danio rerio* este cel cu o cantitate foarte mică de nitriți ($\leq 0,1$ mg NO₂/l), deoarece la aceste concentrații rata de ecloziune a fost de 63,3-83,3%.

În **experimentul 6**, în care am determinat **influența nitraților** asupra embrionilor de ciprinide am utilizat medii cu soluție de nitrat de amoniu în diferite concentrații: 50 mgNO₃/l (V2); 100 mg NO₃/l (V3); 150 mg NO₃/l (V4); 200 mg NO₃/l (V5); 250 mg NO₃/l (V6).

Pentru fiecare variantă s-au realizat 3 repetiții, astfel că în total, în cadrul fiecărei variante a experimentului, au fost studiați 30 de embrioni, rezultând deci per total 180 embrioni de *Danio rerio* și 180 de embrioni de *Cyprinus carpio*.

Prima serie a experimentului 6 s-a desfășurat pe o perioadă de 126 ore, iar a doua serie pe o perioadă de 96 de ore.

La peștele zebură, la 8 ore după fecundație toți embrionii viabili se găsesc în diferite stadii de dezvoltare ale perioadei de gastrulă. Cel mai avansat stadiu de dezvoltare în acest moment este atins de embrionii din V2 și V3, 6,6-30% dintre aceștia fiind în stadiul de mugure al cozii. Mortalitatea este de 10-20%. Doar în V1 și V3 este de 0%, deocamdată. În V5 s-au observat embrioni cu vezicula vitelină obturată, fapt care a determinat expulzarea materialului nutritiv în spațiul subcorial. La 10 ore după fecundație embrionii se găsesc tot în perioada de gastrulă.

La 25 de ore de incubație embrionii au trecut în următoarea etapă a dezvoltării, perioada de segmentare (stadii de 16→25 somite). Mortalitatea a crescut la 30% în V5 și de la 0→10% în varianta martor, iar în V3 se menține procentul de 0%.

La 33 de ore incubație embrionii au trecut în următoarea etapă a dezvoltării, perioada de faringulă (30-100%). Mortalitatea a crescut cu încă 10% în V4 și V5. În ultimele trei variante mai sunt embrioni în segmentare, într-un procent destul de mare, 30%-90%. Tot în aceste variante se observă din nou embrioni cu probleme în dezvoltare, vezicula vitelină fiind spartă sau prezentând vezicule cu lichid pe vitelus.

Conform datelor din literatura de specialitate nitrații acționează printr-un mecanism asemănător cu al clorurii de sodiu, adică prin modificarea presiunii osmotice. Ca atare, putem considera că, aceste modificări morfologice în interiorul icrelor se datorează exosmozei, determinată de concentrația mare a nitraților din mediul variantelor V4, V5 și V6.

După 48 de ore de la fecundație toți embrionii viabili sunt la sfârșitul perioadei de faringulă a dezvoltării embrionare. Doar în V4 16,7% sunt puțin mai întârziați având doar ochii pigmentați. În V4 și V5 toți embrionii sunt imobili și au vitelusul spart. Mortalitatea a crescut în ultimele trei variante, fiind de 23,3% în V4, 60% în V5, 80% în V6.

La 72 ore, în V3 larvele erau moarte, iar în V2 au supraviețuit 10%. Am constatat că la o concentrație de nitrați de 50-100 mg NO_3/l larvele tinere au murit la scurt timp după ce au avut contact cu mediul extern.

La finalul acestei serii a experimentului, după 126 de ore de monitorizare au eclozat, în sfârșit, primele larve în V2, iar situația este foarte clară, din punct de vedere statistic, între V1 și restul variantelor sunt diferențe foarte semnificative ($p < 0,001$). Mortalitatea este de 100% în V3, V4, V5 și V6, iar în V2 de 93,3%.

La crap după 10 ore de la fecundație majoritatea embrionilor se găsesc în perioada de gastrulă a dezvoltării embrionare. Doar în varianta V4 sunt deja 66,7% embrioni nedezvoltați. În V1 se regăsesc embrionii cei mai avansați în dezvoltare, un procent de 10% în stadiul de epibolie 70% a perioadei de gastrulă.

La 25 de ore după fecundației rata mortalității a crescut simțitor în ultimele patru variante, procentul fiind de 20% în V3, 66,7% în V4, 93,3% în V5 și 80% în V6. Restul embrionilor se află în diferite stadii ale perioadei de segmentare. În primele două variante nu sunt embrioni nedezvoltați, iar în varianta martor, embrionii sunt cei mai avansați, 100% în stadiul de 20 somite.

La 48 de ore după fecundației embrionii viabili din V3 și V4 sunt întârziați în dezvoltare găsiindu-se tot în segmentare, față de V1 și V2 unde embrionii sunt în perioada de faringulă, în V1 cei mai avansați cu ochii și corpul pigmentat.

La 75 de ore după fecundație au apărut larvele tinere în V1 - 66,7%, în V2 - 80% și în V3 - 6,7%, totuși în V3 rata mortalității a mai crescut puțin, iar embrionii viabili sunt stagnați în aceleași stadii ca la 60 de ore după fecundație. La fel și în varianta V4.

La 85 de ore după fecundație rata mortalității ajunge la 100% și în V3, pe când în V1 avem 100% rata de ecloziune.

La finalul seriei 2 a experimentului după 96 de ore de monitorizare și în V2 avem 100% rata de ecloziune. Statistic nu sunt diferențe între varianta martor și V2 ($p > 0,05$), dar între aceasta și celelalte patru variante sunt diferențe foarte semnificative ($p < 0,001$).

Comparând cele două specii studiate statistic s-a observat că doar în V2, la o concentrație de 50 mg NO_3/l , sunt diferențe foarte semnificative, deci embrionii de pește zebra sunt mai sensibili la nitrați, inclusiv la concentrații aflate în limita admisă. Între celelalte 5 variante nu sunt diferențe din punct de vedere statistic ($p > 0,05$).

Cercetările privind influența concentrației de nitrați asupra embrionilor de ciprinide au arătat că modificările și creșterea cantitativă a acestora, poate duce la modificări ireversibile în interiorul icrei, rezultând moartea embrionară.

Capitolul VII - CONCLUZII GENERALE

- La peștele zebra, durata medie de incubației în varianta martor a primului experiment a fost de 50 ore, iar rata de ecloziune de 83,3%. În toate variantele ecloziunea a început aproximativ în același timp, cu mențiunea că, cei din varianta cu lumină continuă au fost ușor mai întârziați (52 ore), aici existând și rata de ecloziune cea mai mică 43,3%. La întuneric rata de ecloziune a fost de 60%, iar media duratei de incubație a fost de 53 de ore.

- La crap, media duratei de incubație în varianta martor a fost de 77 ore, la întuneric durata perioadei de ecloziune s-a dublat pentru 10% dintre embrioni, dar cu efecte letale asupra lor, deci succesul de eclozare depinde de durata de incubație. La lumină continuă embrionii au eclozat mai repede decât la lumina naturală (73 ore). În aceste două variante rata de ecloziune a fost de 100%, iar în cea de-a treia variantă a fost de 90%.
- Momentul critic privind mortalitatea embrionilor de pește zebură a fost perioada de blastulă → perioada de gastrulă. S-a constatat că embrionii de pește zebură sunt mult mai sensibili la lumină continuă, respectiv la întuneric decât cei de crap, care la lumină intensă au avut un ritm de dezvoltare mai accelerat.
- Pentru cel de-al 2-lea experiment, la peștele zebură în V2 ecloziunea nu a avut loc, în varianta martor media duratei de incubație a fost de 50 ore, iar la crap s-a constatat că mișcarea activă a apei a favorizat ecloziunea, în această variantă embrionii viabili eclozând cu 3 ore mai repede decât cei din varianta martor, 76 de ore.
- La crap barbotarea apei nu a redus viteza de dezvoltare a embrionilor, rata de ecloziune fiind de 80%, în schimb la peștele zebură aceasta a fost de 0%, mortalitatea fiind ridicată încă din primele ore după fecundație (66,7% la 5 ore după fecundație), ceea ce denotă că un mediu cu mișcare a apei mai activă nu este tolerat de embrionii acestei specii.
- Momentul critic comun ambelor specii studiate, în ceea ce privește influența mișcării intense a apei, a fost perioada de clivaj → începutul perioadei de blastulă.
- Durata de incubație a embrionilor de pește zebură, în variantele martor ale experimentului 3, a fost în medie de 46 de ore, iar a embrionilor de crap de 80 de ore.
- Cel mai favorabil mediu de incubație pentru embrionii de *Danio rerio* este mediul cu pH de 7, deoarece în această variantă s-a înregistrat cea mai mare de 76,7%. Cea mai mică rată de ecloziune s-a calculat în mediul cu un pH de 5,5 (30%), ceea ce subliniază faptul că un asemenea mediu este impropriu dezvoltării embrionare. Pentru embrionii de *Cyprinus carpio* cel mai favorabil mediu de incubație este mediul cu pH de 6,5-7, deoarece în aceste variante rata ecloziunii a fost de 100%.
- Comparativ cu embrionii de crap cei de pește zebură sunt mult mai sensibili la pH acid (5,5-6), dar în schimb embrionii de crap nu au supraviețuit la pH=8, unde rata mortalității a fost de 100%, procent atins în perioada de segmentare, acesta fiind momentul critic pentru această specie.
- La experimentul 4, media duratei de incubație la *Danio rerio* a fost de 72 ore, iar la crap de 75 ore, dar din nou la specia *Cyprinus carpio* am constatat că prelungirea perioadei de incubație peste limita normală, duce la moarte embrionară.

- La peștele zebură rata de ecloziune a fost de 50-83,3% pentru variantele cu apă moale → apă cu duritate medie, iar la crap de 83,3-100%. Pentru apa dură la crap rata de ecloziune a fost de 0%, iar pentru peștele zebură de 20-33,3%.
- Prima perioadă de dezvoltare embrionară este foarte sensibilă la grade de duritate mai ridicate, fapt recunoscut prin nediferențierea embrionilor și implicit moartea lor precoce, dar pe parcursul dezvoltării s-au mai notat momente critice, la *Danio rerio* perioada de blastulă → perioada de gastrulă.
- În apa cu duritate moderat de mare larvele pot fi considerate mai sensibile decât embrionii, acestea nesupraviețuind după ecloziune.
- Pentru cel de-al 5-lea experiment, media duratei de incubație la peștele zebură în varianta martor a fost de 67 ore, în variantele cu $\geq 0,1$ NO₂ mg/l ajungând la 88 de ore, iar rata de ecloziune a fost de 63,3-83,3%.
- Momentul critic al mortalității la peștele zebură a fost perioada de gastrulă, pentru concentrația de 0,2 NO₂ mg/l, respectiv perioada de ecloziune la concentrații de 0,2 - 0,5 NO₂ mg/l.
- Mortalitatea embrionilor de crap la concentrații ale nitriților cu valori ≥ 1 mg NO₂/l a fost de 100%, încă din stadiile incipiente ale dezvoltării, totuși la concentrația de 1 NO₂ mg/l supraviețuirea embrionară a fost observată până în perioada de gastrulă.
- La ultimul experiment 6, la peștele zebură media duratei de incubație în varianta martor a fost de 78 ore, în V2 de 66 ore și în V3 60 de ore. Mărind timpul de expunere, după ecloziune, larvele tinere au murit la peste 50mg NO₃/l, iar la această valoare s-a observat prelungirea perioadei de ecloziune de trei ori, ca durată. La crap media duratei de incubație în varianta martor a fost de 75 ore, în V2 de 82 ore și în V3 75 de ore.
- La *Danio rerio* rata de ecloziune este de 0% în V4, V5 și V6, în V3 de 20%, în V2 de 16,7%, iar în varianta martor de 90%, iar la *Cyprinus carpio* în V1 și V2 avem 100% rata de ecloziune, în V3 6,7%, în celelalte variante 0%.
- Nitrați din apă influențează embrionii de pește zebură când sunt în concentrație de peste 50 mg/l, lucru demonstrat de viteza de dezvoltare și mortalitatea ridicată. La astfel de concentrații dezvoltarea embrionară a fost sensibilizată în stadiile inițiale, dar mai ales după segmentare, în perioada de faringulă.
- Cercetările cu privire la influența luminii, mișcării apei, pH-ului, durității apei, a nitriților și a nitraților asupra embrionilor de ciprinide au scos în evidență faptul că aceste elemente pot induce ritmuri diferite de creștere și dezvoltare a embrionilor în timpul perioadei de incubație, dar în ce sens decurg aceste schimbări depinde de specie.

- Durata incubației variază la aceeași specie în funcție de fluctuația diferiților factori fizico-chimici ai mediului acvatic, iar creșterea și dezvoltarea embrionilor este influențată direct, unele stadii embrionare fiind însă mai sensibile. Prelungirea duratei incubației peste limita normală duce la moarte embrionară.
- Fiecare factor de mediu influențează dezvoltarea embrionilor între anumite limite. Abaterile de la optim pot duce la modificări ireversibile în interiorul icrei, uneori chiar letale. Factorii chimici studiați devin factori teratogeni în momentul în care valorile lor sunt peste limitele normale.
- Cel mai potrivit mediu pentru susținerea, creșterea și dezvoltarea embrionilor de ciprinide este cel cu lumină naturală, o mișcare normală a apei, pH-ul = 6,5-7, o duritate de 0-10°dH, o cantitate foarte mică de nitriți $\leq 0,1$ mg/l și o cantitate de nitrați ≤ 50 mg/l.
- În condițiile în care cercetarea s-a efectuat pe un eșantion „mic”, iar rezultatul în urma aplicării testului este semnificativ statistic ($p < 0.01$), se poate concluziona că rezultatul obținut este important.

Pe baza rezultatelor cercetărilor efectuate și a concluziilor la care s-a ajuns facem următoarele recomandări:

- Datele obținute în urma studiilor experimentale din lucrarea de față pot fi folosite ca un ghid pentru experimenterii.
- Rezultatele obținute pot fi folosite la dezvoltarea de tehnologii moderne pentru reproducerea artificială a ciprinidelor, îmbunătățind performanțele productive ale acestora.
- Cercetările pot servi dezvoltării altor tipuri de experimente sau dezvoltării de tehnologii noi de incubație a icrelor de ciprinide.

Bibliografie selectivă:

1. ABD EL-HAKIM E. E. - 2009 - Effect of temperature on hatching and larval development and mucin secretion in common carp (*Cyprinus carpio*), Global Veterinaria, 3(2): 80-90.
2. BRAUNBECK T. - 2005 - Towards an alternative for the acute fish LC50 test in chemical assessment: The fish embryo toxicity test goes multi-species - an update. Alternativen zu Tierexperimenten, 22: 87-102.
3. CHAPMAN D.C., DETERS J.E. - 2009 - Effect of water hardness and dissolved-solid concentration on hatching success and egg size in bighead carp, American Fisheries Society online Journals, 138: 1226-1231.

4. DUIS K. - 2001 - Acid tolerance of early stages of indigenous fish species under the hydrochemical conditions of Lusatian post-mining lakes, Dissertation Abstracts, Humboldt-University Berlin, preluat de pe adresa internet <http://aslo.org./dialog/200102-2.html>, (accesat în 27.09.2002).
5. GROZEA A. - 2007 - Ciprinicultură, Editura Mirton, Timișoara.
6. GROZEA A., BURA M. - 2002 - Crapul – Biologie, Sisteme de creștere, Patologie, Editura de Vest, Timișoara.
7. GROZEA A., BURA M., BĂNĂȚEAN-DUNEA I., GHIȘE Gh., CARABĂ V., ILIE D., MUSCALU R., BĂDILIȚĂ M. - 2003 - Aspects of young embryos development in *Danio rerio*, vol. 46, Editura Agroprint, Timișoara, p. 421-425.
8. GROZEA A., BURA M., POPESCU V., ILIE D., MUSCALU-NAGY R., BĂNĂȚEAN-DUNEA I., MUSCALU-NAGY C. - 2004 - Contribution to knowledge of embryogenesis in carp (*Cyprinus carpio* L.), Lucrări Științifice Zootehnie și Biotehnologii, Timișoara, 37: 311-316.
9. KIMMEL, C.B., BALLARD, W.W., KIMMEL, S.R., ULLMANN, B., SCHILLING, T.F. - 1995 - Stages of embryonic development of the zebrafish, preluat de pe adresa internet <http://anatomy.med.unsw.edu.au/cbl/embryo/OtherEmb/Zebfish.htm>, (accesat în 04.09.2002).
10. KORWIN-KOSSAKOWSKI M. - 2006 - Larval development of carp, *Cyprinus carpio* L., in acidic water, Journal of Fish Biology, 32(1): 17-26.
11. LINDSAY S.M., VOGT R.G. - 2004 - Behavioral responses of newly hatched zebrafish (*Danio rerio*) to amino acid chemostimulants, Oxford Journals Chemical Senses, 29:93-100.
12. MIS J., BIENIARZ K., EPLER P., SOKOLOWSKA-MIKOLAJCZYK M., CHYB J. - 1995 - Incubation of fertilized common carp (*Cyprinus carpio* L.) eggs in different concentrations of cooper, Polish Archives of Hydrobiology, 42: 269-276.
13. MIS J., BIENIARZ K., EPLER P., SOKOLOWSKA-MIKOLAJCZYK M., - 1996 - Incubation of fertilized common carp (*Cyprinus carpio* L.) eggs in different concentrations of zinc, Polish Archives of Hydrobiology, 43: 79-86.
14. MORLEY S.A., BATTY R.S. - 1996 - The effect of egg size and incubation temperature on the hatching and early growth of larval herring, preluat de pe adresa internet <http://www-heb.pac.dfo-mpo.gc.ca/congress/1996/egg/morley.htm>, (accesat în 10.02.2003).
15. MOYLE P.B., CECH J.J. - 2000 - Fishes – An introduction to ichthyology, 4th Edition, Prentice Hall, Upper Saddle River, p. 2, 130.
16. OYEN F., CAMPS L., BONGA W. - 1991 - Effect of acid stress on the embryonic development of the common carp (*Cyprinus carpio*). "Aquatic Toxicology 19(1): 1.
17. PĂCALĂ N., KORBULY B., DUMITRESCU M., - 2006 - Biologia reproducției peștilor, Editura Pardon, Timișoara.
18. WESTERFIELD. M. - 2000 - The zebrafish book, A guide for the laboratory use of zebrafish *Danio rerio*, 4th ed., Univ. of Oregon Press, Eugene.
19. <http://www.carp-fishing-tactics.com/science-carp-reproduction.html>, (accesat în 29.10. 2009).
20. http://www.dainet.de/bfafi/ifo/Cuxhaven/body_embryocux.htm, (accesat în 27.09.2002).
21. *** OM 161/2006. Clasificarea calității apelor de suprafață.