

~~UNIVERSITATEA „DUNĂREA DE JOS” DIN GALAȚI~~  
~~Facultatea de Știința și Ingineria Alimentelor~~  
**UNIVERSITATEA „DUNĂREA DE  
JOS” DIN GALAȚI**  
**FACULTATEA DE ȘTIINȚA ȘI INGINERIA ALIMENTELOR**

**REZUMAT**  
**TEZĂ DE DOCTORAT**

**Cercetări privind diversitatea și dinamica microbiotei  
din sisteme recirculante de acvacultură industrială**

**Doctorand,  
GIANINA MANUELA BĂCANU**

**Conducător științific,  
PROF.DR.ING.LUCIAN OPREA**

## Galați, 2011

*Mulțumiri*

Cu deosebit respect, multumesc domnului prof.dr. ing. Lucian Oprea, care mi-a facut onoarea sa accepte conducerea tezei de doctorat intr-un moment important al carierei mele profesionale. Pe parcursul a trei ani de zile, dindu-mi foarte multa libertate in gindire si actiune, m-a calauzit cu mult tact pedagogic, intelegere si profesionalism spre a finaliza aceasta teza de doctorat. Desele discutii cu dumnealui au insemnat pentru mine un nesecat izvor de idei in abordarea obiectivelor tezei de doctorat si pentru pregatirea mea profesionala in general. Ii multumesc, de asemenea, pentru sansa extraordinara ce mi-a oferit-o, inlesnindu-mi accesul la Universitatea din Wageningen, Olanda.

Din toata inima, adresez multumiri domnului prof.dr.ing. Victor Cristea, prorector al Universitatii "Dunarea de Jos" din Galati, dascal eminent, parinte al multor generatii de ingineri in domeniul acvaculturii si pescuitului, pentru incurajarile permanente si sprijinul moral acordat pe durata realizarii tezei de doctorat.

Adresez, de asemenea, sincere multumiri membrilor comisiei de doctorat care au raspuns favorabil solicitarii mele. Exprim toata gratitudinea mea doamnei Director al CCDP Nucet, dr.ing. Mioara Costache, domnului Rector al USAMV Bucuresti, prof.dr. Stefan Diaconescu si domnului Decan al Facultatii de Stiinta si Ingineria Alimentelor, prof.dr. Petru Alexe, pentru ajutorul acordat.

Universitatea "Dunarea de Jos" din Galati mi-a oferit sansa obtinerii unei burse de cercetare pentru elaborarea tezei de doctorat, inclusiv finantarea unui stagiului de opt luni in Olanda, la Universitatea din Wageningen. Multumesc din inima acelor oameni minunati din colectivul de management al proiectului POPSDDRU/SIMBAD, coordonat de domnul profesor dr. Lucian Puiu Georgescu. Sincere multumiri adresez si domnului conf.dr. Gabriel Murariu pentru munca extrem de laborioasa desfasurata in cadrul proiectului, totala disponibilitate si intelegerea de care a dat dovada permanent.

Sprijin deosebit si intelegere am primit din partea tuturor membrilor Departamentului de Acvacultura, Stiinta Mediului si Cadastru, carora le multumesc din suflet pentru tot ceea ce au facut pentru mine.

In timpul stagiului de documentare si cercetare stiintifica efectuat la Universitatea din Wageningen, Departamentul de Stiinte Animale, laboratorul de Microbiologie si respectiv laboratorul de Acvacultura si Pescuit, am fost sprijinita si indrumata de cativa specialisti cu renume in domeniu. In Olanda, toate realizările mele in plan profesional sunt legate de numele d-ilor dr. Marc Verdegem, prof.dr Hauke Smidt, dr. Eugene Rurangwa si dr. Jose Morillo Perez, carora le multumesc pentru sprijinul acordat si-i asigur de devotamentul si prietenia mea.

Desigur ca pentru a realiza o lucrare de doctorat ai nevoie de foarte multe cunostinte si de foarte mult sprijin. Cu siguranta, lista celor care au contribuit la formarea mea profesionala sau m-au ajutat efectiv la realizarea tezei de doctorat este mult mai lunga. Celor pe care i-am omis sa-i scot in evidenta le cer scuza si le adresez multumirile mele.

Intentionat am lasat la urma pe cei care-mi sunt cei mai dragi inimii mele: parintii, sora si prietenul meu. Multumesc parintilor pentru ca m-au crescut si educat in spiritul cinstei, sinceritatii si al respectului fata de oameni. Lor le dedic aceasta lucrare, simbol al dragostei ce le-o port.

**CUPRINS:**

<b>PARTEA I</b>	
<b>STADIUL CUNOAȘTERII ÎN DOMENIU</b>	
<b>CAPITOLUL 1 – DEZVOLTAREA ACVACULTURII ÎN MILENIUL ALTREILEA .....</b>	9
<b>1.1. Acvacultura în lume .....</b>	9
<b>1.2. Sistemele recirculante de acvacultură (RAS) .....</b>	18
<b>CAPITOLUL 2 - TAXONOMIA, ECOLOGIA ȘI BIOLOGIA CALCANULUI .....</b>	21
<b>2.1. Considerații generale privind ordinul <i>Pleuronectiformes</i> și familia <i>Scophthalmidae</i> .....</b>	21
<b>2.2. Taxonomia, ecobiologia și creșterea calcanului mare, <i>Psetta maxima</i>, Linnaeus, 1758 .....</b>	22
<b>2.3. Speciile de calcan din Marea Neagră .....</b>	29
<b>CAPITOLUL 3 - MICROBIOTA DIN SISTEMLERECIRCULANTE DE ACVACULTURA .....</b>	33
<b>3.1. Caracterizarea microbiotei .....</b>	33
<b>3.2. Metode de cercetare a microbiotei .....</b>	39
<b>PARTEA a II- a</b>	
<b>EXPERIMENTĂRI PRIVIND IMPACTUL COMUNITĂȚII MICROBIENE DIN SISTEMLERECIRCULANTE DE ACVACULTURĂ ASUPRA CREȘTERII CALCANULUI (<i>PSETTA MAXIMA</i>)</b>	
<b>Scopul cercetărilor .....</b>	48
<b>CAPITOLUL 4 - METODE ȘI TEHNICI DE BIOLOGIE MOLECULARĂ</b>	49
<b>4.1. Determinarea încărcăturii microbiene a apei .....</b>	49
<b>4.2. Extracția ADN-ului .....</b>	52
4.2.1. Extracția ADN-ului pentru probele de apă .....	52
4.2.2. Extracția ADN-ului pentru probele de hrană .....	55
4.2.3. Extracția ADN-ului pentru probele de mucus și conținut	55

	intestinal .....	
	<b>4.3. PCR (Polimerase Chain Reaction) .....</b>	57
	4.3.1. PCR pentru probele de apă .....	57
	4.3.2. PCR pentru probele de hrană .....	62
	4.3.3. PCR pentru probele de mucus și conținut intestinal .....	63
	<b>4.4. DGGE (Denaturation Gradient Gel Electrophoresis) .....</b>	67
	<b>4.5. Interpretări biostatistice .....</b>	70
	<b>CAPITOLUL 5 – INFLUENȚA CONDIȚIILOR DE MEDIU ȘI A FACTORILOR TEHNOLOGICI ASUPRA MICROBIOTEI DIN APĂ, HRANĂ ȘI INTESTINUL PEȘTILOR .....</b>	72
	<b>5.1. Introducere .....</b>	72
	<b>5.2. Materiale și metode de cercetare .....</b>	75
	5.2.1. Sistemele de creștere .....	75
	5.2.2. Materialul biologic .....	79
	5.2.3. Alimentația peștilor .....	80
	5.2.4. Prelevarea probelor .....	81
	5.2.4.1. Apa .....	81
	5.2.4.2. Hrana .....	83
	5.2.4.3. Continut si mucus intestinal .....	83
	5.2.5. Managementul calității apei tehnologice .....	88
	5.2.5.1. Parametrii fizici .....	88
	5.2.5.2. Parametrii chimici .....	89
	5.2.6. Metode si tehnici de laborator utilizate in analiza microbiotelor	89
	5.2.6.1. Microbiota apei .....	89
	5.2.6.1.1. Determinarea incarcaturii microbiene a apei .....	90
	5.2.6.1.2. Extracția de ADN .....	90
	5.2.6.1.3. PCR (Polimerase Chain Reaction) .....	90
	5.2.6.1.4. DGGE (Denaturation Gradient Gel Electrophoresis) ..	90

		5.2.6.2. Microbiota hranei .....	91
		5.2.6.2.1. Extracția de ADN .....	91
		5.2.6.2.2. PCR (Polimerase Chain Reaction) .....	91
		5.2.6.2.3. DGGE (Denaturation Gradient Gel Electrophoresis) ..	91
		5.2.6.3. Microbiota continutului si mucusului intestinal .....	92
		5.2.6.3.1. Extracția de ADN .....	92
		5.2.6.3.2. PCR (Polimerase Chain Reaction) .....	92
		5.2.6.3.3. DGGE (Denaturation Gradient Gel Electrophoresis) ..	92
		5.2.7. Interpretări biostatistice .....	92
		<b>5.3. Rezultate și discuții .....</b>	<b>93</b>
		5.3.1. Caracterizarea indicatorilor tehnologici .....	93
		5.3.2. Calitatea apei tehnologice .....	98
		5.3.3. Caracterizarea microbiotei din apa .....	103
		5.3.4. Caracterizarea microbiotei din hrana .....	119
		5.3.5. Caracterizarea microbiotei din intestinul peștilor .....	123
		<b>5.4. Rezultate și concluzii .....</b>	<b>144</b>
		<b>CAPITOLUL 6 – IMPACTUL ÎNCĂRCĂTURII ORGANICE DIN RAS ASUPRA CREȘTERII PEȘTELOR .....</b>	<b>148</b>
		<b>6.1. Introducere .....</b>	<b>148</b>
		<b>6.2. Materiale și metode de cercetare .....</b>	<b>150</b>
		6.2.1. Sistemele de creștere .....	150
		6.2.2. Materialul biologic .....	155
		6.2.3. Alimentația peștilor .....	155
		6.2.4. Prelevarea probelor .....	156
		6.2.4.1. Apă .....	156
		6.2.4.2. Hrană .....	159
		6.2.4.3. Conținut și mucus intestinal .....	159

	6.2.5. Managementul calității apei tehnologice .....	167
	6.2.5.1. Parametrii fizici .....	167
	6.2.5.2. Parametrii chimici .....	167
	6.2.6. Metode și tehnici de laborator utilizate in analiza microbiotelor ...	168
	6.2.6.1. Microbiota apei .....	168
	6.2.6.1.1. Determinarea încărcăturii microbiene a apei .....	169
	6.2.6.1.2. Extracția de ADN .....	169
	6.2.6.1.3. PCR (Polimerase Chain Reaction) .....	170
	6.2.6.1.4. DGGE (Denaturation Gradient Gel Electrophoresis) ..	170
	6.2.6.2. Microbiota hranei .....	170
	6.2.6.2.1. Extracția de ADN .....	170
	6.2.6.2.2. PCR (Polimerase Chain Reaction) .....	170
	6.2.6.2.3. DGGE (Denaturation Gradient Gel Electrophoresis) ..	171
	6.2.6.3. Microbiota continutului si mucusului intestinal .....	171
	6.2.6.3.1. Extracția de ADN .....	171
	6.2.6.3.2. PCR (Polimerase Chain Reaction) .....	172
	6.2.6.3.3. DGGE (Denaturation Gradient Gel Electrophoresis) ..	172
	6.2.7. Interpretări biostatistice .....	172
	<b>6.3. Rezultate și discuții .....</b>	<b>173</b>
	6.3.1. Caracterizarea indicatorilor tehnologici .....	173
	6.3.2. Calitatea apei tehnologice .....	179
	6.3.3. Caracterizarea microbiotei din apa .....	194
	6.3.4. Caracterizarea microbiotei din hrana .....	210
	6.3.5. Caracterizarea microbiotei din intestinul pestilor .....	213
	<b>6.4. Concluzii .....</b>	<b>243</b>
	<b>CAPITOLUL 7 - CONTRIBUTII PERSONALE SI CONCLUZII .....</b>	<b>246</b>
	<b>7.1. Concluzii generale .....</b>	<b>246</b>

<b>7.2. Elemente de originalitate .....</b>	249
<b>BIBLIOGRAFIE .....</b>	251

## STRUCTURA TEZEI DE DOCTORAT

Teza de doctorat cuprinde 261 pagini, din care partea de documentare 47 pagini și partea experimentală 214 pagini. Lucrarea conține 128 figuri și 38 tabele. Pentru elaborarea tezei s-au utilizat 106 referințe bibliografice.

### 1.1. Acvacultura în lume

Obiectivele acvaculturii sunt relativ variate, ele depinzând în primul rând de contextul economic în care se încadrează. În țările dezvoltate se urmărește obținerea de produse alimentare din organisme acvatice pentru valoarea lor nutritivă și comercială, de multe ori costurile de producție fiind foarte mari. Pentru țările în curs de dezvoltare obiectivul principal este producerea de proteine animale în cantități suficiente pentru populație, culturile acvacoale având rolul să completeze celelalte tipuri de culturi agro-zootehnice.

Un obiectiv major al acvaculturii este și protecția mediului acvatic, puternic poluat printr-o serie de activități industriale și agricole. În pofida faptului că economia și ecologia sunt două activități contradictorii și că acvacultura este o activitate economică, totuși, prin procesele bio-ecologice pe care le implică ea susține protecția ecosistemelor acvatice.

Acvacultura mai are și alte obiective la fel de importante ca și precedentele:

- repopularea apelor naturale pentru reconstituirea stocurilor de organisme acvatice;
- aclimatizarea de noi specii;
- divertisment și recreere, prin acvaristica și pescuit sportiv.

Tabelul 1.1-Topul mondial al principalelor țări, în anul 2008 (FAO Statistics, 2010)

Producția din pescuit			Producția din acvacultură		
<i>Locul</i>	<i>Țara</i>	<i>Captura (mil. t.)</i>	<i>Locul</i>	<i>Țara</i>	<i>Cultura (mil. t)</i>
1	China	14,79	1	China	32,73
2	Peru	7,36	2	India	3,47
3	Indonezia	4,95	3	Vietnam	2,46
4	USA	4,34	4	Indonezia	1,69
5	Japonia	4,24	5	Thailanda	1,37
6	India	4,1	6	Bangladesh	1,00
7	Chile	3,55	7	Norvegia	0,84
8	Rusia	3,38	8	Chile	0,84
9	Philippine	2,56	9	Philippine	0,74
10	Myanmar	2,49	10	Japonia	0,73
12	<b>Norvegia</b>	<b>2,43</b>	13	USA	0,50
18	<b>Islanda</b>	<b>1,28</b>	17	<b>Spania</b>	<b>0,25</b>
23	<b>Spania</b>	<b>0,91</b>	19	<b>Franta</b>	<b>0,24</b>
25	<b>Danemarca</b>	<b>0,69</b>	20	<b>Italia</b>	<b>0,18</b>
27	<b>Marea Britanie</b>	<b>0,59</b>	21	<b>Marea Britanie</b>	<b>0,18</b>

## 1.2. Sistemele recirculante de acvacultura (RAS)

În condițiile actuale, în care multe amenajări piscicole au un statut incert ca urmare a revendicării resursei naturale (pământ, luciu apă etc.) sau care, prin degradare și-au pierdut parțial sau total potențialul de producție, se caută



alternative care să asigure obținerea unor producții piscicole în cantitatea și calitatea impusă de cerințele pieței (Savin, Cristea, 2010).

Deși costurile de investiție sunt încă ridicate, interesul pentru aceste sisteme se datorează mai multor avantaje pe care le au față de acvacultura tradițională, printre care:

- posibilitatea amplasării în apropierea piețelor de desfacere;
- obținerea unor produse de calitate;
- necesitatea redusă de suprafațe de teren și de apă;
- gradul ridicat de control asupra mediului care permite obținerea unor rate de creștere optime în tot cursul anului;
- ciclul de producție mai scurt ca urmare a controlului condițiilor mediale și a îmbunătățirii ratei de conversie a furajelor.

## **CAPITOLUL 2**

### **TAXONOMIA, ECOLOGIA ȘI BIOLOGIA CALCANULUI**

#### **2.1. Considerații generale privind ordinul Pleuronectiformes și familia Scophthalmidae**

##### **Ordinul Pleuronectiformes**

Cuprinde numeroase specii marine bentonice (printre care și dulcicole), al căror corp este disciform, cu asimetrie laterală, având o largă răspândire în apele oceanului planetar, întâlnite atât în apele calde tropicale și temperate, cât și în cele nordice mai reci.



Ochii sunt situati pe latura opusă celei

pe care peștii sunt culcați, fie pe latura dreaptă la formele dextre (cambula), fie pe latura stângă la formele senestre (calcan). Ordinul este subdivizat în două subordine: Pleuronectoidei și Soleoidei. Din primul subordin cele mai importante familii sunt: Scophthalmidae, Pleuronectidae și Bothidae, iar din al doilea subordin familiile: Soleidae și Cynoglossidae.

### **Familia Scophthalmidae**

Din această familie cele mai importante genuri sunt Psetta și Scophthalmus, calcani, ai căror reprezentanți se găsesc obișnuit în apele marine cu apă caldă și temperată și mai rar în cele cu apă rece. Toate speciile sunt disciforme, la care ochiul de pe latura dreaptă a corpului migrează din perioada larvară pe latura stângă, fiind deci forme senestre

### **Morfologie și ecobiologie**

Calcanul mare este unul din cei mai frumoși membri aparținând peștilor cu corpul plat. O caracteristică importantă a calcanului este corpul său în formă de disc. Tegumentul prezintă proeminente osoase distribuite neregulat. Are gura mare și ochii mici. Inotatoarele dorsala și anala sunt lungi și simetrice, aproape ca se unesc cu caudala. Poate ajunge până la o lungime de 1 metru și o greutate de 20 kg. Cu toate acestea pe piață are o greutate cuprinsă între 1 și 4 kg. Calcanii care provin din Marea Baltică sunt de obicei mai mici decât alți membri din familia lor.

Coloritul corpului este, în general, gri-maroniu cu pete întunecate pe partea stângă (dorsala) și albicios pe partea dreaptă (ventrală) și este acoperit cu solzi cicloizi și ctenoizi. Partea dorsală îi permite calcanului să se adapteze foarte bine la condițiile de mediu și să se camufleze. De aceea, este foarte dificil pentru dușmanii

sai sa-l observe. El poate trai in mod normal pana la 22 ani. Este o specie marina care prefera habitatele moderat de calde unde apa nu este prea adanca, la maximum 100 m; prefera locurile nisipoase, pietroase sau mixte.

Calcanul mare este un peste carnivor, hrănindu-se cu moluște, crustacee, cefalopode. Ajunge la maturitatea sexuala la varsta de 5 ani. Depune icrele in lunile februarie-aprilie sau mai-iulie, in functie de regiunea unde traieste. O singura femela depune 5-15 milioane de oua. Initial, larvele au corpul simetric si plutesc in pozitie verticala in apa, dar ulterior, dupa 40-50 de zile, la lungimi de aproximativ 25 mm, ochiul drept migreaza pe stânga, dând naștere unui corp asimetric.

## **CAPITOLUL 3**

### **MICROBIOTA DIN SISTEMELE RECIRCULANTE DE ACVACULTURĂ**

#### **3.1. Caracterizarea microbiotei**

Microbiota reprezintă microflora și microfauna dintr-un sistem biologic (de exemplu un animal-gazdă sau o singură parte a corpului său cum ar fi aparatul digestiv, cavitatea bucală, etc).

Microbiota intestinală este o comunitate densă microbiană ce colonizează tractul intestinal la animale. Contribuie la mentinerea sănătății și funcțiilor metabolice ale organismului gazdă având totodată și rol de protecție împotriva agenților patogeni. Microbiota poate fi reprezentată și de microorganisme care trăiesc în afara unui organism gazdă, ca de exemplu un sistem de creștere (RAS), o probă de sol, de apă, etc.

Microorganismele, organismele vegetale și animale, alcătuiesc împreună un lanț trofic, aflat într-o interdependență continuă. Modificarea unei componente a lanțului

trofic va induce modificări în întregul ansamblu al sistemului. Un exemplu este suprapopularea cu pești într-un iaz care determină reducerea populației de zooplancton și dezvoltarea excesivă a algelor. La polul opus, algele în exces reduc transparența apei, provocând scăderea capacității de fotosinteză a plantelor. Plantele moarte ajută la proliferarea bacteriilor, care sunt consumatoare de oxigen. Lipsa oxigenului afectează, la rândul său, echilibrul biologic.

Într-un mediu biologic întâlnim bacterii oportuniste și nonoportuniste. Bacteriile heterotrofe constituie un factor important în consumul de oxigen și în eliberarea de subproduse metabolice. Extrem de important este efectul direct al bacteriilor patogene asupra sănătății populației de pești dintr-un sistem de creștere. Starea de sănătate a peștilor dintr-un RAS este influențată de mediul de creștere (starea de sănătate a populației, de compoziția și modul de administrare a hranei, factorii fizicochimici, microbiota apei).

Măsurile de biosecuritate în RAS sunt importante și pentru a reduce numărul total de germeni patogeni și pentru a evita transferarea agenților patogeni de la un sistem la altul. În figura 3.1 se prezintă, schematic, modul în care se realizează biosecuritatea sistemelor de acvacultură.

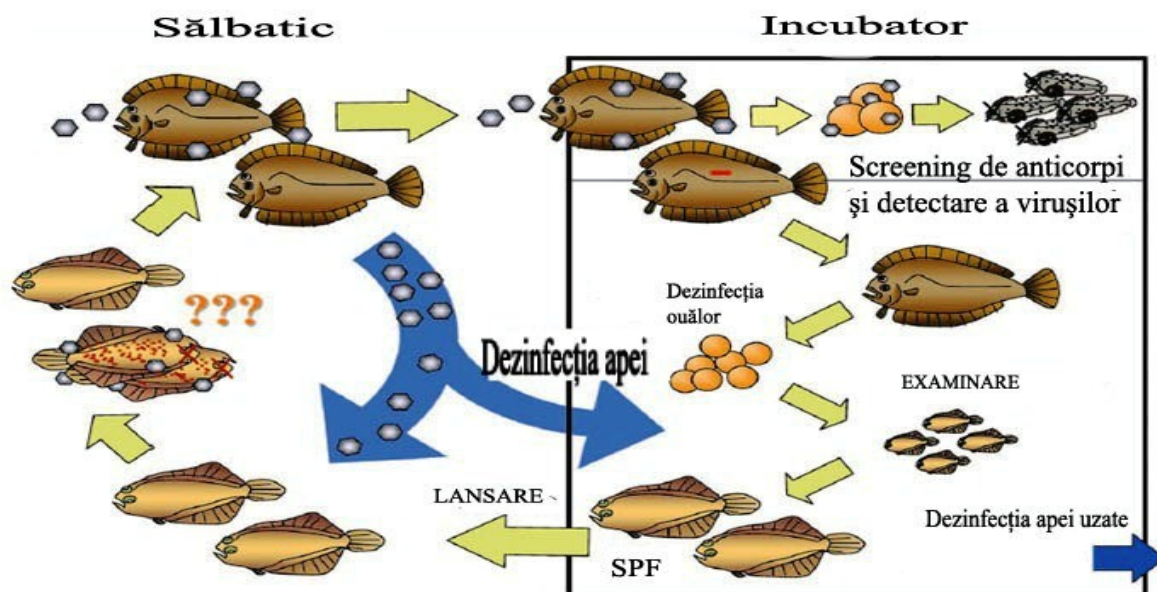


Fig. 3.1 -Schema unor măsuri de biosecuritate, practicate în mediul natural și în sistemele dirijate de creștere (eclozerie)

Microbiota intestinală este o comunitate complexă și diversă de microorganisme care joacă un rol important în homeostazia intestinului. Experimente recente efectuate atât la oameni cât și la animale au furnizat dovezi puternice asupra compoziției microbiotei ce pot avea un impact semnificativ asupra sănătății organismului gazdă, cum ar fi metabolismul sau sensibilitatea la bacteriile patogene. Strategiile care vizează menținerea unei compoziții optime a microbiotei intestinale ar putea fi, extrem de benefică. Pentru aceasta este necesară o mai bună înțelegere a factorilor genetici și o cunoaștere a speciilor microbiene ce alcatuiesc microbiota intestinală. Flora este sinonimă cu microbiota și microflora. Corpul uman, format din aproximativ 100 de trilioane de celule, transportă aproximativ de zece ori mai multe microorganisme în intestine. Activitățile metabolice realizate de aceste bacterii seamănă cu cele ale unui organ. Se estimează că o microflora intestinală are de 100 de ori mai multe gene decât există în genomul uman. Bacteriile se găsesc într-o proporție mare în flora din intestin și până la 60% în fecalele uscate. Între 300 și 1000 de specii diferite trăiesc în intestin. Alături de bacterii, în microflora intestinală se găsesc fungi și protozoare dar se cunosc puține informații asupra activităților efectuate. Cele mai multe bacterii ale tractului intestinal al omului aparțin genurilor *Bacteroides*, *Clostridium*,

*Fusobacterium*, *Eubacterium*, *Ruminococcus*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus* și *Bifidobacterium*. Altele, cum ar fi *Coli* și *Lactobacillus*, sunt prezente într-un procent mai mic. Speciile din genul *Bacteroides* reprezintă circa 30% din bacteriile ce populează intestinul, ceea ce sugerează că acest gen este deosebit de important în funcționarea organismului gazdă. Genurile de ciuperci ce fac parte din flora intestinală includ: *Candida*, *Saccharomyces*, *Aspergillus*, *Penicillium*. Bacteriile comune ce colonizează tractul intestinal al peștilor includ genurile: *Vibrio*, *Aeromonas*, *Flavobacterium*, *Plesiomonas*, *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Acinetobacter*, *Clostridium*, *Fusarium*, *Bacteroides*. Clasa *Enterobacteriaceae* reprezintă de asemenea o pondere importantă în microbiota intestinală. Numărul total de bacterii din tractul intestinal al peștilor este scăzut în comparație cu cel al animalelor cu sânge cald, dar numărul acestora variază în funcție de vârstă, nutriție și mediul de creștere. La pești, numărul bacteriilor viabile aerobe și anaerobe este cuprins între:  $6,6 \times 10^4$ - $1,6 \times 10^9$  UFC/g de conținut intestinal. (Skrodenyte-Arbaciauskiene 2007). Utilizând tehnici de biologie moleculară au fost identificate multe genuri bacteriene Gram negative ca: *Acinetobacter*, *Chryseobacterium*, *Ochrobactrum*, *Psychrobacter*, *Sejongia* și Gram pozitive ca: *Arthrobacter*, *Microbacterium*, *Staphylococcus*, (Ring, Sperstad, Myklebust, Mayhew et al. 2006), *Mycoplasma* și *Acinetobacter* (Holben et al. 2002), și specii precum *Erwinia carotovora* (Sun, Yang, Ling, Chan & Ye 2009) și *Janibacter* species (Merrifield et al. 2009) toate acestea s-au identificat ca făcând parte din microbiota normală a tractului gastrointestinal al peștilor. Acesta semnifică încă o dată complexitatea compoziției microbiene a tractului intestinal al peștilor și se speră că în viitorul apropiat cercetările vor putea să aducă mai multe argumente privind adevărata complexitate a microbiotei din tractul intestinal la diferite specii de pești.

De foarte mult timp s-a demonstrat că activitatea microbiotei intestinale în gazdă este corelată cu longevitatea gazdei (Metchnikoff 1901). Apoi s-a arătat că microbiota gastrointestinală nu are rol doar în digestie ci reprezintă o barieră protectoare împotriva agenților patogeni (Sisson 1989). Pentru aceasta o atenție deosebită se acordă identificării microorganismelor și apoi manipulării acestei comunități microbiene gastrointestinale.

### 3.2. Metode de cercetare a microbiotei

Introducerea cercetărilor de biologie moleculară în ecologia microbiană a revoluționat cunoașterea în domeniu. Pentru prima dată, a fost posibil să se stabilească componența microorganismelor fără a fi necesară cultivarea și analiza lor la microscop. Acest lucru a fost posibil prin secvențierea unei gene prezente în toate organizările de codare în subunități mici (SSU): 16S ARNr. Analiza secvenței a făcut posibilă determinarea poziției filogenetice în clustere construite cu aceleași secvențe și a furnizat un instrument foarte puternic în estimarea relațiilor filogenetice dintre tulpini cu secvențe omoloage (Willame et al., 2006).

Există tehnici speciale de biologie moleculară pentru a studia și descoperi microbiota existentă într-un anumit loc. Aceste tehnici folosesc acidul dezoxiribonucleic (ADN). Structura ADN-ului este unică nu numai pentru o specie anume ci și pentru orice individ al oricărei specii animale sau vegetale și a fost numit „secretul vieții” (fig. 3.2). ADN-ul se găsește practic în orice celulă de la organismele unicelulare cum ar fi bacteriile și protozoarele până la organismele pluricelulare (fungi, vegetale sau animale) precum și în structura unor virusuri. ADN-ul poartă informațiile necesare sintetizării directe a proteinelor și pentru replicare. Sinteza proteinelor reprezintă producerea de proteine necesare celulei pentru acțiunile acestora sau pentru dezvoltare (von Wintzingerode *et al.*, 1997; Head *et al.*, 1998).

## PARTEA a II- a

### EXPERIMENTĂRI PRIVIND IMPACTUL COMUNITĂȚII MICROBIENE DIN SISTEMELE RECIRCULANTE DE ACVACULTURĂ ASUPRA CREȘTERII CALCANULUI

#### (*PSETTA MAXIMA*)

#### **Scopul cercetărilor**

Scopul cercetărilor noastre a constat în analiza cantitativă a comunității microbiene și stabilirea dinamicii acesteia în sistemele recirculante de acvacultura (RAS), cu aplicații la calcan.

În lucrare sunt prezentate 3 experimente de creștere a calcanului (*Psetta maxima*) realizate în 3 ferme diferite din Olanda.

Cercetările vor arăta dacă există o relație între anumite microorganisme din apă și cele prezente în pește și hrană și măsura în care stabilitatea microbiană ajută în RAS; totodată, studiul ne va informa dacă datele microbiene din eşantioanele prelevate în RAS la scară mică sunt comparabile sau cele colectate la scară comercială din fermele RAS de calcan.

## CAPITOLUL 4

### METODE ȘI TEHNICI DE BIOLOGIE MOLECULARĂ

Acidului dezoxiribonucleic (ADN) este o moleculă care transportă instrucțiuni genetice pentru aproape orice lucru viu. Acesta poate fi copiat și transmis unui organism cu ajutorul tehnicilor de biologie moleculară.

Pentru studiul microbiotelor din apă, hrană, mucus și conținut intestinal s-au folosit metode și tehnici speciale de biologie moleculară. Aceste metode vor fi descrise pentru fiecare microbiotă în parte în ordinea efectuării lor.

#### 4.1. Determinarea încărcăturii microbiene a apei

Analiza încărcăturii microbiene s-a făcut doar pentru probele de apă. Pentru început s-a efectuat filtrarea apei; după care filtrele au fost depozitate în tuburi sterile etichetate, la  $-80^{\circ}\text{C}$ , până la prelucrarea lor. Această etapă a fost urmată de prepararea mediului de cultură și apoi însămânțarea lui.

#### 2. Extractia ADN-ului



#### 4.2.1. Extractia de ADN pentru probele de apă

Extractia ADN-ului e una din analizele cele mai importante. După ce apa din proba prelevată a fost filtrată, pentru ca bacteriile să se concentreze pe filtre, filtrele astfel obținute împreună cu celelalte probe recolate, păstrate la  $-80^{\circ}\text{C}$ , au fost folosite pentru extractia ADN-ului.

Pentru toate probele de apă recoltate s-a utilizat aceeași metodă de extracție a ADN-ului utilizând kit-ul: FastDNA® SPIN Kit for Soil (fig. 4.3). Acesta este un kit mecanic. Prezintă anumite avantaje și anume: izolează cu ușurință ADN-ul dintr-o varietate de organisme și în timp foarte scurt (aproximativ 60 de minute). De asemenea, nu prezintă reactivi organici periculoși.

#### 4.2.2 Extractie AND-ului pentru probele de hrană

Pentru extractia de ADN din probele de hrană s-a folosit același kit ca și la extractia ADN-ului din probele de apă. FastDNA® SPIN Kit for Soil este un kit mecanic ce a fost întrebuințat cu mult succes la probele de hrană. Masa de lucru în prealabil a fost bine curățată cu soluție dezinfectantă (10%  $\text{CLHO}_3$ ). Probele au fost scoase de la  $-80^{\circ}\text{C}$  și pregătite pentru extracție. S-a folosit un mojar steril pentru fiecare probă în parte. Probele au fost pregătite pentru extracție prin triturarea lor cu ajutorul mojarului după care au fost cântărite individual la o balanță electronică. S-a urmarit protocolul original. Nu s-a folosit proba comună. Cu kit-ul „FastDNA® SPIN Kit for Soil” au fost prelucrate aproximativ 500 mg de probă.

#### 4.2.3 Extractie AND-ului pentru probele de mucus și conținut intestinal

Pentru extractia ADN-ului genomic din probele de conținut și mucus intestinal s-a încercat utilizarea a 4 metode. Astfel:

1) S-a început cu utilizarea aceluiași kit de extracție al ADN-ului folosit la probele de apă și hrană: FastDNA® SPIN Kit. Probele au fost cântărite. Nu a existat probă comună. S-a urmarit protocolul original.

2) Un al doilea kit a fost NTNU, un kit des folosit în Laboratorul de Microbiologie WUR Wageningen, la extracția de ADN din probele de conținut intestinal de la tilapia. NTNU este un kit enzimatic și mecanic. A fost utilizat conform protocolului din laborator cu mici modificări; protocolul a fost modificat pentru a obține extracții eficiente de bacterii Gram negative și Gram pozitive.

3) QIAamp DNA Stool Mini Kit este utilizat pentru izolarea ADN-ului genomic al bacteriilor. Este un kit enzimatic și mecanic. S-a folosit la extracția ADN-ului din probele de conținut și mucus intestinal. S-a dovedit a fi cel mai eficient dintre cele utilizate mai sus dar, datorită conținutului redus al fiecărei probe, nu a putut fi utilizat. De menționat, că probele de conținut erau în cantitate foarte mică datorită vârstei foarte tinere a exemplarelor de calcan pentru Ferma 1 și Ferma 2.

4) S-a încercat un alt „kit” care ajută la extragerea ADN-ului din cantități foarte mici de probă. A fost numit impropriu „kit” dar este, de fapt, o metodă cu protocol propriu folosită în Laboratorul de Microbiologie WUR Wageningen pentru probele de biopsie (Zoetendal et al., 2001). Metoda (kit-ul) se numește „DNA isolation from Biopsy samples” și reprezintă o metodă nouă folosită în special pentru probele existente în cantități mici. Această metodă este de asemenea mixtă, mecanică și enzimatică. A fost utilizată cu succes la extracția ADN-ului din probele de mucus și conținut intestinal. Probele au fost cântărite utilizându-se aproximativ aceeași cantitate pentru toate variantele. S-au adăugat 50 μl Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) și 10 μl proteină K (20 mg/ml) după care probele au fost incubate la 55°C timp de o oră. Această soluție SDS este un detergent anionic, fiind folosită pentru solubilizarea proteinelor și extracția de plasmide din bacterii, etc. Apoi, au fost adăugați 150 μl soluție buffered phenol (pH 7-8). Probele au fost supuse unei procesări mecanice la 5000 rpm timp de 3 minute. O soluție de fenol-cloroform a fost utilizată cu rol de a îndepărta impuritățile. Înainte de precipitarea etanolului la minus 20°C, a fost adăugat 1 μl glicogen (20 mg/ml). După spălarea peletelor,

ADN-ul concentrat a fost suspendat într-o soluție tampon formată din 100  $\mu$ l de Tris-EDTA. EDTA este un chelator de cationi bivalenți, în special de magneziu ( $Mg^{2+}$ ). Rolul soluției EDTA este de a proteja acizii nucleici împotriva degradării enzimatiche.

### **4.3. PCR (reacția de polimerizare în lanț)**

#### 4.3.1. PCR pentru probele de apă

Pentru amplificare s-au utilizat 50  $\mu$ l reacție PCR ce conține 1  $\mu$ l de ADN genomic; 1  $\mu$ l enzima Phire Hot Start II ADN Polymerase; 2,5  $\mu$ l de 10  $\mu$ M primer 1 și 2,5  $\mu$ l de 10  $\mu$ M primer 2; 1  $\mu$ l de 10  $\mu$ M dNTP's; 32  $\mu$ l apă pentru PCR. Amplificarea PCR a fost realizată utilizând programul cu cicluri termice ale mașinii G-Star GS1™. 1  $\mu$ l de 16s rDNA produs prin PCR a fost utilizat pentru DGGE. Primerii utilizați în această reacție au fost: 27f nondeg- Eurogentec GTT-TGA-TCC-TGG-CTC-AG; 1369 R- Sigma 5'-GCCCCGGGAACGTATTACCG. Acești 2 primeri au fost folosiți la prima reacție de PCR ce a utilizat 20 cicluri. Pentru a 2 a reacție de PCR ce a avut 25 cicluri s-au folosit următorii primeri: 1369 R- Sigma 5'-GCCCCGGGAACGTATTACCG; 968Gcf-Eurogentec-CGC-CCG-GGG-CGC-GCC-CCG-GGC-GGG-GCG- GGG-GCA-CGG-GGG-GAA-CGC-GAA-GAA-CTC

Reacția PCR a fost realizată în următoarele condiții: temperatura de 98°C timp de 1 minut; amplificarea cu 20 de cicluri la temperatura 98°C timp de 10 secunde; la 62,5 °C timp de 10 secunde și la 72°C timp de 20 de secunde, urmând apoi extensia finală cu o durată de 5 minute la 72°C. Compoziția PCR (Mastermix) pentru 49  $\mu$ l per probă este : 1  $\mu$ l Reaction Buffer; 0,5  $\mu$ M din fiecare primer; 200  $\mu$ M de dNTPs; 1  $\mu$ l de enzima Phire Hot Start II DNA polymerase (Finnzymes). La cel de-al doilea PCR s-a utilizat 1,5  $\mu$ l din primul produs de PCR în 49  $\mu$ l mixtura de reacție (Mastermix). Condițiile pentru a 2 a reacție sunt identice cu a primei reacții de PCR cu două diferențe: s-au utilizat 25 de cicluri și temperatura de 55,9°C în loc de 62,5°C.

#### 4.3.2 PCR pentru probele de hrană

Reacția de polimerizare în lanț a fost realizată în aceleași condiții ca și pentru probele de apă. S-a utilizat Nested PCR utilizând Phire Hot Start II ADN Polymerase și următorii primeri: a) în prima reacție: 27f nondeg- Eurogentec GTT-TGA-TCC-TGG-CTC-AG și 1369 R- Sigma 5'-GCCCCGGGAACGTATTCACCG utilizând 20 cicluri iar b) pentru a 2 a reacție de PCR ce a avut 25 cicluri s-au folosit următorii primeri: 1369 R- Sigma 5'-GCCCCGGGAACGTATTCACCG și 968 GCf-Eurogentec-CGC-CCG-GGG-CGC-GCC-CCG-GGC-GGG-GCG-GGG-GCA-CGG-GGG-GAA-CGC-GAA-GAA-CTC.

#### 4.3.3 PCR pentru probele de mucus și conținut intestinal

Pentru Nested PCR s-au utilizat: temperatura de 98°C timp de 1 minut și amplificarea cu 20 de cicluri la temperatura 98°C timp de 10 secunde; la 62,5 °C timp de 10 secunde; la 72°C timp de 20 de secunde; extensia finală cu o durată de 5 minute la 72°C. Compoziția PCR (Mastermix) pentru 50 μl per probă este : 1 μl Buffer; 0,5 μM din fiecare primer; 200 μM de dNTPs; 1 μl de enzimă Phire Hot Start II DNA polymerase (Finnzymes). La cel de-al doilea PCR s-a utilizat 1,5 μl din primul produs de PCR în 49 μl mixtură de reacție (Mastermix). Condițiile pentru a 2 a reacție sunt identice cu ale primei reacții de PCR cu două diferențe: a avut 25 de cicluri și temperatura de 55,9°C și nu cea de 62,5°C.

În reacția PCR, pentru o bună amplificare, la probele de mucus intestinal de la peste s-a folosit albumină serică bovină (BSA).

#### **4.4. DGGE ( Denaturation Gradient Gel Electrophoresis)**

Electroforeza în gel cu gradient de denaturare este o metodă laborioasă de laborator. Metoda are mai multe etape ce se derulează pe parcursul a 3 zile (preparare gel; colorare - silver staining; uscare, scanare și interpretare). Pentru realizarea acestei analize s-a urmărit protocolul standard al laboratorului, cu mici modificări. Gradientul pentru gel a fost stabilit între 30-60%.

#### **Soluțiile utilizate la efectuarea DGGE-ului :**

80 % denaturant, 8% PAG

200 ml      40% acryl/bisacrylamide 37.5:1 (BioRad)

320 ml formamida (Life Technologies)  
 10 ml 50x T.A.E. buffer  
 20 ml glicerol  
 337,3 g urea (Life Technologies)

0% denaturant, 8% PAG

200 ml 40% acryl/bisacrylamida 37.5:1 (BioRad)  
 10 ml 50x T.A.E. buffer  
 20 ml glicerol

50x T.A.E.

242 g TRIS-base  
 57.1 ml acid acetic glacial  
 100 ml 0.5 M EDTA [pH 8.0]

A fost utilizat aparatul numit: BioRad© DCODE Universal Mutation Detection System™ (fig 4.8). Acesta a functionat 16 ore la o temperatură constantă de 60 °C si la 85V. Operatiunea a fost urmată de scanarea gelurilor. Scanarea s-a facut la un aparat special GC-800 Calibrated Densimeter Bio-Rad, conform protocolului laboratorului. Imaginile scanate au fost exportate ca fișier TIFF folosind o rezolutie de scanare identică de 400dpi.

Electroforeza și colorarea gelurilor s-a efectuat dupa protocoalele laboratorului (Zoetendal et al. 1998). Analiza ampliconilor a fost realizată pe geluri de poliacrilamidă 8% care contin un gradient de uree-formamidă de la 30% la 60%. S-au folosit markeri speciali formati din amestecuri de produse PCR din 10 specii bacteriene ce au fost aplicati la marginile si in centrul gelului. Gelurile au fost colorate cu argint (silver staining) si uscate la 55°C timp de 12 ore. Dupa care au fost scanate si examinate.

#### **4.5. Interpretări biostatistice**

Gelurile de DGGE au fost scanate (GC-800 calibrate Densiometer Bio-Rad) și analizate cu Bionumerics software 4.61. Asemănările dintre profilurile DGGE au fost determinate prin calcularea indicilor de similaritate a curbelor densiometrice, ale profilelor comparate, utilizând coeficienții Pearson și Dice.

Cu scopul de a face o examinare mai detaliată a gelurilor de DGGE, în afară de analiza cluster, au fost folosite tehnici multivariate de coordonare, care ne-au permis determinarea parametrilor de studiu (de exemplu, tipul de eșantion, ferma, RAS etc) contribuind la variabilitatea observată în profilele microbiene. O "matrice specie", foaie de date (care conține clasele de benzi, absența/prezența fiecărei benzi în toate probele incluse în comparații), a fost realizată utilizând programul Bionumerics 4.61; iar datele astfel obținute au fost exportate în Canoco pentru Windows 4.5 (Microcomputer Power, Ithaca, NY) în scopul efectuării analizei componentelor principale (PCA - Principal Component Analysis). Asemănările comunitare au fost reprezentate grafic.

UPGMA reprezintă un grup de metode neponderate pereche folosind media aritmetică. Au fost efectuate dendograme corespunzătoare care reprezintă relația dintre profilurile DGGE ce au fost efectuate. Dendogramele au fost create folosind instrumentul de analiză cluster. Benzile DGGE, comparate cu altele, folosind coeficientul de corelație Pearson sau Dice, dau o interpretare cluster care reprezintă similaritatea dintre probele analizate. Dendogramele UPGMA au arătat similaritatea profilelor comunităților microbiene de pe gelurile de DDGE pe baza indicilor de similaritate pentru probele analizate. Dendogramele au fost determinate calculând similaritatea indicilor curbelor densiometrice prin compararea profilelor utilizând coeficienții de corelație Pearson și Dice. Similaritatea este exprimată procentual. O valoare mare a similarității indică o apropiere între profilele probelor analizate din punct de vedere al comunităților bacteriene iar o valoare mică a similarității semnifică un profil diferit pentru fiecare probă analizată. A fost apoi utilizat programul Canoco pentru analiza multivariată.

## CAPITOLUL 5

# **INFLUENȚA CONDIȚIILOR DE MEDIU ȘI A FACTORILOR TEHNOLOGICI ASUPRA MICROBIOTEI DIN APĂ, HRANĂ ȘI INTESTINUL PEȘTILOR**

## **5.1. Introducere**

Fermele comerciale utilizează tehnologii intensive de creștere a peștelui. Sistemele de creștere, datorită densității mari de populare (stocare) au o încărcare organică mare; ele găzduiesc o comunitate microbiană diversă care interacționează în mod continuu. Deși specialistii în creșterea peștelui au cunoștințele necesare și capacitatea de a gestiona sistemele de creștere în scopul de a menține condiții optime de calitate a apei, compoziția comunității microbiene a sistemelor este încă necunoscută și gestionarea microbiotei rămânând o provocare.

Principalele obiective ale cercetărilor noastre au fost :

- 1) de a face un inventar al comunității microbiene în fermele comerciale de creștere a calcanului in RAS
- 2) de a investiga relația dintre compoziția microbiană din apa de cultură, hrană și intestinul de pește pe de o parte, sănătatea și performanțele de creștere a peștilor pe de altă parte.

Cercetarile pentru Ferma 1 si Ferma 2 Yerseke s-au realizat pe o perioadă de 1 an între noiembrie 2009 și noiembrie 2010. Experimentul s-a efectuat la două ferme comerciale olandeze de creștere a calcanului unde s-a studiat relația dintre calitatea apei și compoziția comunității microbiene. Ambele ferme utilizează tehnologia RAS, dar diferă în design și management.

Scopul proiectului este de a înțelege mai bine impactul încărcăturii organice cu privire la relația dintre calitatea apei, compoziția microbiană și sănătatea peștilor în sistemele recirculante de acvacultură (RAS) și modul în care practicile diferite de management pot promova microbiota sănătoasă și prin urmare, sănătatea peștilor în apa de cultură.

## **5.2. Materiale și metode de cercetare**

### 5.2.1. Sistemele de creștere

Ferma 1 Yerseke de creștere a calcanului prezintă bazine circulare de aproximativ 35 m<sup>2</sup> (60 cm adâncime) ce sunt conectate la un filtru tambur de 40μm și un biofiltru trikling pentru 16 rezervoare.

Dezinfectarea apei s-a făcut cu ozon și rata de înprospătare a bazinelor a fost de un volum pe oră.

Sistemul recirculant de acvacultură pentru calcan la Ferma 1 are următorul desing: apa din bazinele piscicole (fig. 5.1) este filtrată mai întâi de un filtru tambur cu o dimensiune a ochiurilor de 40 micrometri; apa la ieșire din acest filtru tambur este pompata peste un filtru de scurgere iar la ieșire din filtru este colectata într-un rezervor pompa. Din acest rezervor apa circula printr-un skimmer de proteine. Oxigenul este adaugat continuu in apa care este pompată in aceste bazine.





Fig. 5.1 Sistem de crestere Ferma 1

Ferma 2 Yerseke are bazine de crestere a calcanului de  $65 \text{ m}^2$  (32 m lungime x 2 m latime x 0,20 m adâncime) conectate la un filtru tambur de  $40\mu\text{m}$  și un biofiltru format din paturi plutitoare.

A fost folosit ozon pentru a dezinfecata apa; rata de înprospătare a fost de 8x volumul pe oră.

Fotoperioada a fost de 24Z:0N peștii fiind hrăniți de 5 ori pe zi o cantitate de hrana echivalentă cu 0,5% din greutatea corporală pe zi. Hrana a fost distribuită computerizat. Hrana a fost furnizată de către Skretting până la 10 august și apoi de Biomar până la sfârșitul experimentului.



Sistemul

recirculant de acvacultură la Ferma 2 este diferit (fig. 5.3 și fig. 5.4). Acest sistem are calea de rulare cu opt bazine unul deasupra altuia. Apa trece la fiecare bazin printr-un filtru cu tambur (drum filter) și apoi printr-un alt filtru (bead filter). După aceste filtrații apa este îmbogățită cu oxigen înainte de a

trece la stratul următor. La sfârșitul trecerii apei prin cele opt bazine apa trece printr-un filtru cu tambur (ultimul filtru) și apoi bea filtru după care apa trece printr-un separator cu ozon. După separator apa este pompată înapoi la cel mai înalt strat.

Fig. 5.3 Sistem creștere Ferma 2

#### 5.2.2. Materialul biologic

Pentru acest experiment materialul biologic folosit a fost calcanul (*Psetta maxima*) produs în Franța.

La Ferma 1 Yerseke au fost populate bazinele cu puiet de calcan cu vârsta de 157 zile și cu o greutate medie de 18,9g. Acești pești la vârsta de 107 zile și cu o greutate cuprinsă între 9-10g au fost vaccinați în Franța o singură dată cu un vaccin cu 5 tulpini (*Vibrio anguillarum* 1+2, 2 tulpini *Aeromonas salmonicida* și *Edwardsiella tarda*). Înainte de popularea bazinelor peștii au fost ținuți în carantină pe o perioadă de 3 luni.

La Ferma 2 Yerseke bazinele au fost populate cu puiet de calcan cu vârsta de 143 zile și o greutate medie de 13,8g. Acești pești au fost vaccinați în Franța la vârsta de 114 zile cu o singură doză de vaccin conținând tot 5 tulpini (*Vibrio anguillarum* 1+2, 2 tulpini *Aeromonas salmonicida* și *Edwardsiella tarda*). Înainte de începerea experimentului peștii au fost ținuți în carantină 3 luni într-un bazin din beton conectat la un alt RAS și au fost hrăniți pe această perioadă cu hrană sub

forma de granule extrudate expandate (Skterttting) de 3mm calculandu-se 1,9% din biomasa .

### 5.2.3. Alimentația peștilor

Pentru acest experiment pestii au fost hraniti cu acelasi tip de hrană uscată tip granular de la firma Biomar si Skrettin.

Pe perioada de carantină pestii din Ferma 1 Yerseke au fost hrăniti cu granule extrudate expandate de 3mm tip Skretting rația zilnică reprezentand 2,1% din greutatea medie. Pestii din Ferma 2 Yerseke pe perioada carantinei de 3 luni au fost hraniti cu acelasi tip de hrană de la Skretting dar rata zilnică a reprezentat 1,9% din biomasa totală. Pestii de la Ferma 2 au fost hraniti cu acest tip de hrană până in august 2010 după care a fost inlocuită cu hrana de la firma Biomar. Rata de hranire a crescut treptat la 0,5% odată cu cresterea pestiilor.

Compozitia hranei folosită în alimentatia peștilor din Ferma 1 și Ferma 2 contine: 50% proteine și 22% lipide.

La Ferma 1 si Ferma 2 Yerseke pestii au fost hraniti cu hrană uscată de tip granular de la firmele Biomar si Skretting.

Pentru Ferma 1 fotoperioada a fost de 17Z:7N. Pestii fiind hraniti de 4 ori pe zi folosind alimentatoare tip ceas alimentate manual. Rația zilnică distribuită a fost de 0,5% din greutatea corporală pe zi.

La Ferma 2 s-au folosit 2 tipuri de furaje de tip granular. Pentru perioada de inceput mai exact pana pe 10 august s-a adminstrat calcanilor hrana de la firma Skrettin iar pentru restul perioadei experimentale pestii au fost alimentati cu hrana produsa de firma Biomar, la fel ca cea folosita in alimentarea pestilor de la Ferma 1. Fotoperioada, pe toata perioada experimentului, a fost de 24Z:0N iar pestii au fost hrăniți de 5 ori pe zi o cantitate de hrana echivalentă cu 0,5% din greutatea corporală pe zi. Hrana s-a distribuit folosind un sistem automat computerizat.

### 5.2.4. Prelevarea probelor

S-au recoltat următoarele probe: apă, intestinul peștilor (conținutul și mucusul) și furajele folosite în alimentația lor. S-a folosit puiet de calcan cu o greutate cuprinsă între 19 și 27 grame. Recoltarea de probe s-a făcut conform programului dinainte stabilit pe o perioadă de 1 an din diferite puncte timp de 12 săptămâni între 10-12:00 dimineața și apoi au fost analizate în vederea determinării compoziției microbiene existente.

Tabel nr. 5.6 Total număr probe recoltate Ferma 1 și Ferma 2

Denumire probe	Ferma 1	Ferma 2	Total
Hrana peste	6	5	11
Apa	15	12	27
Conținut intestinal	50	50	100
Mucus intestinal	50	50	100
Total	121	117	238

#### 5.2.5. Managementul calității apei tehnologice

Deoarece peștii sunt total dependenți de apă pentru funcțiile de respirație, alimentație, creștere, menținerea unui echilibru de salinitate și reproducție, cunoașterea parametrilor fizico-chimici ai apei este critică pentru o piscicultură de succes. Într-o mare măsură apa determină succesul sau eșecul unei culturi piscicole, având în vedere că peștii își îndeplinesc toate funcțiile lor biologice în apă (De, H.K., Saha, G.S., 2001).

La fiecare 3 luni a fost monitorizată calitatea apei din inflow și tank (bazin) măsurându-se direct la ferma parametrii fizici și chimici.

##### *5.2.5.1. Parametrii fizici*

Pentru măsurarea oxigenului dizolvat, a temperaturii și pH-ului s-a utilizat un echipament HQ 40D multimeter (Hach Lange, Tiel, The Netherlands). Turbiditatea a fost măsurată cu ajutorul aparatului numit: Portable Turbidimeter Model 2100 PSO.

Parametrii TS și TSS au fost măsurati utilizând standardul APHA metodele 2540, D&E, respectiv (Eaton et al., 2005). Distribuția granulometrică a fost măsurată pentru ambele ferme utilizând număratorul cu laser Counter Ankersmid pentru cuantificarea în probele de apă.

#### *5.2.5.2. Parametrii chimici*

Azotul amoniacal total (TAN), azotii ( $\text{NO}_2\text{-N}$ ) și azotații ( $\text{NO}_3\text{-N}$ ) au fost măsurați utilizând DR/890 Colorimeter (Hach Lange).  $\text{CO}_2$  a fost măsurat utilizând un instrument numit  $\text{CO}_2$  meter (Ijmuiden). Salinitatea a fost măsurată cu conductimetru HQ14d conductivity meter (Hach Lange).

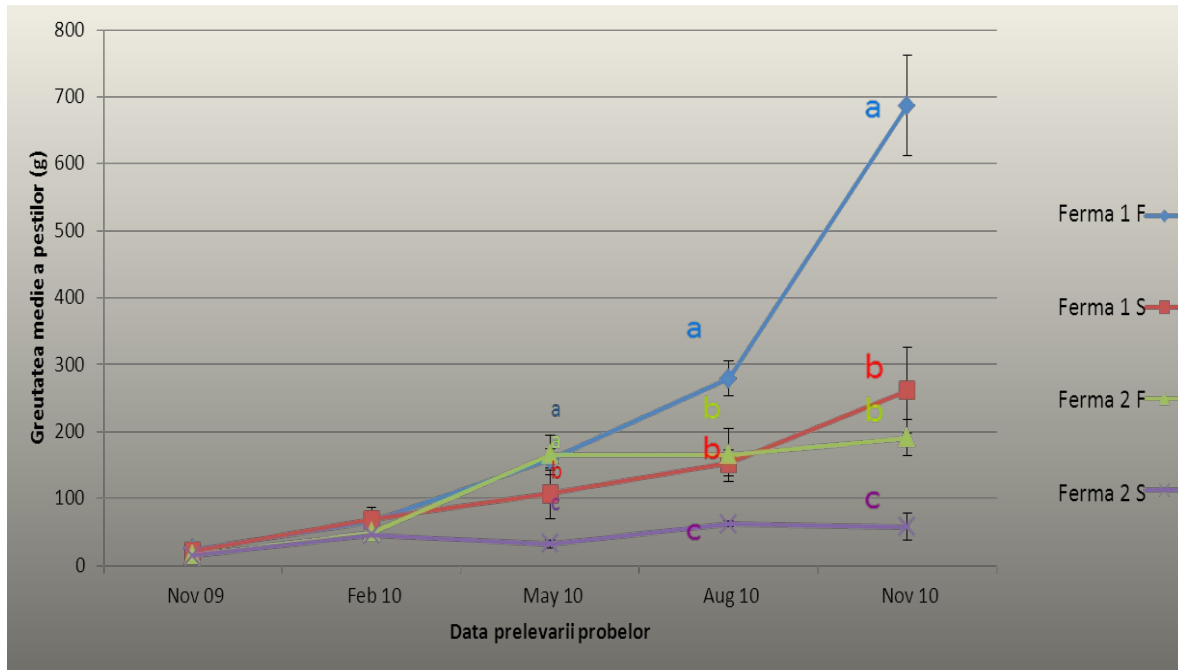
Pentru măsurarea altor parametri, probele de apă au fost transferate în laborator. S-au recoltat probele de apă în sticle de plastic care au fost păstrate în gheață pe toată perioada transportului până la laboratorul de analize. La laborator s-au mai analizat: compoziția biochimică a oxigenului la 5 zile ( $\text{BOD}_5$ ) utilizând metoda APHA 5210.B și carbonul organic total (TOC) utilizând metoda Shimadzu.

#### 5.2.6. Metode și tehnici de laborator utilizate în analiza microbiotelor

Metodele și tehnicile au fost aplicate conform procedurii descrise la cap. 4.

### **5.3. Rezultate și discuții**

#### 5.3.1. Caracterizarea indicatorilor tehnologici



Peștii prelevați din Ferma 1 Yerseke au fost mai mari comparativ cu cei din Ferma 2 Yerseke ceea ce înseamnă că peștii au crescut mai bine în ferma menționată. Pe parcursul lucrării se vor corela aceste rezultate cu cele obținute la celelalte analize.

### 5.3.2. Calitatea apei tehnologice

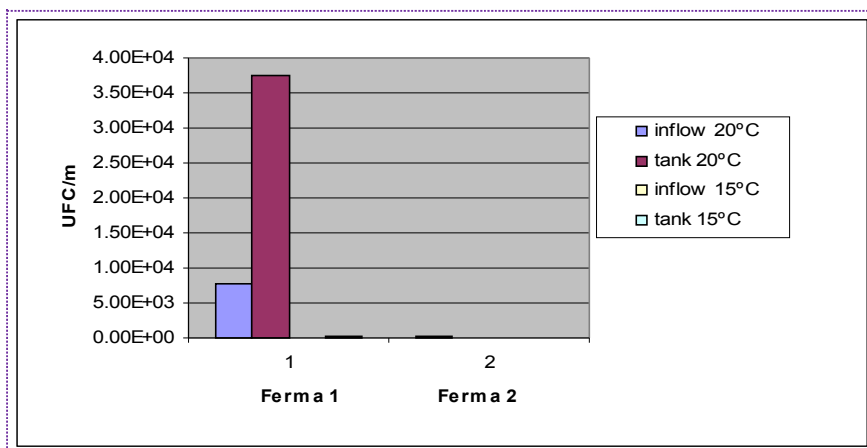
În general, între valorile medii ale parametrilor fizici și chimici ai apei prezentate în tabelul de mai sus nu a fost observate diferențe semnificative între aflusul de apă (inflow) și apa de cultură (tank). Diferențe semnificative au fost observate la: salinitate, solide totale (TS) și solide totale în suspensie (TSS).

La Ferma 2 cele mai mari valori sunt ale BOD<sub>5</sub> ce au fost înregistrate în timpul perioadei de carantină (12.4 mg/l în noiembrie 2009 și 15,8 mg/l în luna

februarie 2010). În noiembrie 2009 peștele a fost stocat într-un rezervor de beton al unui sistem recirculant altul decât cel utilizat în timpul perioadei experimentale. La sfârșitul perioadei experimentale, în noiembrie 2010, cea mai mare valoare BOD<sub>5</sub> a fost înregistrată la Ferma 1 (din tank) având 44 mg/l iar la Ferma 2 valoarea a fost numai de 12,0 mg/l. Valoarea mare ale BOD<sub>5</sub> în apă reflectă activități microbiene ridicate la Ferma 1 comparativ cu Ferma 2. Nivelurile de amoniac și nitriți au rămas scăzute în ambele ferme indicând o bună funcționare a biofiltrului. Un conținut ridicat de oxigen dizolvat (O<sub>2</sub>) a fost măsurat în apa de cultură (tank). Producția de CO<sub>2</sub> în bazinele de creștere (tank) a fost în creștere datorită prezenței peștilor, comparativ cu afluxul de apă (inflow water), iar creșterea a fost mai importantă la Ferma 1 decât la Ferma 2. La Ferma 2 nivelurile ridicate de CO<sub>2</sub> au fost, de asemenea, măsurate în afluxul de apă (inflow water) ceea ce înseamnă că CO<sub>2</sub> nu a fost, probabil, eliminat în cursul proceselor de purificare a apei.

Valorile ridicate ale solidelor în suspensie (TSS) au fost înregistrate în afluxul de apă (inflow) de 98.89 mg/l și în apa de cultură (tank) de 103.5 mg/l. Valorile au fost măsurate la Ferma 1 Yerseke la probele de apă prelevate în luna august 2010. Valoarea ridicată a substanțelor solide în apă a fost explicată prin prezența de pulberi în hrana utilizată în aceea perioadă (Skretting). În noiembrie 2010, valorile TSS au fost mult scăzute și anume 54,8 mg/l în inflow respectiv 52.5 mg/l la tank. O investigație mai atentă a particulelor din probele de apă cu ajutorul unui contor cu laser (Ankersmid) a arătat o concentrație de particule de dimensiuni diferite și o distribuție diferită a acestora în apă la cele 2 ferme. Au fost înregistrate mai multe particule pe unitatea de volum de apă la Ferma 1 comparativ cu Ferma 2. De asemenea, particulele au prezentat o gamă mai largă de dimensiuni la Ferma 1.

5.3.3.



Caracterizarea microbiotei din apă

Fig. 5.7 Evolutia coloniilor în prima zi la cele 2 ferme

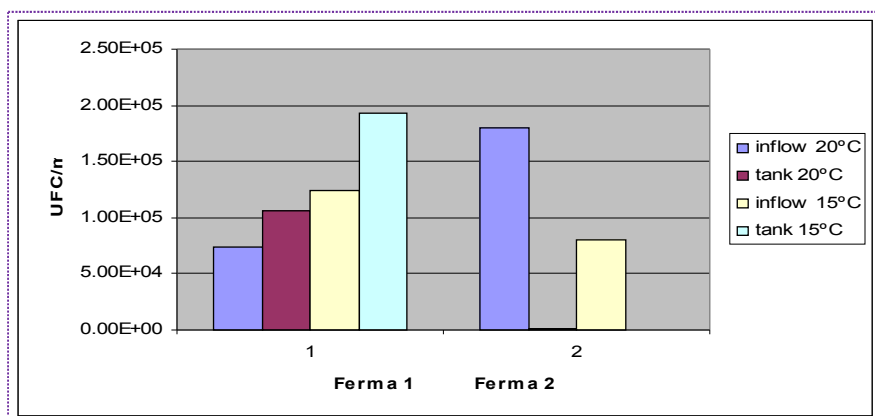




Fig. 5.8 Evolutia coloniilor în a 3 a zi la cele 2 ferme

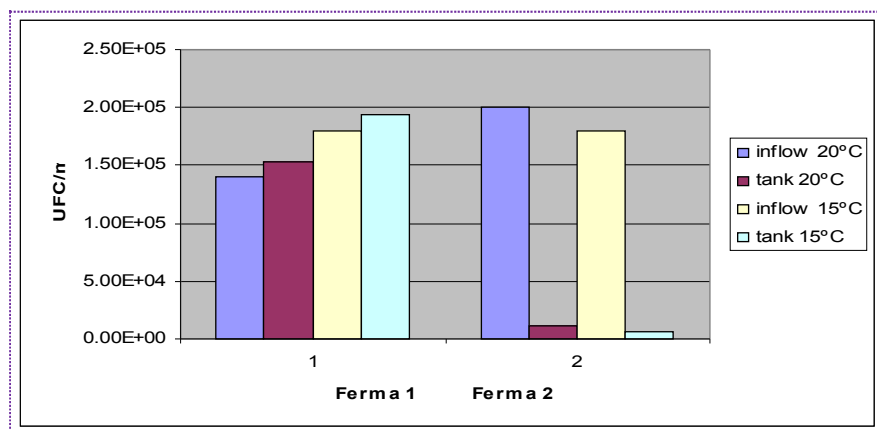


Fig. 5.9 Evolutia coloniilor în a 9 a zi la cele 2 ferme

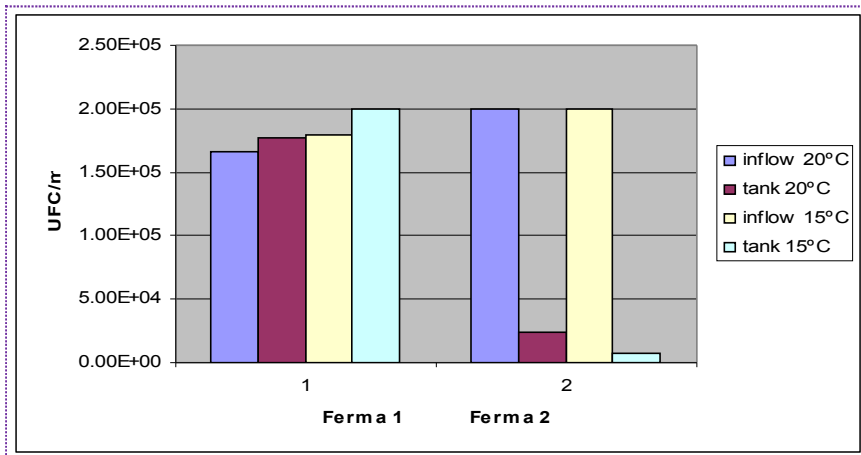


Fig. 5.10 Evolutia coloniilor in a 21 a zi la cele 2 ferme

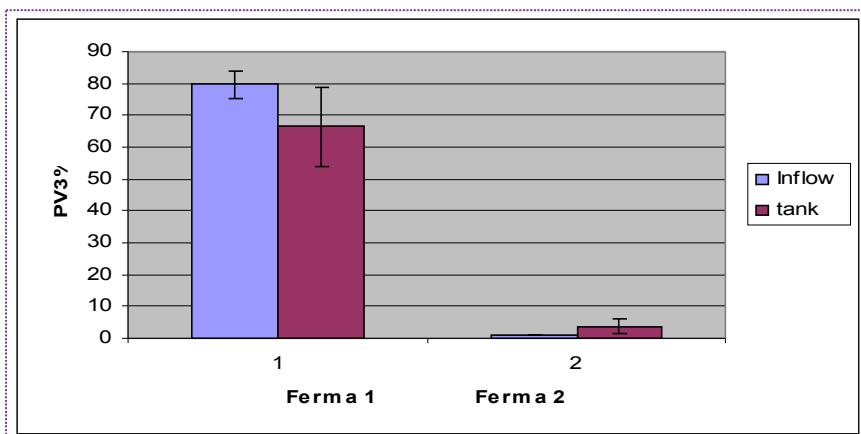


Fig. 5.15 Variația raportului de creștere al bacteriilor la 20°C

pentru ambele ferme

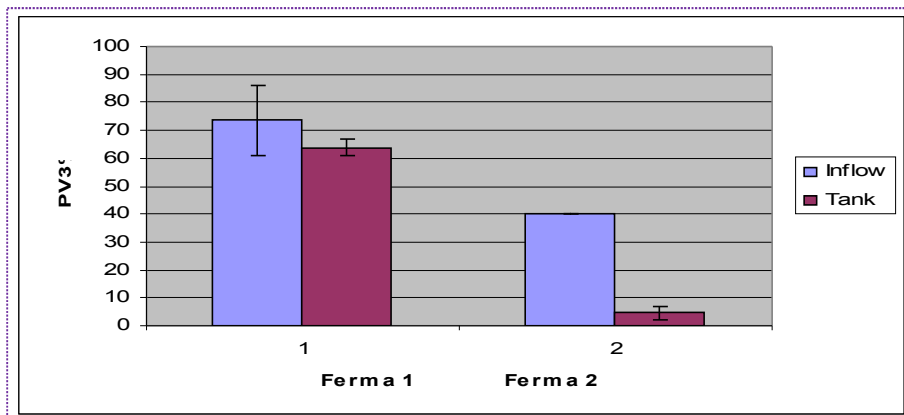
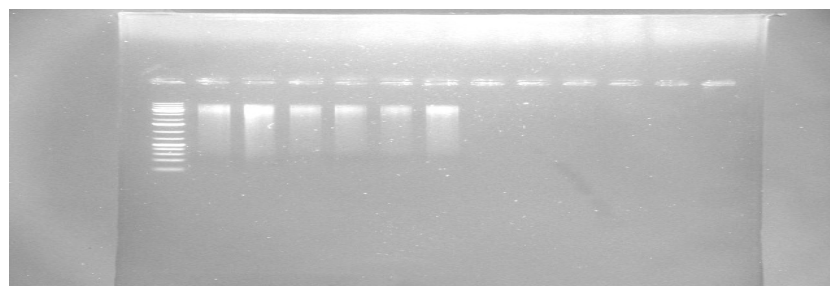


Fig. 5.16 Variația raportului de creștere al bacteriilor la 15°C

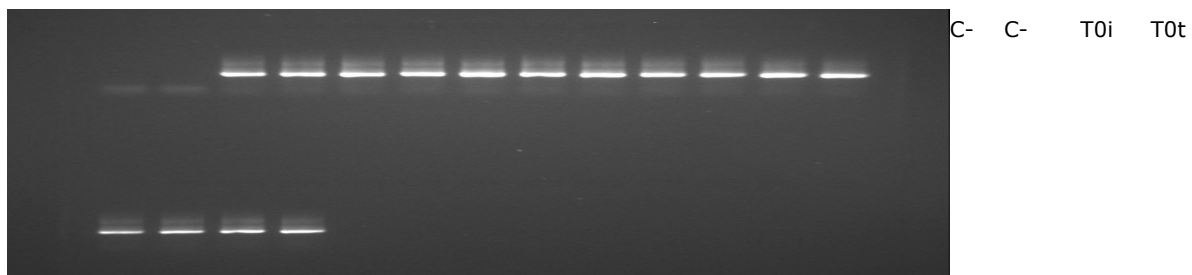
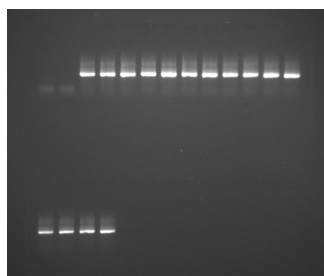
pentru ambele ferme



1Kb F6/1

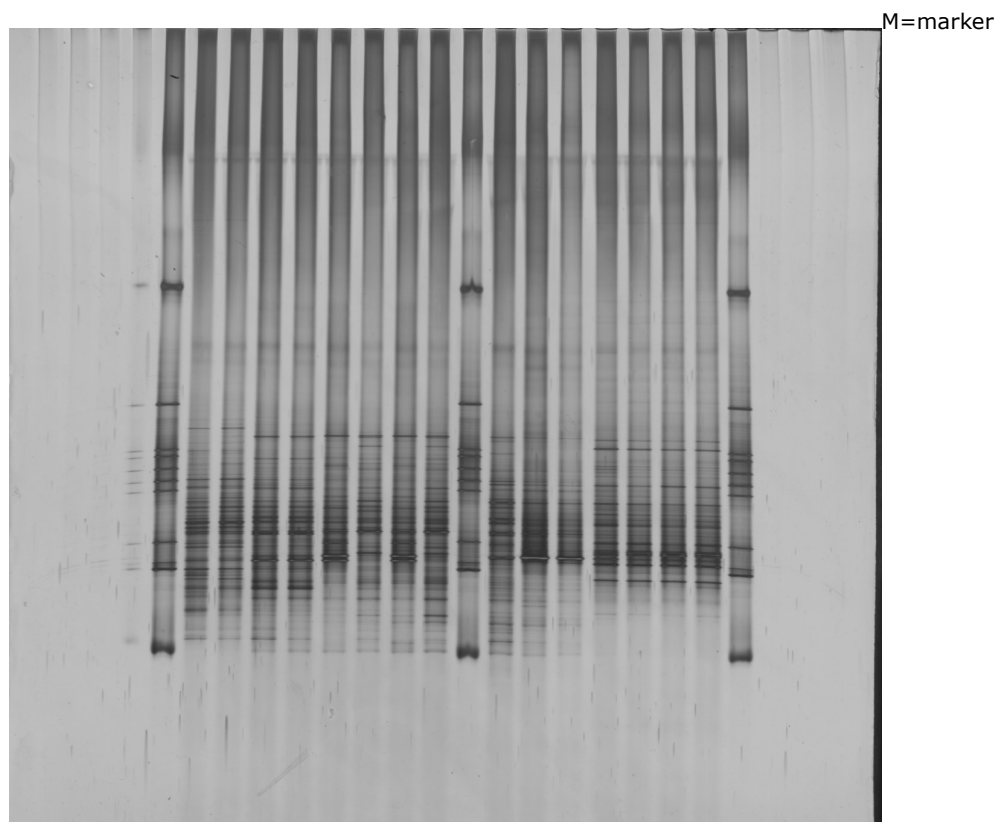
F7/1 F8/1 F5/2 F6/2 F7/2

Fig. 5.22 ADN pentru probele de apă Ferma 1 și 2



T12i T12t T24is T24if T24ts T24tf T37i T37ts T37tf T48i T48ts T48tf T48ad

Fig. 5.23 Rezultatul reacției PCR la probele de apă de la Ferma 1



- 1=inflow T0
- 2= tank T0
- 3=inflow T12
- 4= tank T12
- 5= inflow s T24
- 6= inflow f T24
- 7= tank s T24
- 8= tank f T24
- 9= inflow T37
- 10= tank s T37
- 11= tank f T37
- 12= inflow T48
- 13= tank s T48

14= tank f T48

15= tank \* T48

Fig. 5.25 Gelul DGGE la probele de apă din Ferma 1

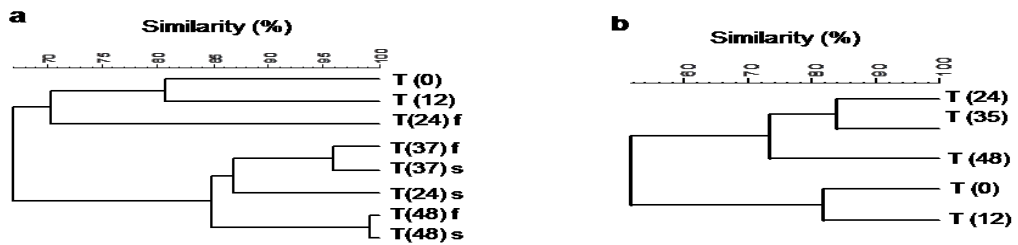


Fig. 5.27 Clustere pentru probele de apă (a. Ferma 1, b. Ferma 2)

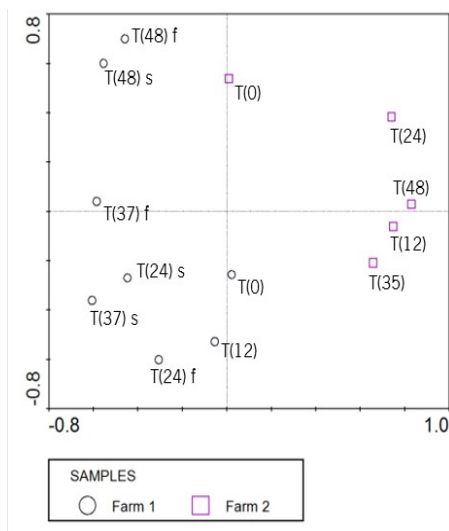


Fig. 5.28 Distribuția multivariată a probelor de apă (Ferma 1, Ferma 2)  
(s: lent, f:rapid).

#### 5.3.4. Caracterizarea microbiotei din hrană

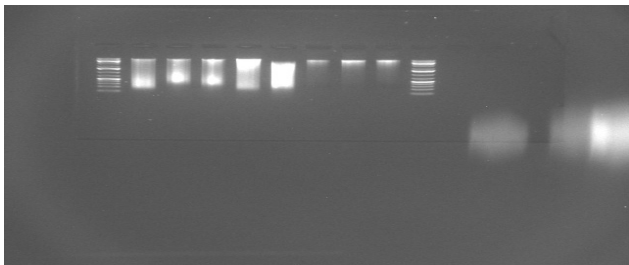


Fig. 5.29 ADN-ul probelor de hrană de la cele 2 ferme  
C- C- C+ TO T12 T24 T37 T48F T48S T0 T12 T24 T35 T48

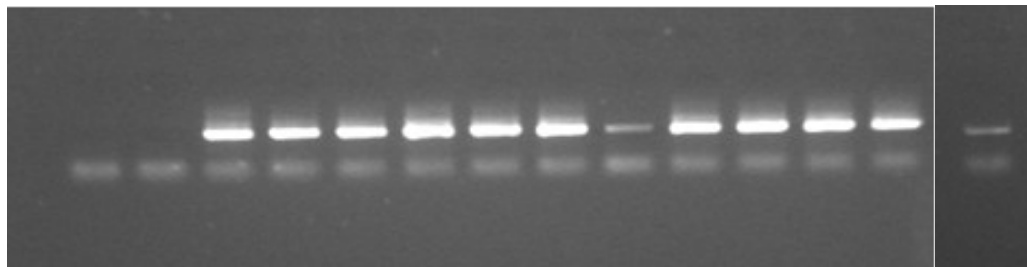
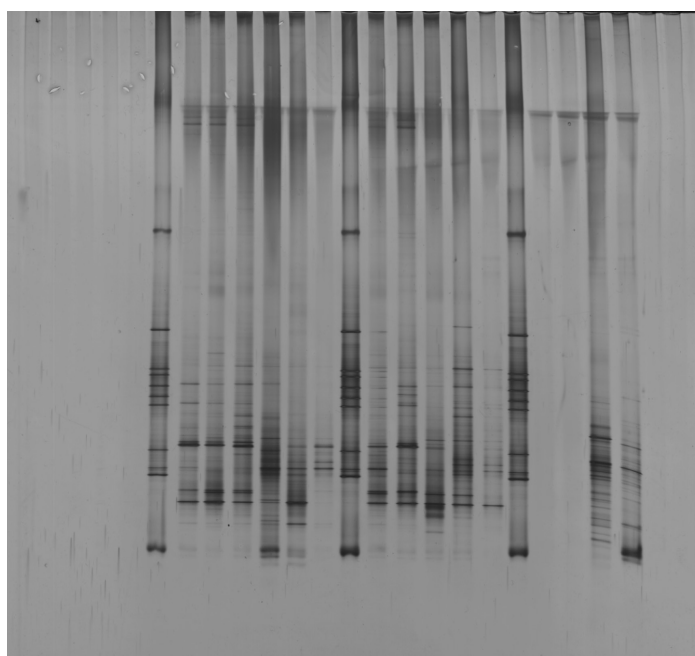


Fig. 5.30 Electroforeza compusilor obtinuti in urma reactiei PCR

la probele de hrana



M=marker

- 1= FE 1/T0 Ferma 1
- 2= FE 2/T12 Ferma 1
- 3= FE 3/T24 Ferma 1
- 4= FE 4/T37 Ferma 1
- 5= FE 5/T48 f Ferma 1
- 6= FE 6/T48 s Ferma 1
- 7= FE 1/T0 Ferma 2
- 8= FE 2/T12 Ferma 2
- 9= FE 3/T24 Ferma 2
- 10= FE 4/T35 Ferma 2



11= FE 5/T48 Ferma 2

Fig. 5.31 Gelul DGGE al probelor de furaj din fermele 1 si 2

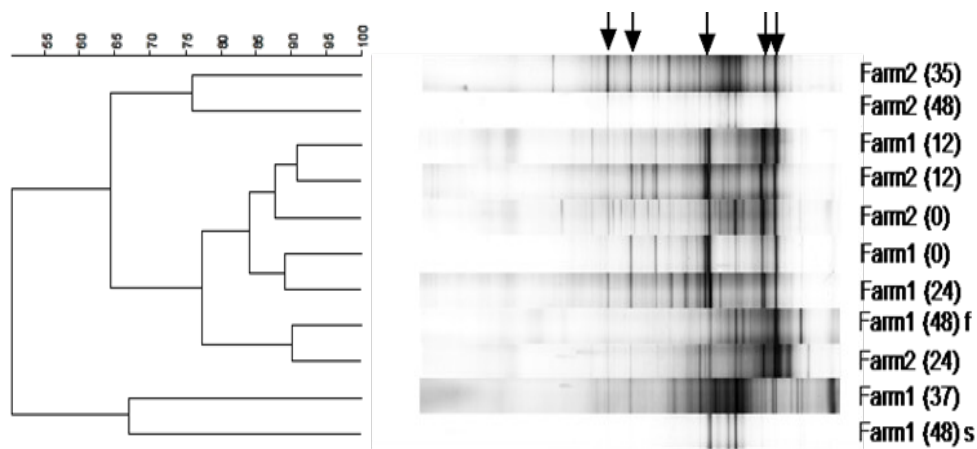
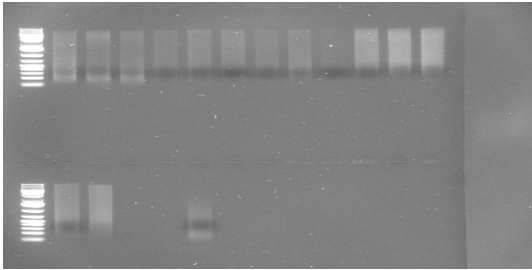


Fig. 5.32 Clusterul probelor de furaj la cele 2 ferme

(s:lent; f: rapid)

5.3.5. Caracterizarea microbiotei din



intestinul pestilor

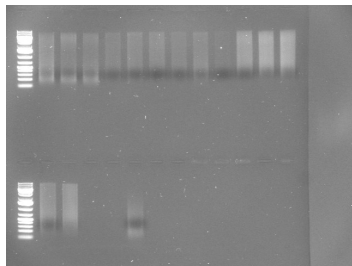
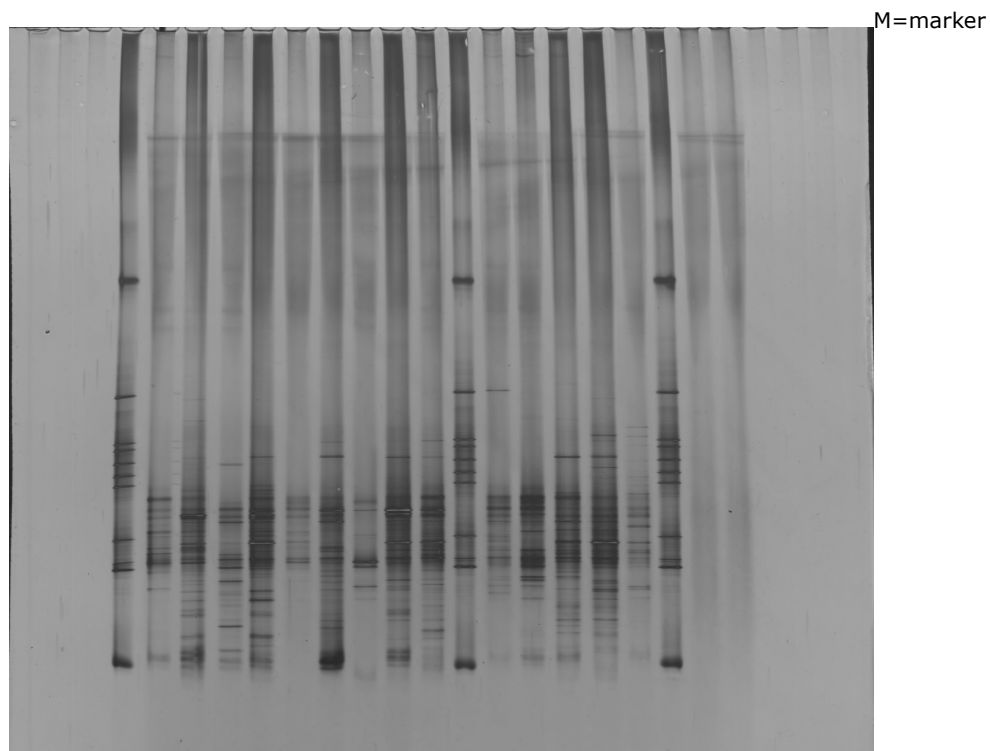


Fig. 5.33 ADN-ul probelor de mucus și conținut intestinal de la cele 2 ferme



1=1/ T0

2= 2/ T0

3= 3/ T0

4= 4/ T0

5= 7/ T0

6= 1/ T12

7= 2/ T12

8= 3/ T12

9= 4/ T12

10=1/ T24

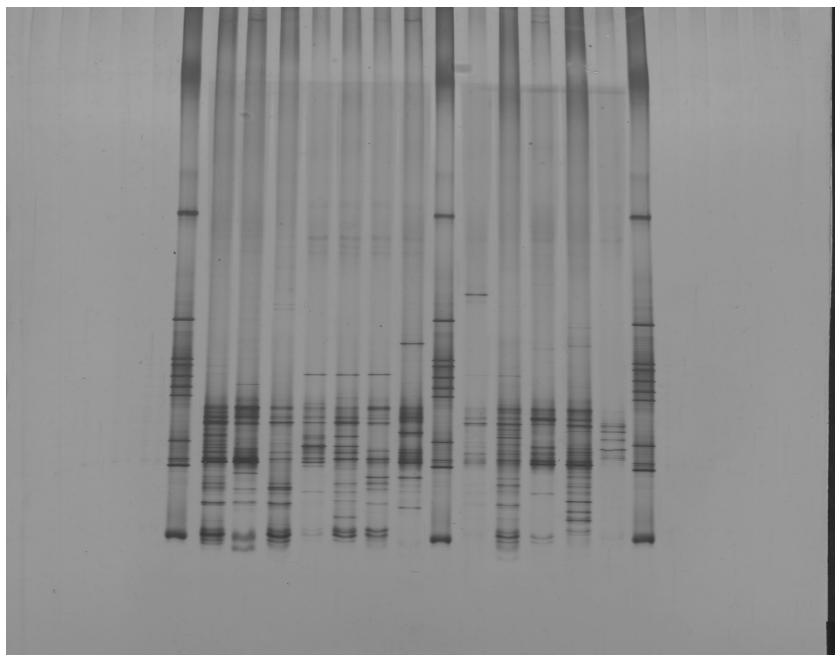
11=2/ T24

12=3/ T24

13=4/ T24

14=5/ T24

Fig. 5.37 Gelul DGGE al probelor de conținut intestinal din Ferma 1



M=marker

- 1=3/ T0
- 2= 4/ T0
- 3= 7/ T0
- 4= 8/ T0
- 5= 4/ T12
- 6= 8/ T12
- 7= 2/ T12
- 8= 5/ T24
- 9= 6/ T24
- 10=7/ T24
- 11=8/ T24
- 12=10/ T24

Fig. 5.38 Gelul DGGE al probelor de conținut intestinal din Ferma 2

a.

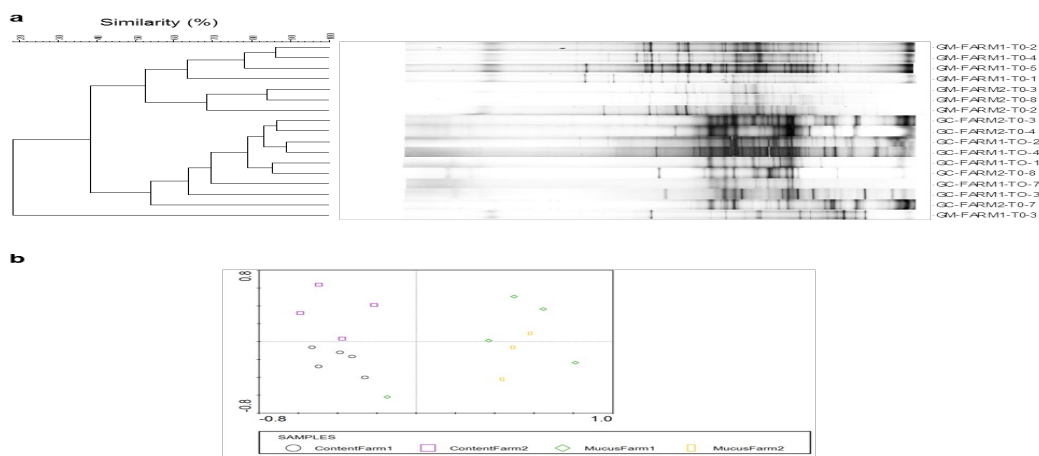


Figure 2.1.1. (a) UPGMA dendrogram showing similarity of DGGE profiles of the gut mucus (GM) and gut content (GC) samples in fish of the two farms at initial time (T0). The numbers (1-8) indicate biological replicates (fish). (b) Principal component analysis (PCA) of generated by the analysis of DGGE. The first and second eigenvectors, plotted on the  $x$  and  $y$  axis, explained the 22.9% and 11.6% of the variation (thus, the 34.5% of the cumulative variation was explained).

b.

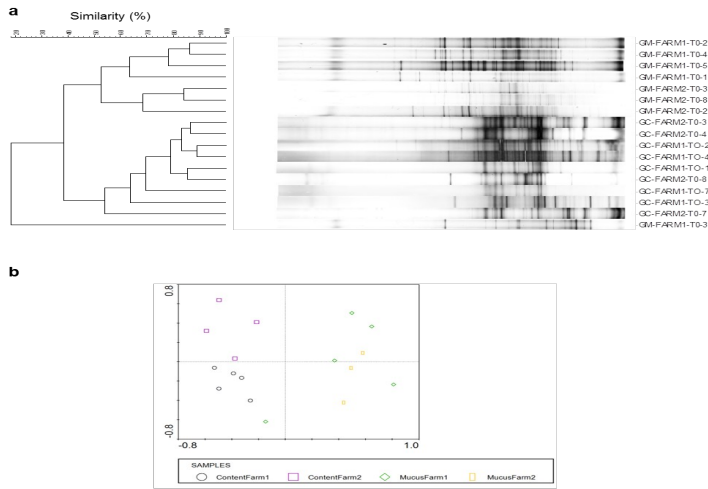


Figure 2.11. (a) UPGMA dendrogram showing similarity of DGGE profiles of the gut mucus (GM) and gut content (GC) samples in fish of the two farms at initial time (T0). The numbers (1-8) indicate biological replicates (fish). (b) Principal component analysis (PCA) of generated by the analysis of DGGE. The first and second eigenvectors, plotted on the *x* and *y* axis, explained the 22.9% and 11.6% of the variation (thus, the 34.5% of the cumulative variation was explained).

Continut intestinal Ferma 1    Continut intestinal Ferma 2  
Mucus intestinal Ferma 1    Mucus intestinal Ferma 2

Fig. 5.46 a. Cluster; b. PCA

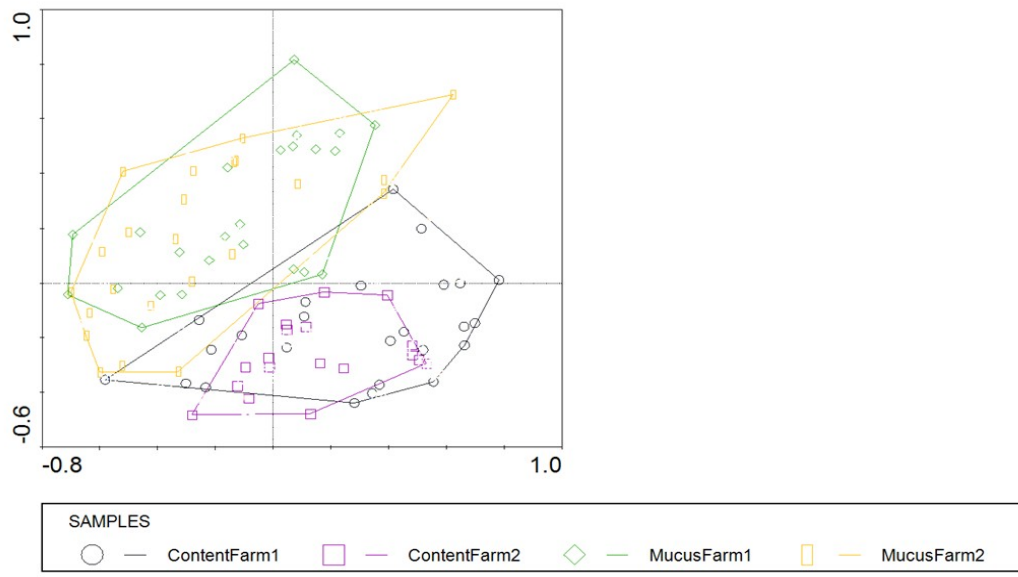


Figure 2.15. Principal component analysis (PCA) of gut microbial communities (content and mucus) data generated by the analysis of DGGE. All samples are included in this analysis. The first and second eigenvectors, plotted on the  $x$  and  $y$  axis, explained the 15.0% and 9.4% of the variation (thus, the 24.4% of the cumulative variation was explained).

Fig. 5.50 PCA pentru probele de mucus intestinal  
 Continut intestinal Ferma 1 Continut intestinal Ferma 2  
 Mucus intestinal Ferma 1 Mucus intestinal Ferma 2

#### 5.4. Rezultate si concluzii

Datele tuturor analizelor efectuate indică o încărcare cu materie organică mai mare la Ferma 1 comparativ cu Ferma 2. Aceste informații au fost confirmate încă de la început de numărul coloniilor mai mare la Ferma 1 comparativ cu Ferma 2.

Numărul mare de particule, cel puțin în fracțiunea dizolvată, susține creșterea de bacterii heterotrofe. Blancheton și Canaguier în experimentele realizate, au obținut, de asemenea, o creștere a concentrației bacteriene atunci când pulberile în suspensie au crescut în RAS.

Încărcarea ridicată de materii organice din bazinele cu pești (tank) a promovat intens selecția și creșterea bacteriilor oportuniste. În mod normal, creșterea acestora în mediul natural (mare) este destul de îngreunată. (Olafsen, 1993; Vadstein et al, 1993).

Restricțiile privind disponibilitatea nutrienților poate duce la inhibarea rapidă a creșterii bacteriilor oportuniste (R-strategi) prin selectarea bacteriilor non-oportuniste, care sunt mai bine adaptate la creșterea la concentrații mici ale substratului (K-strategi) (Skjeremo et al., 1997). În plus, dezinfecția puternică cu ozon (cazul Fermei 2) poate elimina cele mai multe bacterii din apă ceea ce explică numărul scăzut de bacterii. O doză de 0,2 mg/l ozon, ce corespunde un potențial redox de 300 mV, este frecvent utilizată pentru a menține o apă de calitate superioară în sistemele de creștere. În cazul în care această valoare este depășită, se pot distruge bacteriile din apă. Concentrațiile de ozon subletale (oxidanții produși în timpul ozonației apei de mare) induce modificari histologice și fiziologice la puietul de calcan (Reiser). Această observație, explică parțial creșterea lentă a peștilor pe perioada experimentală la Ferma 2.



Mai mulți factori dăunători precum: ozonul ce induce toxicitate, imunosupresia, schimbările în comunitatea microbiană, pot explica creșterea scăzută a peștilor la Ferma 2 după luna mai 2010. Numărul redus al bacteriilor la Ferma 2 poate fi de asemenea explicat prin rata mare de schimb de apă în comparație cu rata la Ferma 1. La o rată ridicată de înlocuire a apei în rezervoare, între 2 treceri prin unitatea de dezinfecție, timpul de rezidență este prea scurt pentru ca bacteriile libere să se poată dezvolta în mod considerabil. La Ferma 1 un număr mare de bacterii a fost descoperit în rezervorul de apă (tank) și afluxul de apă (inflow) datorită utilizării ozonului în limite normale.

Rezultatele sugerează o legătură între numărul de bacterii din apa de cultură, nivelul de dezinfecție a apei care trece prin biofiltru, materiile organice utilizate ca sursă de nutrienți și apa curată sau timpul de staționare în bazine. Cu toate acestea, ar trebui să se țină cont de faptul că mai puțin de 1% din totalul bacteriilor viabile în apă pot fi cultivate în condiții standard de creștere pe agar, acest raport fiind departe de populația existentă în RAS.

Aceste metode de cultivare a bacteriilor (CB), contează puțin dar pot fi un suport pentru metodele independente (PCR-DGGE-secvențiere). Deși parametrul  $PV_3$  ar putea fi interesant pentru anumite aplicații, cum ar fi controlul creșterii bacteriilor oportuniste în bazinele larvare (Skjeremo et al., 1997), utilizarea sa este pentru a descrie "apa microbiologic maturată" în anumite condiții (încărcare organică, dezinfectare) ar putea avea limitări care fac interpretarea acestui parametru foarte riscantă. Din acest motiv, am verificat mai întâi aplicabilitatea prezentului protocol la cazul nostru, prin compararea numărului de bacterii de la incubarea la 15°C și 20°C a probelor din cele 2 ferme. Am început, de asemenea verificarea plăcilor pentru numărarea coloniilor după 24 ore de la incubare până ce un număr stabil de UFC au fost numărate. Categoriec, nu s-au observat diferențe între temperaturile de incubare la cele două ferme (coloniile vizibile au fost numărate după 3 zile).

Comparând numărul de bacterii din rezervorul de apă (tank) și afluxul de apă (inflow) deducem că cele mai multe bacterii din apa de cultură provin de la

biofiltru. În ambele ferme s-a observat o asemănare mare între profilurile DGGE ale comunității microbiene din apa de cultură (tank) și din afluxul de apă (inflow), de asemenea, se confirmă faptul că biofiltrul a fost principala sursă de bacterii din apa de cultură, așa cum a fost deja demonstrat și raportat de către Léonard et al. (2000).

Doar cu datele descriptive disponibile pentru proiectarea RAS-ului la cele două ferme, este dificil să se concluzioneze o idee cu privire la impactul managementului asupra microorganismelor din sistem. Cu toate acestea, se pare că mai degrabă managementul aplicat, decât proiectarea sistemului, constituie un factor determinant pentru comunitatea microbiană din RAS. O analiză mai detaliată a compoziției microbiene poate oferi o confirmare în viitor.

Profilele gelurilor DGGE pentru probele de apă au arătat că a existat o schimbare în structura comunităților microbiene de la "condițiile inițiale" (aproximativ primele douăsprezece săptămâni) în comparație cu restul experimentului. Această perioadă corespunde cu sfârșitul perioadei de carantină, după care peștii au fost mutați în sisteme diferite pe tot parcursul experimentului. Aceste schimbări ar putea fi datorate diferitelor strategii de management a fermelor pe timpul perioadei experimentale (inclusiv sistemele de transfer, tipul de hrană, administrarea ozonului etc). De asemenea, acestea ar putea fi interpretate ca o indicație a unui "proces de maturare" a apei. În orice caz, trebuie să fie luat în considerare faptul că tehnicile de biologie moleculară aplicate (de extracție ADN-PCR-DGGE), au oferit o bună imagine de ansamblu a dinamicii comunității microbiene, dar nu informații d.p.d.v. calitativ despre bacteriile inactive/active existente în apă. O parte din benzile prezente în gelurile DGGE ale probelor de apă ar putea reflecta un flux al populației bacteriene din biofiltre la bazinele de creștere (de exemplu în timpul/după procesul de curățire al filtrelor); acest posibil transfer de material ar putea avea un impact asupra profilelor DGGE. Profilele identice obținute pentru inflow (afluxul de apă) și tank (apa de cultură din bazinele de creștere) ar putea sprijini parțial această explicație.

## CAPITOLUL 6

# **IMPACTUL ÎNCĂRCĂTURII ORGANICE DIN SISTEMELE RECIRCULANTE DE ACVACULTURA ASUPRA CREȘTERII PEȘTILOR**

## **6.1. Introducere**

Managementul încărcăturii organice în RAS este destul de complex cu repercursiuni directe asupra stării de sănătate a peștilor. Filtrarea mecanică este o metodă des folosită pentru a elimina particulele din RAS. Cu toate acestea microbiota din RAS colonizează particule rămase și le utilizează ca substrat pentru creșterea biomasei de celule microbiene. Microorganismele asigură la filtrarea biologică, degradează metaboliții peștilor și transformă alți compuși toxici în compuși mai puțin toxici.

Prin prezentul studiu s-au investigat efectele a două niveluri diferite de încărcare organică a RAS-ului asupra performanțelor creșterii peștilor din sistem. Principalul obiectiv al experimentului a fost de a evalua impactul a două niveluri diferite de încărcătură organică în RAS (LO=încărcătură organică scăzută; HO=încărcătură organică crescută) asupra calității apei și a comunității microbiene în aceste sisteme.

Cercetarile pentru Ferma 3 s-au efectuat în 4 module RAS cu tratamente diferite, cu un nivel scăzut și crescut de încărcatură organică, cu repetitii (în dublu exemplar).

Faza de experiment este împărțită în două perioade: în prima perioadă peștele va fi expus fie la o scădere (LO) sau o creștere (HO) a încărcăturii organice, pentru o perioadă de 8 săptămâni. În a doua perioadă, jumătate din peștii din fiecare varianta experimentală vor fi marcați și plasați într-un tratament diferit pentru încă 4 săptămâni de experiment. La 48 ore de la sfârșitul primei perioade de experiment, 2/3 din pești au fost mutați în rezervoare diferite unde peștele a fost expus la diferite condiții microbiene pentru o perioadă de 26 de zile conform planului experimental, cu încărcătură organică scăzută sau ridicată. O treime din pește a rămas în aceleași condiții de expunere rezultând patru grupe diferite de

pești și anume: L0-LO, H0>LO, H0-H0, L0>HO, aceste grupuri reprezentând perioada experimentală de fond înainte T8 și noua perioadă experimentală cu încărcatura organică după T8+48. Acest experiment testează pe termen scurt dacă expunerea la diferite încărcături microbiene afectează microbiota intestinală, sănătatea și performanțele peștilor.

## 6.2. Materiale și metode de cercetare

### 6.2.1. Sistemele de creștere

Experimentările s-au efectuat în 4 module RAS, în variante cu nivel scăzut (LO) și crescut de încărcare organică (HO), în duplicat (cu o repetiție). Un RAS corespunde unei unități experimentale. Fiecare RAS include trei bazine de 800 litri (fig. 6.1).

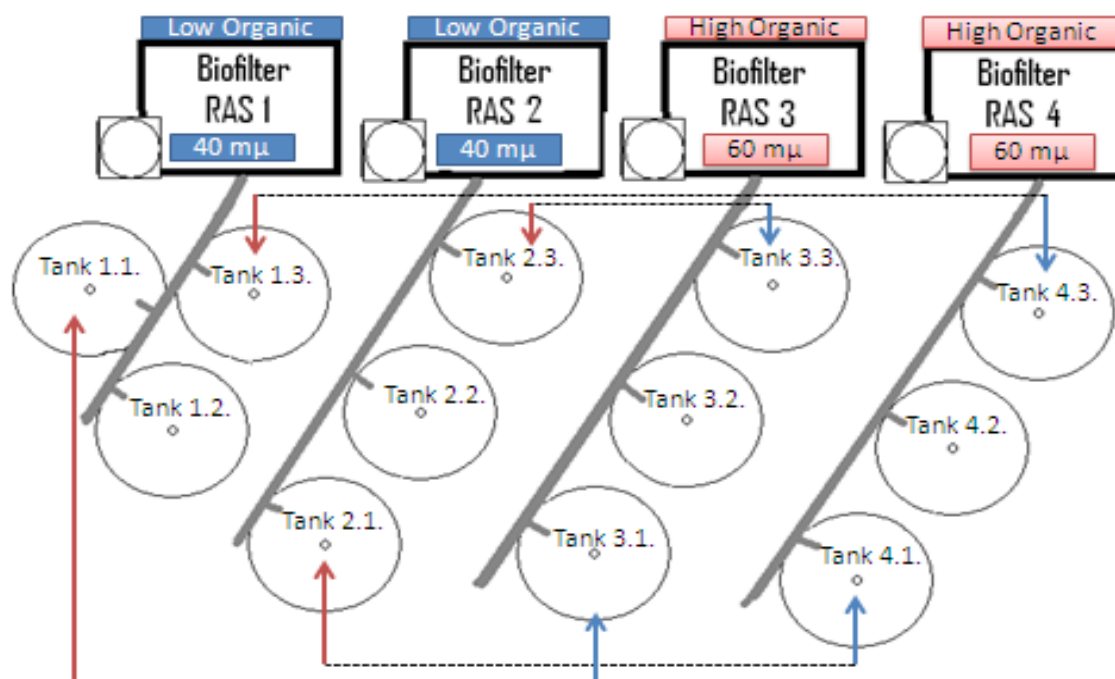


Fig. 6.1 -Schema sistemului experimental de la IMARES, Olanda

(Eugene Rurangwa)

Low organic= LO=incarcatura organica scazuta

High organic=HO= incarcatura organica crescuta

1=filtru cu tambur

Încarcarea organica în RAS are mai multe origini: hrana ramasă neconsumată, fecalele peștilor și bacteriile din biofiltru. Diferența de concentrație organica în RAS a fost creată prin utilizarea unor filtre cu ochiuri de dimensiuni diferite. În RAS 1 și RAS 2, dimensiunea ochiului de plasă al filtrului a fost de 40 micrometri realizand o incarcatura organica scazuta (LO); în RAS 3 și 4 RAS dimensiunea ochiurilor de plasă a biofiltrului a fost de 60 micrometri realizand conditii de incarcare organica crescuta (HO). O dimensiune mare a ochiurilor filtrului permite o reținere a particulelor in cantitate mai puțină comparativ cu filtrele cu o dimensiune mică a ochiurilor de plasă, contribuind astfel la creșterea încărcăturii organice în sistem. Pentru a completa diferența de încărcatura organica, a fost pornit skimmer-ul, când s-a ajuns la o stare redusă de încărcare, respectiv a fost oprit cand s-a ajuns la o încărcare organica mare. Skimmer-ul contribuie la eliminarea și dizolvarea deșeurilor din RAS.

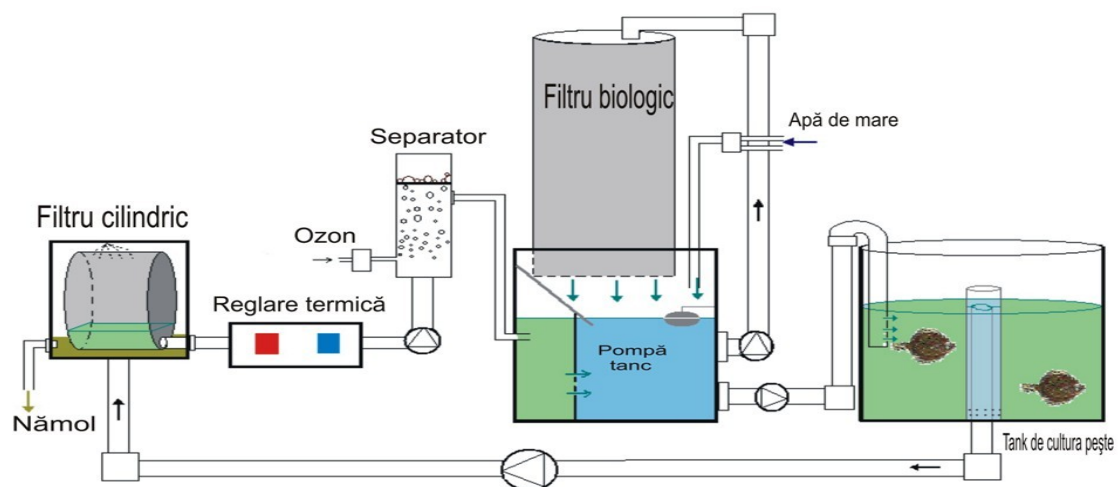


Fig. 6.3- Schema unui modul RAS – Ferma 3 Yerseke, Olanda



(Eug

ene Rurangwa)

Fig. 6.4 Sistem de creștere Ferma 3

### 6.2.2. Materialul biologic

Materialul biologic utilizat în acest experiment a fost calcanul (*Psetta maxima*), originar din Franța dar achiziționat de la Ferma 1 Yerseke, Olanda. Ei au fost sortați la Ferma 1 și livrați la Ferma 3 pentru următorul experiment. Peștii în vârstă de 107 zile și cu greutatea de 9-10g, au fost vaccinați în Franța o singură dată cu un vaccin cu 5 tulpini (*Vibrio anguillarum* 1+2 și 2 tulpini de *Aeromonas salmonicida* și *Edwardsiella tarda*). Peștii au fost stocați pentru scurt timp, pe perioada transportului, într-un rezervor de 5 m<sup>3</sup> cu temperatura apei de 18°C și salinitatea de 19 ppt. Apoi peștele a fost distribuit la întâmplare în bazine diferite pentru a minimiza efectul de sistem.

Fiecare bazin (tank) a fost populat cu 40 de pești cu masă corporală medie de  $167.5 \pm 24.6$  g reprezentând un total de 120 de pești în fiecare sistem RAS. Biomasa medie la stocare pe fiecare RAS a fost de  $20.1 \pm 0,2$  kg. La început peștele a avut o perioadă de aclimatizare în bazinele experimentale timp de o săptămână, înainte de a modifica configurația RAS-ului în vederea creării diferitelor condiții de încărcare organică înaltă și joasă (HO/LO).

### 6.2.3. Alimentatia pestilor

La Ferma 3 peștii au fost hrăniți cu furaje granulare tip Biomar. Furajele au fost în diametrul de 7 mm, 56% proteine și 14% lipide. Rația zilnică a reprezentat 1,3% din masa corporală.

Peștii au fost hrăniți manual de trei ori pe zi (la orele 10:00, 13:00 și 16:00) până la sațietate vizuală. Alimentatia a fost oprită atunci când 90% din peștii din bazine nu au mai fost activi la hrănire. Cu o zi înainte de prelevarea probelor, peștii au fost hrăniți o singură dată numai seara.

### 6.2.4. Prelevarea probelor

Pentru analiza cantitativa a microbiotei au fost recoltate probe de: apă, hrana, conținutul și mucusul intestinal. Probele au fost recoltate din diferite puncte, timp de 14 săptămâni, între 10:00-12:00 dimineața și apoi analizate în vederea determinării compoziției microbiene existente. Au fost recoltate 422 probe (tabelul 18).

Analizele microbiologice au fost efectuate la laboratorul de Microbiologie WUR Olanda. S-au folosit diferite tehnici: cultura în plăci, PCR, DGGE, analize statistice.

Tabelul 6.1 Total număr probe Ferma 3

Denumire probe	Număr probe
Hrana peste	6
Apa	60
Continut intestinal	178
Mucus intestinal	178
<b>Total</b>	<b>422</b>

#### 6.2.5. Managementul calității apei tehnologice

##### 6.2.5.1. Parametrii fizici

Calitatea apei a fost monitorizată zilnic urmărindu-se valorile parametrilor fizici. Pentru măsurarea concentrației oxigenului dizolvat, a pH-ului și temperaturii s-a utilizat aparatul Hach Lange HQ 40D. Salinitatea s-a măsurat cu Refractometrul; iar rata turbidității cu Turbidimeter Model 2100 PSO.

##### 6.2.5.2. Parametrii chimici

S-au făcut măsurători săptămânale pentru: azot amoniacal total (TAN); azotiti (nitrit nitrogen - NO<sub>2</sub>-N) și azotați (nitrat nitrogen - NO<sub>3</sub>-N) care au fost măsurati utilizând DR/890 Colorimeter (Hach Lange). Dioxidul de carbon (CO<sub>2</sub>) a fost măsurat utilizând un instrument numit CO<sub>2</sub> meter fabricat în Olanda. Pentru măsurarea parametrului TOC (carbon organic total) s-a aplicat metoda Shimadzu.



Pentru parametrii TS, TSS și VSS măsurătorile au fost realizate folosind metodologia APHA pentru apa de cultură (tank) și apa din filtrul de scurgere (inflow). Aceste măsurători au fost realizate în mod regulat o dată sau de două ori pe lună.

### 6.3. Rezultate și discuții

#### 6.3.1. Caracterizarea indicatorilor tehnologici

Tabelul – 6.6 Performanța creșterii calcanului, după primele două luni de creștere (T0-T8)

Bazinul	RAS 1			RAS 2			RAS 3			RAS4		
Repetitia	T 1.1	T 1.2	T 1.3.	T 2.1	T 2.2	T 2.3.	T 3.1	T 3.2	T 3.3.	T 4.1	T 4.2	T 4.3.
Capacitate bazine (l)	800	800	800	800	800	800	800	800	800	800	800	800
Numarul exemplare la populare	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
Numarul exemplare la recoltare	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
Supravietuirea (%)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Biomasa initiala (g)	6561	6669	6663	6720	6712	6600	6613	6811	6790	7013	6657	6580
Masa corporala medie initiala (g/ex)	164± 22,61	166,7± 26,74	166,6± 24,11	168,0± 23,74	167,8± 27,13	165,0± 25,38	165,3± 23,99	170,3± 24,83	169,8± 24,52	175,3± 20,46	166,4± 26,83	164,5± 6,57
Biomasa finala (g) – T8	13125, 2	13650	12225, 2	12925, 2	12050	12725, 2	12103, 2	11716	12464, 4	12826	12625, 2	11275,2
Masa corporala medie finala (g/ex), (T8)	328,13	341,25	305,63	323,13	301,25	318,13	302,58	292,9	311,61	320,65	315,63	281,88
Sporul de crestere	6564,2	6981	5562,2	6205,2	5338	6125,2	5490,2	4905	5674,4	5813	5968,2	4695,2
Hrana totala distribuita (g)	4881	5224	4575	4702	4382	4622	4559	4300	4546	4403	4533	3941
FCR (Coeficientul de conversie a hranei)	0,74	0,75	0,82	0,76	0,82	0,75	0,83	0,88	0,80	0,76	0,76	0,84

Ratia (%*masa corpului)	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3
Proteina bruta a furajului (%)	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56
PER (Raportul eficientei proteinelor) (g/g)	2,40	2,39	2,17	2,36	2,18	2,37	2,15	2,04	2,23	2,36	2,35	2,13
SGR (Rata cresterii specifice) (g*%/zi)	1,16	1,19	1,01	1,09	0,98	1,09	1,01	0,90	1,01	1,01	1,07	0,90

Tabelul 6.7 Performanta cresterii calcanului, la sfarsitul experimentului (T0-T12)

Bazinul	RAS 1			RAS 2			RAS 3			RAS4		
Repetitia	T 1.1	T 1.2	T 1.3.	T 2.1	T 2.2	T 2.3.	T 3.1	T 3.2	T 3.3.	T 4.1	T 4.2	T 4.3.
Capacitate bazine (l)	800	800	800	800	800	800	800	800	800	800	800	800
Numarul exemplare la populare	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
Numarul exemplare la recoltare	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
Supravietuirea (%)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Biomasa initiala (g)	6561	6669	6663	6720	6712	6600	6613	6811	6790	7013	6657	6580
Masa corporala medie initiala (g/ex)	164± 22,61	166,7± 26,74	166,6± 24,11	168,0± 23,74	167,8± 27,13	165,0± 25,38	165,3± 23,99	170,3± 24,83	169,8± 24,52	175,3± 20,46	166,4± 26,83	164,5± 26,57
Biomasa finala (g) (T12)	17344	18128	15704	17808	16128	18180	17568	15908	17476	15944	16564	16012
Masa corporala medie finala (g/ex), (T12)	433,6 ±26,9	453,2 ±76,4	392,6 ±82,3	445,2 ±86,0	403,2 ±104,9	454,5± 103,9	439,2 ±94,8	397,7 ±82,0	436,9 ±94,8	398,6 ±73,7	414,1 ±89,3	400,3 ±100,3
Sporul de crestere	10783	11459	9041	11088	9416	11580	10955	9097	10686	8931	9907	9432
Hrana totala distribuita (g)	7260	7619	6678	7027	6537	7013	6860	6348	6906	6383	6523	5908

FCR (Coeficientul de conversie a hranei)	0,67	0,66	0,74	0,63	0,69	0,61	0,63	0,70	0,65	0,71	0,66	0,63
Ratia (%*masa corpului)	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3
Proteina bruta a furajului (%)	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56
PER (Raportul eficientei proteinelor) (g/g)	2,65	2,69	2,42	2,82	2,57	2,95	2,85	2,56	2,76	2,50	2,71	2,85
SGR (Rata cresterii specifice) (g*%/zi)	1,08	1,11	0,95	1,08	0,97	1,13	1,09	0,94	1,05	0,91	1,01	0,99

In figura 6.5 este prezentata variatia biomasei pestilor din Ferma 3 in prima (a) si a doua perioada experimentală (b).

a) In prima perioadă experimentală T0-T8

b) In a 2 a perioadă experimentală T8+48h-T12

### 6.3.2. Calitatea apei tehnologice

Pe toata perioada experimantala s-au determinat urmatoorii parametrii fizico-chimici.

### 6.3.3. Caracterizarea microbiotei din apa

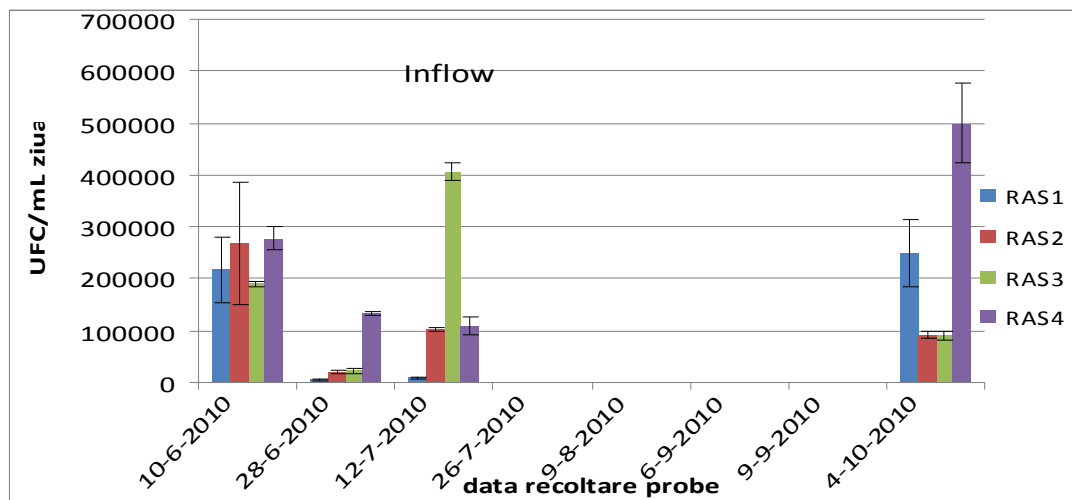


Fig. 6.16 Evolutia UFC din inflow in a 21 a zi la

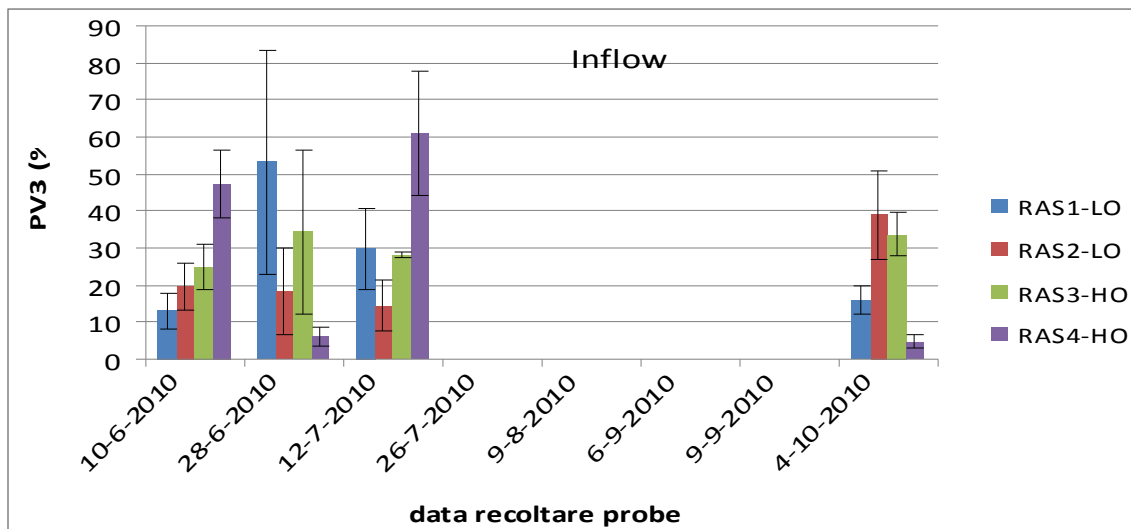


Fig. 6.18 Variatia PV3 pentru probele recoltate din inflow

1 Kb F37 F38 F39 F40 F41 F42 F43 1Kb F44

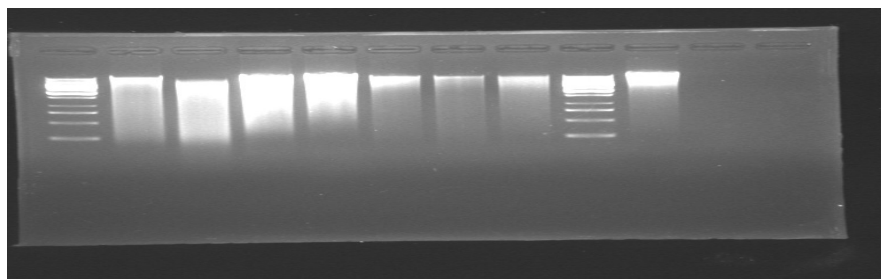


Fig. 6.19 ADN pentru probele de apă

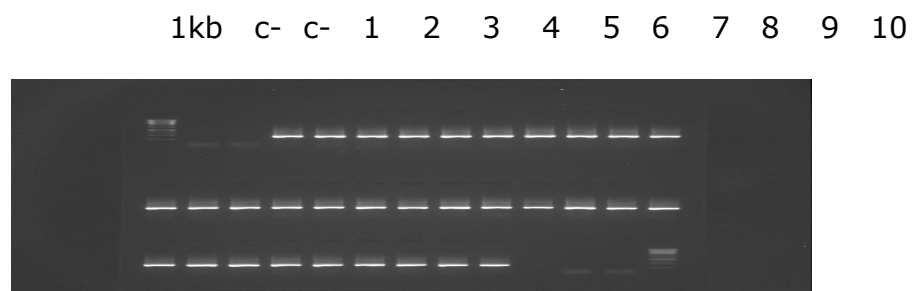


Fig. 6.20 Electroforeza compusilor obtinuti in urma reacției PCR  
la probele de apă

M 1 2 3 4 5 6 M 7 8 9 10 M

M=marker

1=RAS 1 inflow

2= RAS 1 tank

3= RAS 2 inflow

4= RAS 2 tank

5= RAS 3 inflow

6= RAS 3 tank

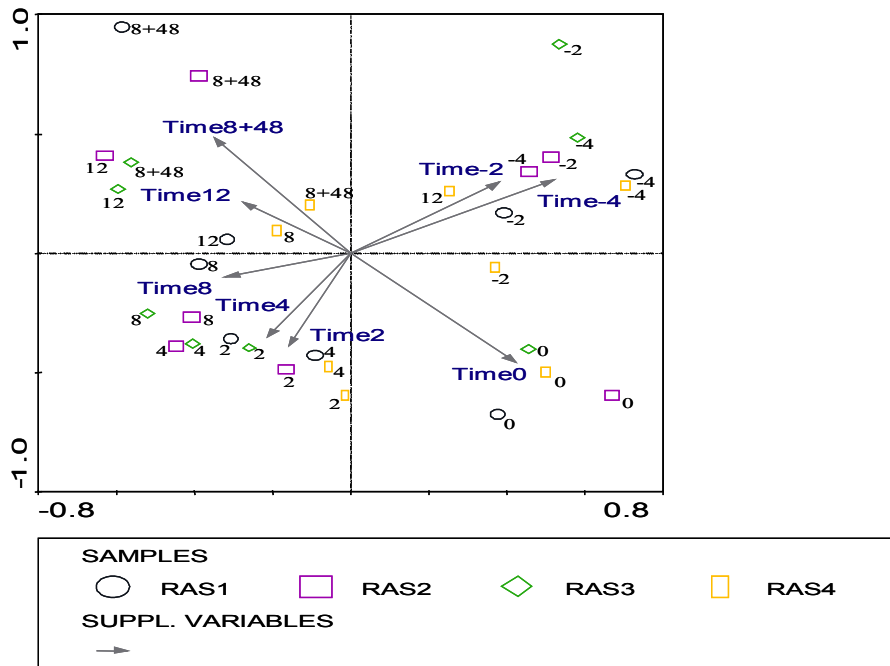
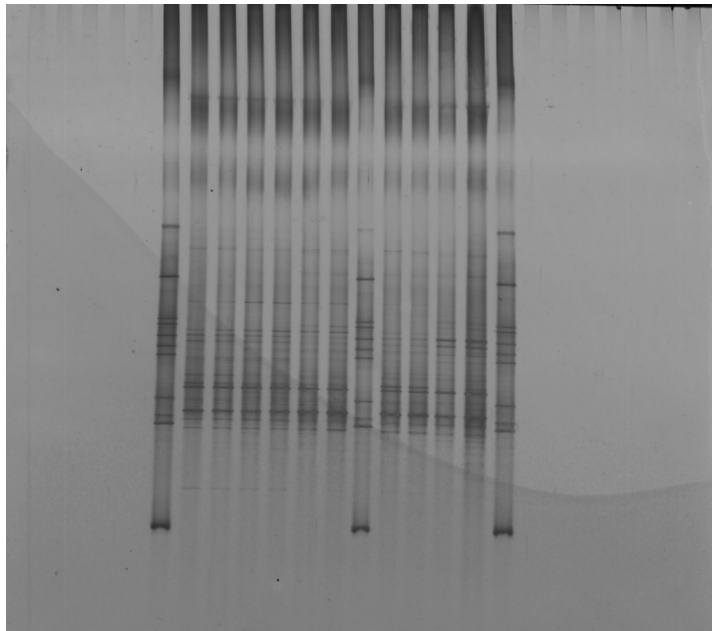
7= RAS 4 inflow

8= RAS 4 tank

9= RAS 5 inflow

10= RAS 5 tank

Fig. 6.21 Gelul DGGE la probele de apa la T-2



**RAS 1**   **RAS 2**   **RAS 3**   **RAS4**

Fig. 6.28 PCA pentru probele de apa din tank Ferma 3

6.3.4. Caracterizarea microbiotei din hrana pestilor

FD1      1KB

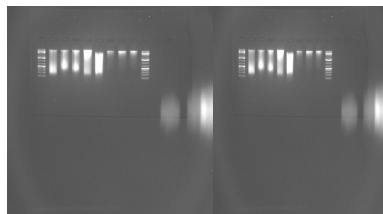
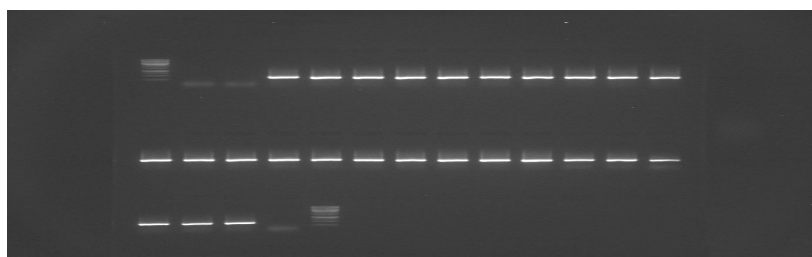
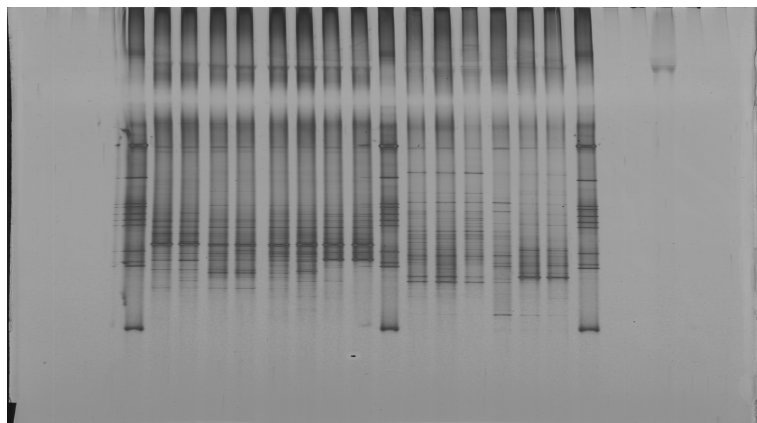


Fig. 6.29 ADN-ul probelor de hrană

1Kb    c-    c-    c+    1FD   2FD   3FD   4FD   5FD   6FD

Fig. 6.30 Electroforeza compusilor obtinuti in urma reacției PCR la probele de hrana





M 1 2 3 M 4 5 M

M=marker

1=FE 1/ T0

2= FE 2/ T2

3= FE 3/ T4

4= FE 4/ T8

5= FE 5/ T8+48h

6= FE 6/ T12

Fig. 6.31 Gelul DGGE al probelor de hrană

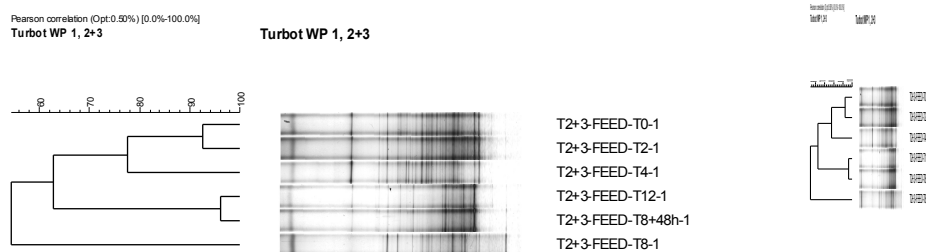


Fig. 6.32 Cluster pentru probele de furaj (Pearson43,58%)

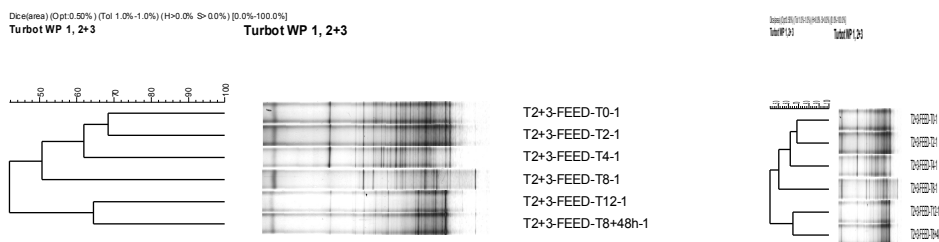
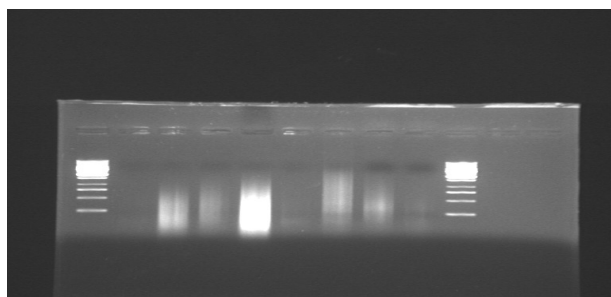


Fig. 6.33 Cluster pentru probele de furaj (Dice 41,69%)

6.3.5. Caracterizarea microbiotei din intestinul pestilor

1kb 1 2 3 4 5 6



Stool kit

Fig . 6.34 Vizualizare pe gel de agaroză al ADN-ului probelor de mucus si continut intestinal

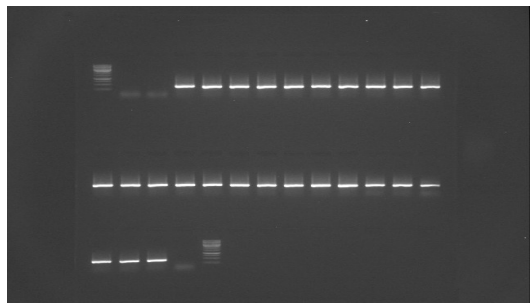
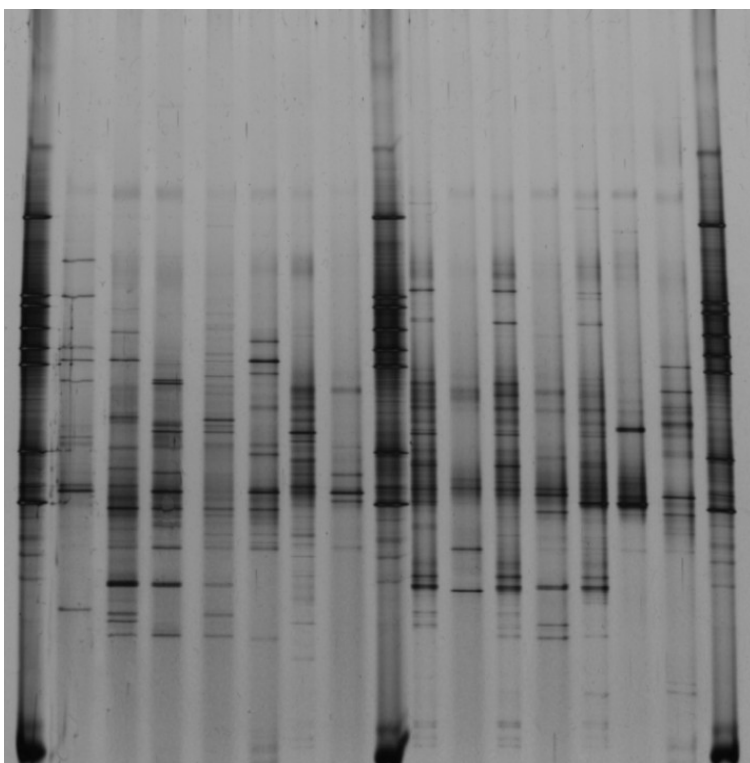


Fig. 6.36 Nested PCR pentru probele de mucus intestinal



M 1 2 3 4 5 6 7 M 8 9 10 11 12 13 14 M

1.13GM/ T0 RAS 1.1

2. 14 GM/ T0 RAS 1.1

3.15 GM/ T0 RAS 1.2

4.16 GM/ T0 RAS 1.2

5. 17 GM/ T0 RAS 1.3

6.18 GC/ T0 RAS 1.3

7. 18 GM/ T0 RAS 1.3

8. 20 GC/ T0 RAS 2.1

9. 20 GM/ T0 RAS 2.1

10.22 GC/ T0 RAS 2.2

11.22 GM/ T0 RAS 2.2

12. 23 GC/ T0 RAS 2.3

13.23 GM/ T0 RAS 2.3

14. 24 GM/ T0 RAS 2.3

Fig. 6.37 Gelul DGGE al probelor de continut si mucus intestinal la T0/LO

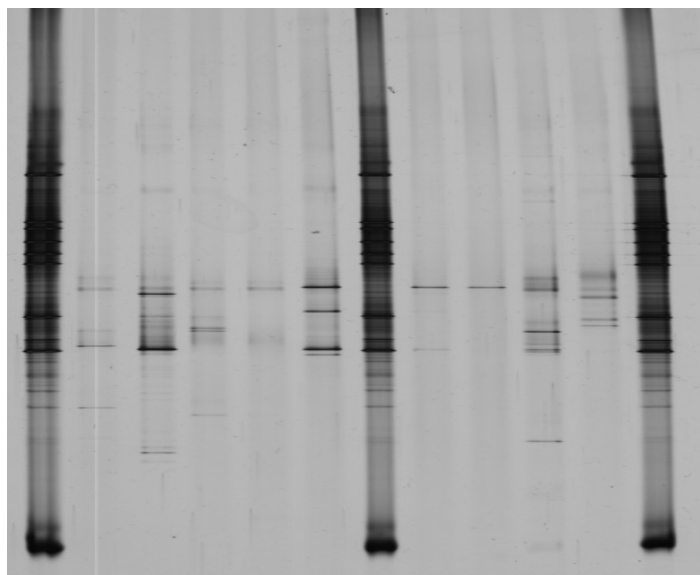
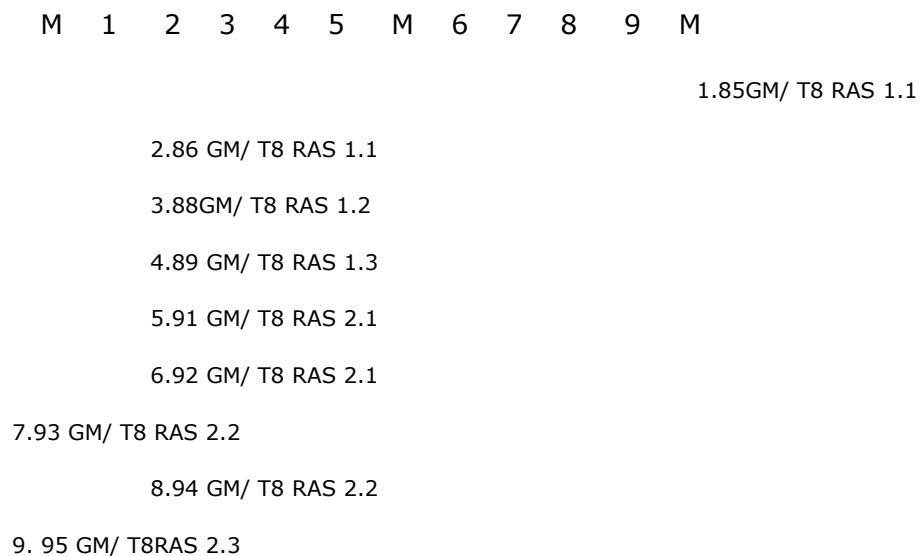
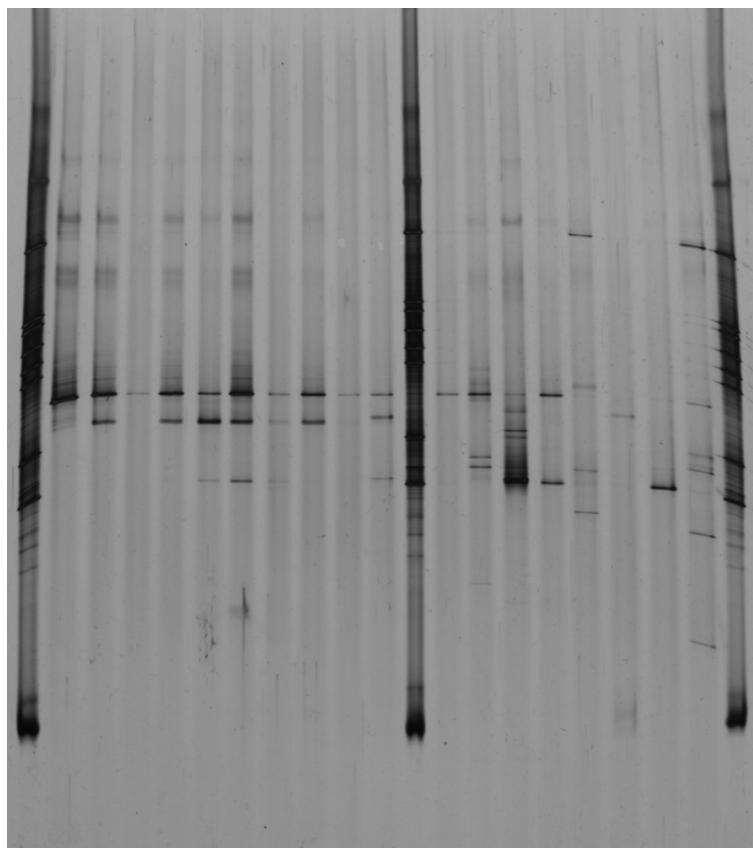


Fig. 6.39 Gelul DGGE al probelor de mucus intestinal la T8/LO

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 M



11 12 13 14 15 16 17 18 M 1.181GM/T12RAS3.1LOHO

2.182GM/T12RAS3.1LOHO

3.183GM/T12RAS3.1LOHO

4.185GM/T12RAS3.2HO

5.186GM/T12RAS3.2HO

6.187GM/T12RAS3.2HO

7.188GM/T12RAS3.2LOHO

8.189GM/T12RAS3.3LOHO

9.190GM/T12RAS3.3LOHO

10.191GM/T12RAS3.3LOHO

11.193GM/T12RAS4.1LOHO

12.194GM/T12RAS4.1LOHO

13.197GM/T12RAS4.2HO

14.198GM/T12RAS4.2HO

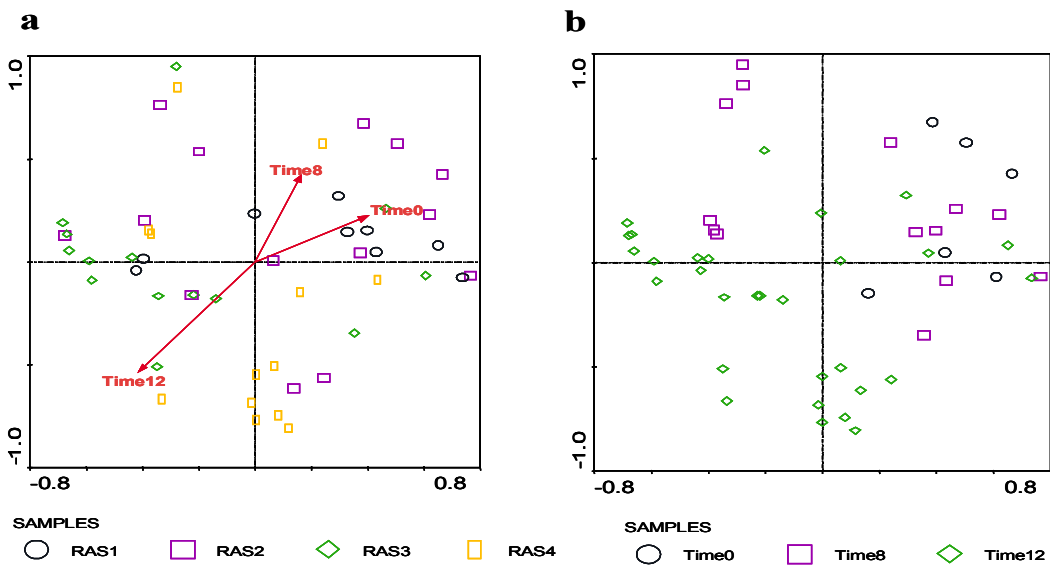
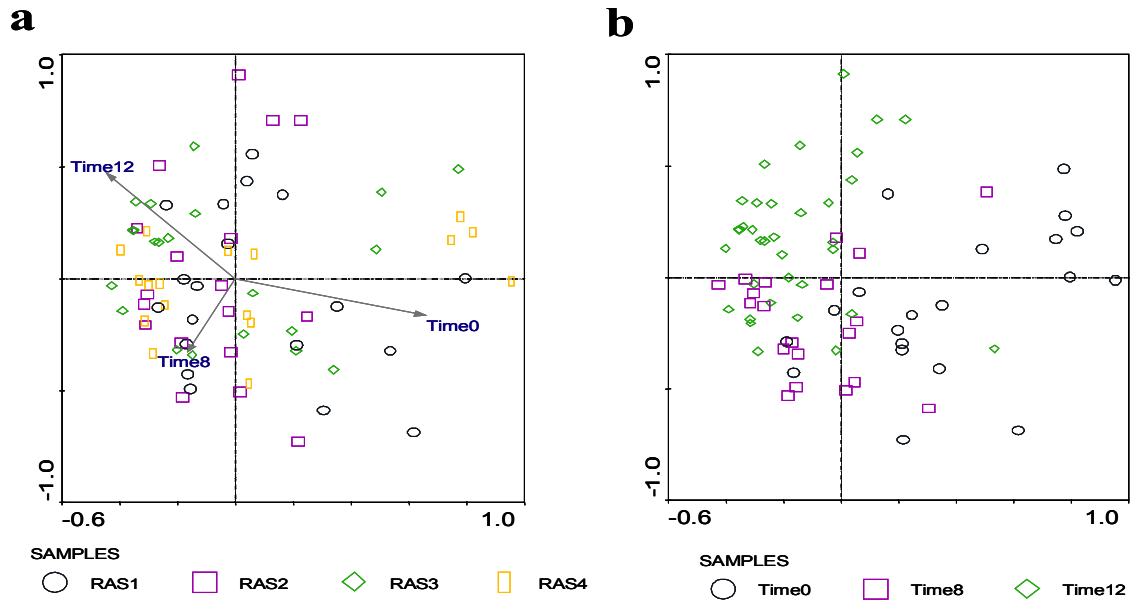
15.199GM/T12RAS4.2HO

16.200GM/T12RAS4.2HO

17.201GM/T12RAS4.3LOHO

18.202GM/T12RAS4.3LOHO

Fig. 6.43 Gelul DGGE al probelor de mucus intestinal la T12



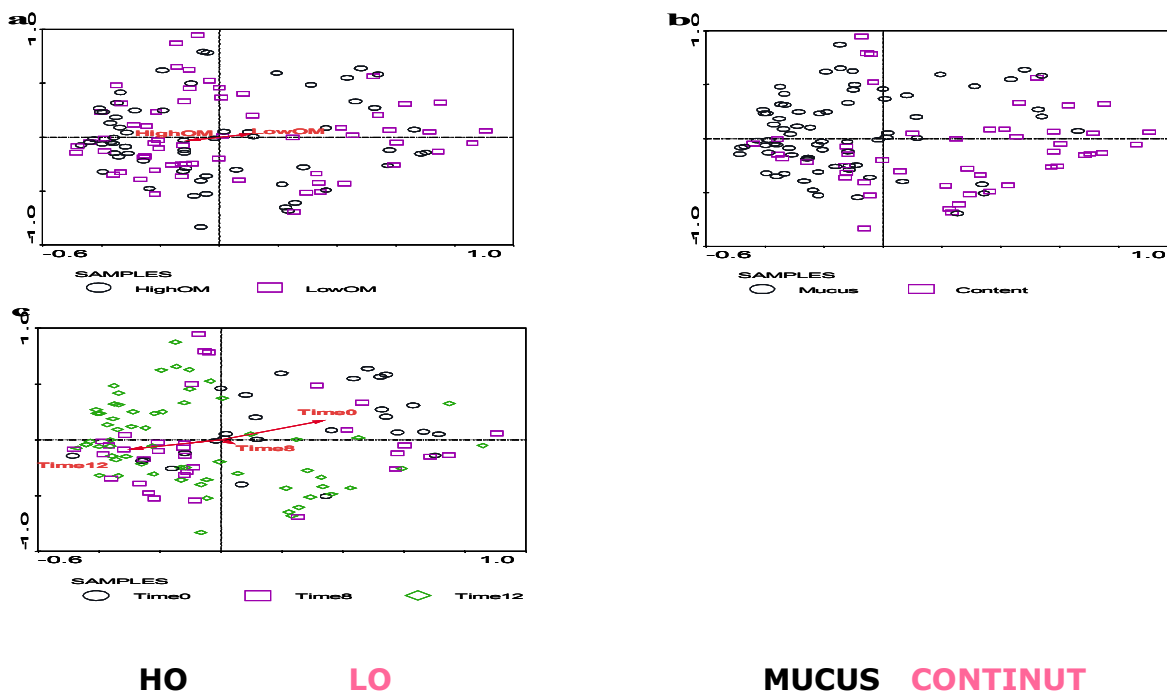
RAS 1 RAS 2 RAS 3 RAS4

Timp 1 Timp 8 Timp 12

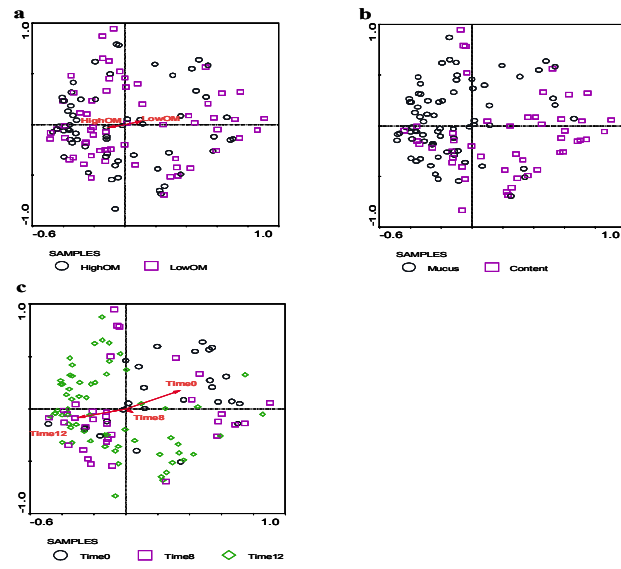
Fig. 6.51 PCA pentru probele de mucus

**RAS 1** **RAS 2** **RAS 3** **RAS 4**      **Timp 0** **Timp 8** **Timp 12**

Fig. 6.54 PCA pentru probele de continut intestinal

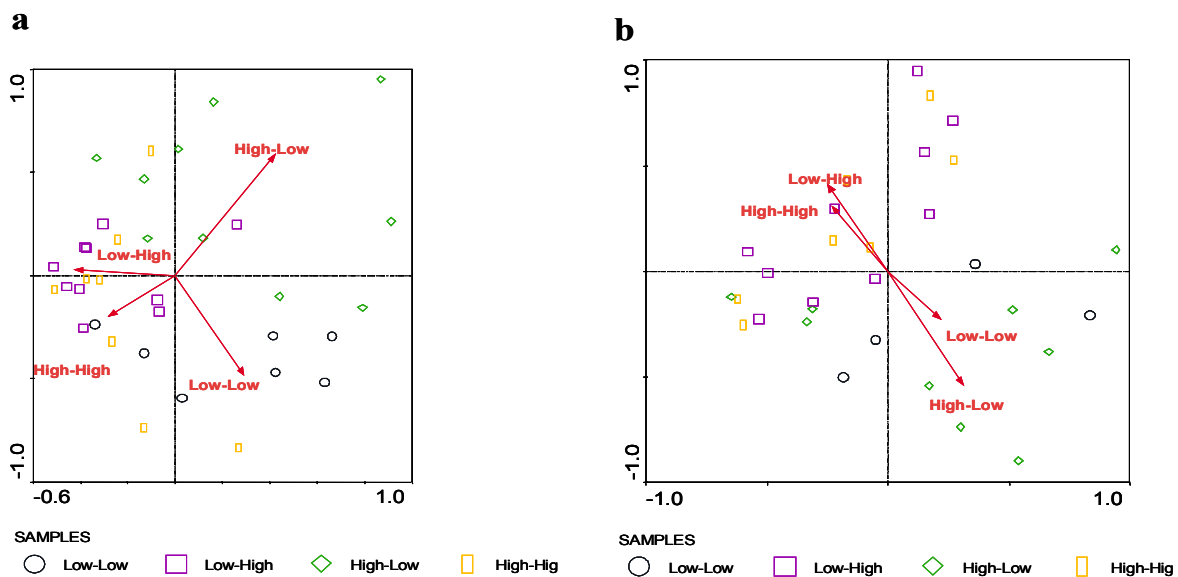






TO T8 T12

Fig. 6.55 PCA pentru probele de mucus si continut intestinal (a, b, c)



Legenda: a) probe mucus intestinal      b) probe continut intestinal

**LO-LO   HO-HO   HO-LO   LO-HO**

Fig. 6.56 PCA pentru probele de a) mucus si b) continut intestinal (a, b, c)

#### 6.4. Concluzii

Scopul acestui experiment a fost de a testa efectul incarcarii organice din apă la diferite nivele (scazut=LO sau crescut=HO) si efectul acestei asupra performanțelor de creștere a peștilor si calității apei.

Metoda folosită pentru a produce cele două condiții diferite de încărcare organică (LO și HO) a constat în utilizarea a două filtre diferite de 40 și respectiv 60 de micrometri. S-a pornit de la ideea că uzual sitele pentru filtrul cu tambur sunt de 40 micrometri. S-a constatat că, deși conținutul de materie organică este diferit, diferențele nu sunt "atât de mari," pentru a produce schimbări importante în microbiota sistemului, astfel încât efectul tratamentului este "subtil". De aceea, nu s-au produs schimbări dramatice în compoziția comunităților microbiene (MCS), în special în intestinalele peștilor.

Se constata că peștii au crescut bine în ambele condiții de încărcare organică dar cel mai bine unde încărcatura organică a fost mai mică. De asemenea, parametrii apei au fost în limite normale în ambele variante experimentale.

În conformitate cu profilurile DGGE, microbiota din apă este diversă și relativ stabilă, similară în toate sistemele RAS. Se observă unele asemănări ale profilului bacterian, unde benzile sunt în poziție dominantă. Rezultatul analizei APC este clar arătând că în prima perioadă microbiota din apă la toate probele tinde să se grupeze conform timpului prelevării, nefiind influențată de tratamentul aplicat. Diagrama APC împarte în două grupuri probele de apă: 1) probele recoltate înainte ce peștii au fost introdusi în sistemele de creștere și 2) probele recolate după T0. Aceasta arată că microbiota este diferită. Această deosebire poate fi datorată și de introducerea peștilor în sistem nu numai de varianta experimentală efectuată.

În probele de hrană există o diversitate bacteriană importantă. La gelurile DGGE ale probelor de furaj se constată că benzile sunt în poziții diferite pentru unele probe dar profilurile per total sunt similare. Putem concluziona că pentru furaj există o microbiotă complexă.

La majoritatea probelor de mucus s-a constatat o diversitate microbiană scăzută. Se observă un grup de benzi dominante în toate probele analizate. Analizele PCA arată, de asemenea, în distribuția datelor, un efect produs de momentul prelevării. Efectul sistemului nu este clar atunci când s-au analizat toți timpii de prelevare ai probelor.

La conținutul intestinal la fel ca și la probele de mucus diversitatea nu este

mare dar in majoritatea probelor exista un grup de organisme dominante. Analizele PCA arată ca efectul sistemului nu este clar, probele tind să se grupeze mai mult in functie de tipul recoltarii. Mai multe probe de la T12 (cele cu profil microbial LO) sunt grupate împreună.

Varianta experimentală aplicată (LO sau HO) nu a influențat microbiota intestinală; acesta nu reprezintă un factor care să explice distribuția datelor in PCA. Probele tind să se grupeze în funcție de tipul probei (mucus/conținut), așa cum sa întâmplat în primul experiment. Aceasta poate fi o confirmare că mucoasa și lumenul intestinal nu sunt colonizate exact aceeași microbiotă.

Analiza probelor de intestin din T12 este interesantă, deoarece se concentreaza doar pe perioada finală a experimentului, atunci când, în principiu, efectul tratamentului trebuie să fie mai clar. Deși, acest aspect este greu de observat în profilele gelurilor de DGGE, analiza PCA prezintă o distribuție frumoasă a datelor, cu un efect al variantelor experimentale aplicate.

Indicatorii tehnologici au aratat o buna crestere a pestelui din sistemele cu incarcatura organica joasa (LO). Putem concluziona că un sistem care a prezentat un filtru tambur cu dimensiunea sitelor de 40 micrometri, cu parametri fizico-chimici având valori normale și un furaj adecvat (compozitie de 56% proteine si 14 % lipide) poate influenta pozitiv performanțele de creștere ale peștilor.

## **CAPITOLUL 7**

### **CONTRIBUTII PERSONALE ȘI CONCLUZII**

#### **7.1. Concluzii generale**

In cercetarile stiintifice efectuate în conditii industriale de crestere, materialul biologic a fost reprezentat de specia calcan, un peste din ce in ce mai solicitat pe piata europeana.

Scopul cercetărilor a fost de a studia compoziția comunității microbiene și stabilirea dinamicii acesteia în sistemele recirculante de acvacultură. Experimentele s-au desfășurat în sisteme recirculante de acvacultură (RAS) din ferme comerciale olandeze timp de 1 an și jumătate.

Primul experiment s-a efectuat la două ferme de creștere a calcanului unde s-a studiat relația dintre calitatea apei și compoziția comunității microbiene. Ambele ferme au utilizat tehnologia de creștere a peștilor în sisteme recirculante, fiind diferite în design și management. Scopul experimentului a fost de a înțelege mai bine impactul încărcăturii organice asupra calitatii apei, compoziției microbiene și sănătății peștilor. Totodată, s-a urmărit și modul în care practicile diferite de management pot promova o microbiota sănătoasă cu influența asupra sănătății peștilor. Cele două ferme au diferit în practicile de management și nivelurile de intrări organice în RAS și totodată în compoziția microbiotei.

În al doilea experiment s-au investigat efectele a două niveluri diferite de încărcare organică a RAS-ului asupra performanțelor creșterii peștilor din sistem. Cu precădere s-au analizat compoziția microbială a apei tehnologice și relația dintre microbiota din apă și cea prezentă în intestinul peștelui (calcan). Principalul obiectiv al experimentului a fost de a evalua impactul a două niveluri diferite de încărcătură organică în RAS (LO=încărcătură organică scăzută; HO=încărcătură organică crescută) asupra calității apei și a comunității microbiene în aceste sisteme. Studiul a arătat dacă există o relație între anumite microorganisme din apă și cele prezente în pește și măsura în care stabilitatea microbială ajută în RAS.

În fermele de creștere a calcanului s-a observat o diversitate microbială și o asemănare mare între profilurile DGGE ale comunității microbiene din apa de cultură (tank) și din aflusul de apă (inflow). S-a confirmat faptul că biofiltrul a fost principala sursă de bacterii din apa de cultură, așa cum a fost deja demonstrat și raportat de către Léonard et al. (2000).

La probele de hrană s-a constatat o mare diversitate microbială cu profil asemănător pentru toate probele analizate. Având în vedere că un RAS este un sistem semi-închis, hrana pentru pești ar putea fi o sursă de intrare pentru biomasa

bacteriană externă. De aceea, s-a analizat compoziția microbiană a hranei pentru a încerca să se cuantifice posibilul impact al acestei microbiote asupra creșterii peștilor din sistem și asupra performanței sistemului în general și un eventual transfer de bacterii din hrană la pește reprezintă un punct de interes major. Profilurile DGGE au arătat prezența unei interesante diversități a compoziției microbiene în probele de hrană.

Pentru toate probele de intestin ale peștilor din experiment pare să fie prezentă cel puțin o populație dominantă de bacterii. Acest lucru este interesant, deoarece, recent s-a demonstrat existența unei "microbiote de bază" în pește ce a fost studiată la peștele zebra (Roeselers et al. 2011). Acest studiu oferă informații valoroase pentru a susține această ipoteză. Desigur, analiza probelor de pește "sălbatic" și a celui crescut în sistemele de creștere ar putea fi, de asemenea, interesantă în acest sens.

O comparație a tuturor datelor oferite de gelurile DGGE pentru probele de intestin (continut și mucus) confirmă ca microbiota din continutul intestinal este diferită de cea din mucusul intestinal. Condițiile de mediu și anume managementul aplicat în cele două ferme nu au avut un impact măsurabil asupra distribuției de variație a datelor.

S-a aratat că există o microbiotă comună pentru toate probele analizate din fiecare fermă ceea ce înseamnă că există o corelație între aceste microbiote studiate. Se presupune ca aceasta microbiotă provine din hrană ceea ce ar însemna că această microbiotă ar coloniza în apă dar și în intestinul peștilor. Pentru a confirma cele spuse este nevoie de încă multi ani de cercetare.

Dezvoltarea acvaculturii intensive, și, implicit a sistemelor recirculante reprezintă consecința nevoii de intensificare ca urmare a reducerii accesului la suprafețe mari de pământ corelată cu cererea de pește, în continuă creștere, a pieții de consum. Acvacultura intensivă presupune însă utilizarea unor furaje de înaltă calitate care să acopere în totalitate cerințele nutriționale ale speciilor de cultură. În toate perioadele experimentele efectuate factorul de conversie al hranei (FCR) a

variat invers proporțional cu coeficientul de eficiență proteică și direct proporțional cu densitatea de stocare.

Pentru experimentul realizat la Ferma 3 s-a demonstrat că încărcatura microbiană a influențat clar ritmul de creștere a peștelui: la încărcatură organică mică, performanțele creșterii sunt mai bune. Ceea ce arată că, în cazul utilizării unei site de 40  $\mu\text{m}$  microbiota din sistemul de creștere este favorabilă.

Pentru a obține un spor de biomasă fiecare unitate de creștere trebuie să aibe: unități de creștere, unități de condiționare a apei, unități de sterilizate, hrană de calitate, material biologic de calitate. În sistemele recirculante de acvacultură trebuie monitorizați și menținuți în condiții optime parametrii de calitate ai apei (temperatura, oxigenul, amoniacul, nitriții, dioxidul de carbon, pH-ul, suspensiile solide, clorurile, nitrații) împreună cu microbiotele din apă, hrană și specia de cultură.

Interpretarea rezultatelor obținute, din perspectivele relației dintre indicatorii tehnologici, managementul aplicat și microbiotele analizate, ne-a permis să conchidem că, într-un sistem recirculant performanța creșterii peștelui este dată de această relație.

## **BIBLIOGRAFIE SELECTIVA**

1. Aakra A., Utaker J.B., Nes I.F. and Bakken L.R. (1999) - An evaluated improvement of the extinction dilution method for isolation of ammonia-oxidizing bacteria. – *Journal of Microbiological Methods*, 39: 23-31.
2. Abeyasinghe D.H., Shanableh A. and Ringden B. (1996) – Biofilters for water reuse in aquaculture. – *Water Science Technology*, 34: 253-260.
3. Alabi A.O., Che Cob Z., Jones D.A. and Latchford J.W. (1999) - Influence of algal exudates and bacteria on growth and survival of white shrimp larvae fed entirely on microencapsulated diets. – *Aquaculture International*, 7: 137-158.

4. Angela D. Schultze (2006). Bacterial diversity in a marine hatchery: Balance between pathogenic and potentially probiotic bacterial strains. *Aquaculture* 256;50-73
5. Aurel Ardelean, *Biologie celulara si moleculara*, Vasile Goldis University Press, Arad,2006.
6. Austin, B. and Al-Zahrani, A.M.J. (1988) The effect of antimicrobial compounds on the gastrointestinal microflora of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J Fish Biol* 33, 1-14.
7. Baldock J. and Skjemstad J. (2000) - Role of the soil matrix and minerals in protecting natural organic materials against biological attack.- *Organic Geochemistry*, 31: 697- 710.
8. Balestra G M. and Misaghi I.J. (1997) – Increasing the efficiency of plate counting method for estimating bacterial diversity–*Journ. of Microbiological Methods*, 30:111-117.
9. Battin T.J., Kaplan L.A., Newbold J.D. and Hansen C.M.E. (2003) - Contributions of microbial biofilms to ecosystem processes in stream mesocosms–*Nature*, 426:439- 442.
10. Blaire Van Valkenburgh and Robert K. Wayne -*Carnivores- Magazine* R915
11. BURA M. *Acvacultură specială*, Ed. Orizonturi Universitare, Timișoara, 2002, 366 pag.
12. Cahill, M.M., 1990. Bacterial flora of fishes: a review. *Microb. Ecol.* 19, 21– 41.
13. Chair, M., Dehasque, M., Van Poucke, S., Nelis, H., Sorgeloos, P., de Leenheer, A.P., 1994. An oral challenge for turbot with *Vibrio anguillarum*. *Aquac. Int.* 2, 270– 272.
14. Chen S., Ling J. and Blancheton J.P. (2006) - Nitrification kinetics of biofilm as affected by water quality factors. – *Aquaculture Engineering*, 34: 179-197.
15. Chung J.C. and Strom P.F. (1991) - Microbiological study of ten New Jersey rotating biological contactor wastewater treatment plants. – *Water Environmental Research*, 63: 35-43.



16. Clement B.G., Kehl L.E., DeBord K.L. and Kitts C.L. (1998) - Terminal restriction fragment patterns (TRFPs), a rapid, PCR-based method for the comparison of complex bacterial communities.- *Journal of Microbiological Methods*, 31: 135-142.
17. Cristea. V, Grecu I., Ceapa C., 2002 – Ingineria sistemelor recirculante din acvacultura – Editura didactica si pedagogica
18. D.-H. Kim, J. Brunt and B. Austin - Microbial diversity of intestinal contents and mucus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)- *Journal of Applied Microbiology* ISSN 1364-5072
19. Dunning Rebecca, Losordo M.T., Hobbs A.O. The economics of recirculating tank systems: a spreadsheet for individual analysis; Louthern Regional Aquaculture Center, 1998, nr. 456
20. Dunbar J., Ticknor L.O. and Kuske C.R. (2001) - Phylogenetic specificity and reproducibility and new method for analysis of terminal restriction fragment profiles of 16S rRNA genes from bacterial communities. – *Applied Environmental Microbiology*, 67: 190-197.
21. Eding E.H., Kamstra A., Verreth J.A.J., Huisman E.A. and Klapwijk A. (2006) – Design and operation of nitrifying trickling filters in recirculating aquaculture: A review. – *Aquaculture Engineering*, 34: 234–260.
22. Eckburg, P.B., Bik, E.M., Bernstein, C.N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S.R., Nelson, K.E. et al. (2005) - Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 308, 1635–1638.
23. Evelyne Bachère (2000) Shrimp immunity and disease control. *Aquaculture* volume 191; Issues 1-3; pages 3-11
24. Einar Ringo, Rolf Erick, (2003) Electron microscopy of the intestinal microflora of fish
25. Furumai H. and Rittman B.E. (1994a) – Evaluation of multiple- species biofilm and floc processes using a simple aggregate model. – *Water Science Technology*, 29: 439 446.
26. Furumai H. and Rittman B.E. (1994b) – Interpretation of bacterial activities in nitrification filters by a biofilm model considering the kinetics of soluble microbial products. – *Water Science Technology*, 30: 147 – 156.

27. Gittleman, J.L. (1989). *Carnivore Behavior, Ecology, and Evolution*, Vol. I, (Ithaca: Cornell University Press.)
28. Gittleman, J.L. (1996). *Carnivore Behavior, Ecology, and Evolution*, Vol. II, (Ithaca: Cornell University Press.)
29. Gittleman, J.L., Funk, S.M., Macdonald, D., and Wayne, R.K. (2001). *Carnivore Conservation*. (Cambridge, UK: Cambridge University Press.)
30. Hargrove L.L., Westerman P.W. and Losordo T.M. (1996) – Nitrification in tree- stage and single- stage floating bead biofilters in a laboratory – scale recirculating aquaculture system. – *Aquaculture Engineering*, 15: 67-80.
31. Hill C.J., Walsh K.A., Harris J.A. and Moffett B. F. (2003) - Using ecological diversity measures with bacterial communities. - *FEMS Microbiology Ecology*, 43: 1-11
32. Kirchman D.L. (1994) - The uptake of inorganic nutrients by heterotrophic bacteria. - *Microbial Ecology*, 28: 255-271.
33. Oprea L., Victor Cristea, Neculai Patriche, Corina Sion, Elena Bocioc, Gianina Manuela Bacanu, Mihaela Barbulescu, Ionica Enache, (2010) "The influence of fodder quality on the growth of siberian sturgeon (*Acipenser baerii* Brandt, 1869) in recirculating aquaculture system", *JEPE*, Bulgaria, in press;
34. Oprea L., Victor Cristea, Daniel Oprea, Mihaela Barbulescu, Ionica Enache, Gianina Manuela Bacanu, Corina Sion, Sandita Placinta, "The influence of feeding level on the growth of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii* Brandt, 1869) in recirculating aquaculture system, *JEPE*, Bulgaria, in press;
35. Oprea L., Barbulescu Mihaela, Gianina Manuela Bacanu, (2009)-The breeding of beluga sturgeon (*Huso huso*, Linnaeus, 1758) in recirculating aquaculture system, *Bulletin of USAMV Cluj Napoca*, vol.66 (1-2), Edit. Academic Pres Cluj, ISSN 1843-5262, p.331-335;
36. Oprea L., Barbulescu Mihaela, Gianina Manuela Bacanu- The breeding of beluga sturgeon (*Huso huso*, Linnaeus, 1758) in recirculating aquaculture

- system, 8-th International Symposium of Animal Biology and Nutrition, IBNA Balotesti-Bucuresti, 24-25.09.2009;
37. Oprea L., Victor Cristea, Neculai Patriche, Corina Sion, Elena Bocioc, Gianina Manuela Bacanu, Mihaela Barbulescu, Ionica Enache, (2010) "The influence of fodder quality on the growth of siberian sturgeon (*Acipenser baerii* Brandt, 1869) in recirculating aquaculture system", International Conference on Fishery and Aquaculture, A View Point Upon The Sustainable Management Of The Water Resources In The Balkan Area, Galati, ROMANIA, May 26 th -28th, 2010;
  38. Oprea L., Victor Cristea, Daniel Oprea, Mihaela Barbulescu, Ionica Enache, Gianina Manuela Bacanu, Corina Sion, Sandita Placinta, " The influence of feeding level on the growht of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii* Brandt, 1869) in recirculating aquaculture system, International conference on Fishery and Aquaculture, A View Point Upon The Sustainable Management Of The Water Resources In The Balcan Area, Galati, ROMANIA, May 26th-28th 2010
  - 39.
  40. Sion C., Lucian Oprea, Victor Cristea, Neculai Patriche, Gianina Manuela Bacanu, Elena Bocioc, Ionica Enache, Sandita Placinta, (2010) "The influence of feeding level on the growth of sterlet (*Acipenser ruthenus* LINNAEUS, 1758) in recirculating aquaculture system", JEPE, Bulgaria, in press;
  41. Sion C., Petronela G. Călin, Lucian Oprea, Aurelia Nica and Gianina M. Băcanu-The influence of palletes quality on the growth of starlet, in recirculating aquaculture system, Aquaculture scintific symposium "ACVAPEDIA - 2010", Third Edition. AACL Bioflux, 2011, Volume 4(2):146-153 <http://www.bioflux.com.ro/aac>
  42. Sion C., M. G. Băcanu, M. Bărbulescu, D. Oprea, E. Bocioc, L. Oprea, V. Cristea, N. Patriche, (2010) "Breeding of the siberian sturgeon (*Acipenser baeri* Brand,1869), in recirculating aquaculture system, with different stocking densities", Book of abstracts, International scientific symposium: "Modern animal husbandry – Food Safty and Socio-Economic Development",

- April, 22nd - 23rd 2010, Iasi - Romania, pages 188-189 - Oral presentation;
43. Smith P. and Davey S. (1993) - Evidence for the competitive exclusion of *Aeromonas salmonicida* from fish with stress- inducible furunculosis by a fluorescent *Pseudomonas* - *Journal of Fish Diseases*, 16: 521-524.
  44. Sion , Lucian Oprea, Victor Cristea, Neculai Patriche, Gianina Bacanu, Elena Bocioc, Ionica Enache, Tudor Ionescu, (2010)" The influence of stocking density on the growth of sterlet (*Acipenser ruthenus* Linnaeus, 1758) in recirculating aquaculture system", International Conference on Fishery and Aquaculture, A View Point Upon The Sustainable Management Of The Water Resources In The Balkan Area, Galati, ROMANIA, May 26 th -28th, 2010;
  45. Sion, Lucian Oprea, Victor Cristea, Neculai Patriche, Gianina Manuela Bacanu, Elena Bocioc, Ionica Enache, Sandita Placinta, (2010) "The influence of stocking density on the growth of sterlet (*Acipenser ruthenus* Linnaeus, 1758) in recirculating aquaculture system", International Conference on Fishery and Aquaculture, A View Point Upon The Sustainable Management Of The Water Resources In The Balkan Area, Galati, ROMANIA, May 26 th -28th, 2010;
  46. Sion C., Lucian Oprea, Victor Cristea, Neculai Patriche, Gianina Bacanu, Elena Bocioc, Ionica Enache, Tudor Ionescu, (2010)"The influence of stocking density on the growth of sterlet (*Acipenser ruthenus* Linnaeus, 1758) in recirculating aquaculture system", JEPE, Bulgaria, in press; Oprea L., Georgescu R., 2000- *Nutritia si alimentatia pestilor* - Editura Tehnica