

**MINISTERUL EDUCAȚIEI, CERCETĂRII, TINERETULUI ȘI
SPORTULUI
UNIVERSITATEA DUNĂREA DE JOS DIN GALAȚI**



**Doctorand
ing., ec. Elena BOCIOC**

Cercetări privind utilizarea probioticelelor în acvacultura industrială din sistemele recirculante

TEZĂ DE DOCTORAT

**Conducător științific,
Prof. univ. dr. ing. Neculai PATRICHE**

GALAȚI
2011

CUPRINS

OBIECTIVELE TEZEI DE DOCTORAT	3
--	----------

PARTEA I

ANALIZA DATELOR DIN LITERATURA DE SPECIALITATE

Capitolul I. STADIUL ACTUAL AL CERCETĂRILOR ȘTIINȚIFICE PRIVIND UTILIZAREA PROBIOTICELOR ÎN ACVACULTURĂ

I.1. Generalități privind stadiul actual al utilizării probioticelor în acvacultură.....	7
I.2. Oportunitatea utilizării probioticelor în acvacultură	10
I.3. Criterii de selectarea a probioticelor utilizabile în acvacultură	14
I.4. Tulpini de probiotice utilizabile în acvacultură.....	17
I.5. Mecanismele de acțiune a probioticelor.....	19
I.6. Reglementări internaționale privind utilizarea probioticelor	25

Capitolul II. ROLUL PRINCIPALILOR FACTORI TEHNOLOGICI LA CREȘTEREA PEȘTELOR ÎN SISTEMELE RECIRCULANTE DE ACVACULTURĂ INDUSTRIALĂ

II.1. Controlul calității apei la creșterea speciilor de pești în sistemele recirculante de acvacultură industrială.....	28
II.1.1. Asigurarea calității apei în sistemele recirculante	30
II.1.2. Controlul solidelor reziduale	32
II.1.3. Controlul oxigenului dizolvat	34
II.1.4. Controlul compusilor azotului	36
II.1.5. Controlul pH-ului și alcalinității	39
II.1.6. Controlul dioxidului de carbon	40
II.1.7. Controlul temperaturii	43
II.2. Managementul hrănirii în creșterea peștilor din sistemele recirculante de acvacultură industrială	44
II.2.1. Cerințele nutriționale ale peștilor în general și a speciei crap în special	47
II.2.2. Particularități de digestie și valorificare a substanțelor nutritive la pești.....	52
II.2.3. Aditivii furajeri folosiți în alimentația peștilor.....	54
II.2.4. Caracteristicile creșterii crapului în condițiile administrării hranei suplimentare...58	

PARTEA a II-a
ACTIVITATEA EXPERIMENTALĂ

Capitolul III. CERCETĂRI PRIVIND EFECTUL PROBIOTICELOR ASUPRA FIZIOLOGIEI ȘI PERFORMANȚEI DE CREȘTERE A PUIETULUI DE CRAP (*Cyprinus carpio*, *Linnaeus 1758*)

III.1. Introducere.....	63
III.2. Material și metode	65
III.2.1. Material biologic și baza experimentală	65
III.2.2. Metode de determinare a parametrilor de calitate ai apei	73
III.2.3. Metodologia privind evaluarea indicatorilor de performanță tehnologică	73
III.2.4. Metode de investigații hematologice și biochimice	75
III.2.5. Metode de investigații microbiologice	81
III.3. Rezultate și discuții.....	85
III.3.1. Evaluarea dinamicii parametrilor de calitate a apei	86
III.3.2. Identificarea și caracterizarea microbiotei specifice a speciei <i>Cyprinus carpio</i> , <i>Linnaeus 1758</i>	90
III.3.3. Evaluarea efectului probioticelor asupra fiziologiei și performanței de creștere a puietului de crap (<i>Cyprinus carpio</i> , <i>Linnaeus 1758</i>).....	107
III.3.3.1. Analiza indicatorilor biotehnologici	108
III.3.3.2. Analiza hematologică și biochimică a sângelui.....	115
III.3.3.3. Analiza biochimică a carnii de pește	127
III.4. Concluzii	129

Capitolul IV. CERCETĂRI PRIVIND INFLUENȚA PROBIOTICULUI LACTOBACT PREMIUM ASUPRA PROFILULUI HEMATOLOGIC LA CREȘTEREA PUIETULUI DE CRAP (*Cyprinus carpio*, *Linnaeus 1758*)

IV.1. Introducere	133
IV.2. Material și metode.....	135
IV.2.1. Materialul biologic	135
IV.2.2. Baza experimentală	137
IV.2.3. Metode și tehnici utilizate în determinările indicatorilor de calitate a apei, hematologici și biochimici	141
IV.3. Rezultate și discuții	141
IV.3.1. Evaluarea efectului probiotic al bacteriilor din genul <i>Lactobacillus</i> asupra profilului hematologic al puietului de crap (<i>Cyprinus carpio</i> , <i>Linnaeus 1758</i>).....	142
IV.3.1.1. Evaluarea dinamicii parametrilor de calitate a apei	143
IV.3.1.2. Analiza indicatorilor biotehnologici.....	148
IV.3.1.3. Analiza hematologică și biochimică a sângelui	150
IV.3.1.4. Analiza biochimică a carnii de pește.....	161
IV.4. Concluzii.....	163

Capitolul V. CERCETĂRI PRIVIND INFLUENȚA PRINCIPALILOR FACTORI TEHNOLOGICI ÎN CONDIȚIILE UTILIZĂRII PROBIOTICELOR DIN SISTEMUL RECIRCULANT PENTRU CREȘTEREA CRAPULUI (*Cyprinus carpio*, Linnaeus 1758)

V.1. Introducere	166
V.2. Material și metode	168
V.2.1. Material biologic și baza experimentală	168
V.2.2. Metode de determinare a parametrilor de calitate ai apei	178
V.2.3. Metodologia privind evaluarea indicatorilor de performanță tehnologică	179
V.2.4. Metode de investigații hematologice și biochimice	180
V.2.5. Metode de investigații microbiologice	180
V.3. Rezultate și discuții	184
V.3.1. Evaluarea dinamicii parametrilor de calitate a apei din sistemul recirculant	184
V.3.2. Evaluarea microbiotei speciei <i>Cyprinus carpio</i> , Linnaeus 1758, în condițiile creșterii intensive într-un sistem recirculant	190
V.3.3. Evaluarea efectului temperaturii asupra fiziologiei și performanței tehnologice a crapului (<i>Cyprinus carpio</i> , Linnaeus 1758) din sistemul recirculant în condițiile utilizării probioticelor	199
V.3.1.1. Analiza indicatorilor biotehnologici	200
V.3.1.2. Analiza hematologică și biochimică a sângelui	205
V.3.1.3. Analiza biochimică a cărnii de pește	229
V.4. Concluzii	230

Capitolul VI. EVALUAREA BIOECONOMICĂ A UNUI SISTEM RECIRCULANT DE ACVACULTURĂ INDUSTRIALĂ A CRAPULUI ÎN CONDIȚIILE UTILIZĂRII PROBIOTICELOR

VI.1. Proiecția financiară a unei unități de creștere a crapului în sistem recirculant	235
VI.1.1. Analiza rentabilității unității de producție	239
VI.2. Concluzii	245

Capitolul VII. CONCLUZII FINALE

VII.1. Concluzii finale	247
-------------------------------	-----

ANEXE	252
--------------------	-----

BIBLIOGRAFIE	263
---------------------------	-----

OBIECTIVELE TEZEI DE DOCTORAT

Prin problematica abordată, cercetările întreprinse în teză oferă date importante în ceea ce privește utilizarea probioticelor pentru creșterea crapului (*Cyprinus carpio*, Linnaeus 1758) în sistem recirculant de acvacultură industrială, ceea ce conduce, în final, la obținerea unor producții piscicole superioare.

Scopul acestor cercetări a fost acela de a evalua efectele probioticelor utilizate asupra performanței de creștere și a stării de sănătate a materialului biologic exprimate prin intermediul unor parametrii biotehnologici de creștere și indici hematologici și biochimici, în condiții diferite de creștere în sistemul recirculant de acvacultură.

Cercetările științifice stabilite în concordanță cu programul de cercetare al stagiului de doctorat au vizat ca obiective generale următoarele:

- ↳ evaluarea efectului probioticelor asupra fiziologiei și performanței de creștere a puietului de crap (*Cyprinus carpio*, Linnaeus 1758);
- ↳ evaluarea influenței probioticelor bazate pe efectul bacteriilor lactice asupra stării de sănătate și parametrilor tehnologici de creștere exprimate prin profilul biochimic și hematologic al puietului de crap (*Cyprinus carpio*, Linnaeus 1758);
- ↳ evaluarea influenței factorilor tehnologici dintr-un sistem recirculant de acvacultură industrială la creșterea crapului (*Cyprinus carpio*, Linnaeus 1758) în condițiile utilizării probioticelor.

În vederea realizării acestor obiective generale au fost propuse următoarele obiective specifice:

- ♣ caracterizarea calitativă și cantitativă a microbiotei specifice puietului de crap (*Cyprinus carpio*, Linnaeus 1758);
- ♣ evaluarea ritmului de creștere în condiții tehnologice diferite;
- ♣ obținerea unor indici bioproductivi superiori (rată de creștere, supraviețuire, etc.);
- ♣ evaluarea indicatorilor biochimici și hematologici ai sângelui;
- ♣ testarea diferitelor probiotice înglobate în furaj și optimizarea managementului operațiunii tehnologice de hrănire.

STRUCTURA TEZEI DE DOCTORAT

Cercetările din această lucrare au avut drept scop principal evaluarea efectelor utilizării probioticelor asupra performanței de creștere și a stării de sănătate a materialului biologic exprimate prin intermediul unor parametrii biotehnologici de creștere și indici hematologici și biochimici, în condiții diferite de creștere în sistemul recirculant de acvacultură. Astfel, studiile abordate fac parte din categoria investigațiilor de tip experimental întreprinse pe materialul biologic reprezentat de specia *Cyprinus carpio*, *Linnaeus 1758* (crap) de diferite vârste, supus la diverse strategii de management tehnologic.

Teza de doctorat cuprinde 278 pagini, din care partea de documentare 60 pagini și partea experimentală 218 pagini. Lucrarea conține 128 figuri și 40 tabele, dintre care 47 fotografii originale. Pentru elaborarea tezei s-au utilizat 181 referințe bibliografice.

Astfel, **în primul capitol** se prezintă o sinteză bibliografică privind stadiul actual al cercetărilor științifice privind utilizarea probioticelor în acvacultură. În cadrul acestui capitol sunt descrise o serie de aspecte privind criteriile de selectare a probioticelor utilizabile în acvacultură, tulpinile de probiotice precum și, mecanismele de acțiune ale acestora în cazul utilizării lor în acvacultură.

Capitolul al doilea cuprinde date privind rolul principalilor factori tehnologici la creșterea peștilor în sistemele recirculante de acvacultură industrială prin controlul calității apei și managementului de hrănire.

În **al treilea capitol** sunt prezentate rezultatele cercetărilor privind efectul probioticelor asupra fiziologiei și performanței de creștere a puietului de crap (*Cyprinus carpio*, *Linnaeus 1758*) în sistem recirculant experimental. S-au obținut o multitudine de date privind performanța de creștere și fiziologia biomasei de cultură, în contextul experimentării diferitelor tipuri de probiotice înglobate în furaj și aplicării acestor rețete furajere și strategii de management al hrănirii.

Cercetările efectuate în cadrul **capitolului patru** se referă la rezultatele obținute prin utilizarea probioticului *Lactobact premium* și influența acestuia asupra profilului hematologic la creșterea puietului de crap (*Cyprinus carpio*, *Linnaeus 1758*) în sistem recirculant de tip acvariu. Sunt redate o serie de informații privind modificările survenite la nivelul profilului hematologic și biochimic al materialului biologic supus experimentării.

Cercetările întreprinse în cadrul **capitolului cinci** se focusează pe influența principalilor factori tehnologici în condițiile utilizării probioticelor în sistemul recirculant pentru creșterea crapului (*Cyprinus carpio*, *Linnaeus 1758*). Sunt redate aspecte privind influența

factorului – temperatura asupra performanței de creșterea și fiziologiei crapului prin analiza indicatorilor biotehnologici, hematologici și biochimici în condițiile utilizării concentrațiilor diferite de probiotic în a cărui compoziție se regăsesc două specii de bacterii din genul *Bacillus* (*Bacillus subtilis* și *Bacillus licheniformis*).

Capitolul șase prezintă evaluarea bioeconomică a unui sistem recirculant comercial pentru creșterea intensivă a crapului în condițiile utilizării probioticelor.

În **ultimul capitol** sunt prezentate concluziile finale referitoare la cercetările efectuate și contribuțiile personale ale autoarei.

PARTEA I

ANALIZA DATELOR DIN LITERATURA DE SPECIALITATE

Capitolul I. STADIUL ACTUAL AL CERCETĂRILOR ȘTIINȚIFICE PRIVIND UTILIZAREA PROBIOTICELOR ÎN ACVACULTURĂ

În general, termenul de „probiotic” este aplicat microorganismelor considerate „benefice” care intră în alcătuirea florei intestinale la veșuitoarele terestre. Această floră intestinală ajută la absorbția nutrienților, sinteza vitaminelor și funcționează ca barieră împotriva infecțiilor.

Bacteriile gram-negative, facultativ anaerobe din genul *Vibrio* și *Pseudomonas* constituie microbiota indigenă dominantă la numeroși pești marini. Spre deosebire de speciile marine, microbiota indigenă a peștilor de apă dulce tinde să fie dominată de reprezentanții genurilor *Aeromonas*, *Plesiomonas*, ai familiei Enterobacteriaceae, și mai ales bacterii obligat anaerobe din genurile *Bacteroides*, *Fusobacterium* și *Eubacterium*.

Sintetizând informațiile din literatura de specialitate, tulpinile probiotice din acvacultură sunt utilizate fie pentru îmbunătățirea calității apei în acvacultură, fie pentru inhibarea directă a dezvoltării microorganismelor patogene, ambele modalități conducând, în final, la creșterea producției de consum.

Cele mai multe probiotice folosite ca agenți de control biologic în acvacultură aparțin bacteriilor acido-lactice (*Lactobacillus* și *Carnobacterium*), genurilor *Vibrio* (*V. alginolyticus*), *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Aeromonas* și *Flavobacterium*.

Sintetizând informațiile din literatura de specialitate s-au conturat, însă, următoarele mecanisme de acțiune ale probioticelor:

1. inhibarea proliferării unor bacterii patogene pentru organismul gazda prin fenomene de excludere competitivă (concurența vitală și antagonism bacterian); un exemplu este producerea de bacitracină de către tulpinile probiotice de *Bacillus* sp.;

2. furnizarea de nutrienți esențiali și asigurarea unor enzime digestive pentru stimularea nutriției și digestiei organismelor acvatice de cultură;
3. descompunerea și/sau asimilarea substanței organice dizolvate (și/sau toxice) ce conduce la îmbunătățirea calității apei în unitățile de creștere; un exemplu, în acest sens, este dat de bacteriile chemoautotrofe care consumă amoniacul și/sau nitriții în procesul de nitrificare desfășurat în biofiltrele sistemelor recirculante de acvacultură;
4. stimularea răspunsului imun al gazdei la acțiunea organismelor patogene;
5. manifestarea unor efecte antivirale.

Capitolul II. ROLUL PRINCIPALILOR FACTORI TEHNOLOGICI LA CREȘTEREA PEȘTELOR ÎN SISTEMELE RECIRCULANTE DE ACVACULTURĂ INDUSTRIALĂ

Fezabilitatea și eficiența activității unui sistem recirculant de creștere depind de măsura în care este asigurată o optimă corelație între managementul tehnologic, capacitatea portantă și calitatea apei.

Avantajele recunoscute ale practicării acvaculturii în sisteme recirculante constau în:

- cerința redusă pentru resursa de apă;
- controlul complet al condițiilor mediale;
- controlul riguros al calității produsului realizat;
- disponibilitatea privind livrarea ritmică, pe tot parcursul anului, în stare proaspătă, a produsului realizat.

Optimizarea producției într-un sistem recirculant presupune satisfacerea simultană a două deziderate esențiale, anume, menținerea unei bune calități a apei precum și a unui nivel corespunzător al intensității hrănirii.

Nivelul intensității introducerii hranei într-un sistem recirculant rezultă din optimizarea cerințelor privind realizarea unei producții cât mai mari de biomasă, cu posibilitatea menținerii, în condiții economice, a parametrilor de calitate ai apei în domeniul optim. Dacă nivelul intensității hrănirii este excesiv, calitatea apei se deteriorează iar atunci când rata furajării este prea scăzută, capacitatea de producție a sistemului devine inefficientă.

Calitatea apei de cultură, respectiv posibilitatea menținerii acesteia în domeniul optim impus de cerința tehnologică, influențează randamentul conversiei hranei. O apă de calitate necorespunzătoare conduce la valori ridicate, necompetitive, ale coeficientului de conversie a hranei, ce impun cheltuieli mari de operare a sistemului (Cristea et al., 2002).

Pentru a satisface cerințele fizilogice ale speciilor de pești de cultură, furajul trebuie să conțină o serie de ingrediente (aditivi furajeri). Aditivii furajeri reprezintă o categorie de

substanțe sau produse care se introduc în cantități mici în hrana animalelor pentru a acoperi unele cerințe specifice și/sau pentru a influența în sens util (direct sau indirect) performanțele tehnologice și starea de sănătate. Din categoria bioaditivilor fac parte probioticele, prebioticele și mineralele organice. Probioticele sunt aditivi furajeri naturali, fără efect cumulativ în organism, ce modifică activitatea microbiană în tractusul digestiv, împiedicând dezvoltarea microorganismelor patogene și favorizând dezvoltarea microorganismelor utile.

PARTEA a II-a ACTIVITATEA EXPERIMENTALĂ

Capitolul III. CERCETĂRI PRIVIND EFECTUL PROBIOTICELOR ASUPRA FIZIOLOGIEI ȘI PERFORMANȚEI DE CREȘTERE A PUIETULUI DE CRAP (*Cyprinus carpio*, Linnaeus 1758)

III.1. Introducere

Folosirea probioticelor sau, cu alte cuvinte, a microorganismelor care controlează benefic acțiunea agenților patogeni printr-o serie de mecanisme, este considerată, din ce în ce mai mult, ca o alternativă la tratamentul cu antibiotice. Deși utilizarea probioticelor în nutriția umană și a animalelor terestre este studiată de mai mult timp, introducerea și aplicarea lor pentru controlul stării sanitare a populațiilor de viețuitoare acvatice (pești, creveți) este de dată recentă.

III.2. Material și metode

Cercetările efectuate se încadrează în categoria investigațiilor de tip experimental, desfășurate în stațiile pilot de cercetare ale Departamentului de Acvacultură, Știința Mediului și Cadastru, Universitatea "Dunărea de Jos" din Galați și ale Institutului de Cercetare-Dezvoltare pentru Ecologie Acvatică, Pescuit și Acvacultură, Galați.

III.2.1. Material biologic și baza experimentală

Materialul biologic a fost reprezentat de puiet de crap (*Cyprinus carpio*) în vârstă de 85 de zile, provenit din sistemul recirculant pilot al bazei de cercetare Brateș, I.C.D.E.A.P.A. Galați.

Caracteristicile probioticelor utilizate în vederea testării

Probioticele care au fost utilizate în cadrul acestui experiment, în vederea testării efectului lor asupra stării fiziologice și performanței de creștere a puietului de crap sunt următoarele:

- I. **BioPlus® 2B** este reprezentat de un amestec format din *Bacillus licheniformis* (DSM 5749) și *Bacillus subtilis* (DSM 5750) în proporție de 1:1;
- II. **BetaPlus®** este format din *BioPlus® 2B* și betaină (substanță azotată);
- III. **Lactobact Premium** reprezintă un amestec format în proporție egală din: *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Streptococcus thermophilus* (produsul nu conține lactoză, gluten și drojdii).

Experimentul a fost organizat în 4 variante experimentale a câte 3 repetiții fiecare, pe parcursul căruia s-a urmărit testarea probioticului înglobat în furajul granulat, după cum urmează:

- V1 (B1) – probă martor, în furaj nu s-a înglobat probiotic;
- V2 (B2) – concentrația probioticului *BioPlus® 2B* de $3,2 \times 10^9$ CFU/kg furaj;
- V3 (B3) – concentrația probioticului *BetaPlus®* de $3,2 \times 10^9$ CFU/kg furaj;
- V4 (B4) – concentrația probioticului *Lactobact Premium* de $3,2 \times 10^9$ CFU/kg furaj.

Baza experimentală

Experimentul a urmărit evaluarea efectului probioticelor asupra stării fiziologice și performanței de creștere a puietului de crap. Acest experiment s-a desfășurat în 4 variante experimentale pe parcursul unei perioade de 35 de zile.

Variantele folosite în vederea cercetărilor efectuate în bazinele experimentale au fost următoarele:

- I. Bazinul 1 (V1) – varianta martor;
- II. Bazinul 2 (V2) – varianta cu probioticul *BioPlus® 2B*;
- III. Bazinul 3 (V3) – varianta cu probioticul *BetaPlus®*;
- IV. Bazinul 4 (V4) – varianta cu probioticul *Lactobact premium*.

Cercetările din cadrul acestui experiment s-au desfășurat într-un sistem recirculant intensiv de creștere, tip acvariu, ale cărui unități de creștere sunt prezentate în figura 3.1.



Figura 3.1. Unitățile sistemului de creștere intensivă, de tip acvariu (foto original).

III.2.2. Metode de determinare a parametrilor de calitate ai apei

Principala atenție în desfășurarea experimentului s-a acordat controlului zilnic a parametrilor de calitate a apei și menținerii acestora în limitele optime pentru specia *Cyprinus carpio*, Linnaeus 1758 (crap).

III.2.3. Metodologia privind evaluarea indicatorilor de performanță tehnologică

La sfârșitul experimentului, după ce peștii au fost cântăriți și măsurați, s-au calculat următorii indicatori biotehnologici: sporul real de creștere [**Sr**]; ritmul zilnic de creștere [**GR**]; factorul de conversie a hranei [**FCR**]; rata specifică de creștere [**SGR**]; eficiența utilizării proteinei [**PER**].

III.2.4. Metode de investigații hematologice și biochimice

Pentru analizele hematologice s-au folosit metode curente aplicate în hematologia veterinară (Blaxhal, 1973, Ghergariu și colab. 1985, Svobodova, Z., 1991). La sfârșitul perioadei experimentale, fără a periclita latura tehnologică a experimentului, prin manipulare în condiții de securitate a biomasei de cultură, s-au prelevat probe biologice de sânge (cca. 2 – 2,5 ml) de la 6 exemplare/unitatea de creștere (reprezentând 85 % din populația fiecăruia).

III.2.5. Metode de analiză microbiologică

Prelevarea probelor microbiologice s-a realizat pe material biologic sacrificat. Protocolul utilizat pentru cultivarea, analiza, izolarea și identificarea bacteriilor care colonizează tractusul intestinal al speciei *Cyprinus carpio* este cel descris în lucrarea *Bacteria from Fish and Other Aquatic Animals – A Practical Identification Manual*, Nicky B. Buller 2009. Investigațiile microbiologice au fost realizate pe probe prelevate de la 12 exemplare de puiet de crap, crescuți în sistemul recirculant experimental. Au fost prelevate probe de microbiologie de la nivelul tractusului digestiv, din următoarele zone:

- zona inițială a intestinului;
- zona medie a intestinului;
- zona posterioară a intestinului.

Identificarea speciilor de bacterii s-a realizat cu ajutorul galeriilor de identificare API 20NE (sistem de identificare pentru nonenterobacteriacee), API 20E (sistem de identificare pentru enterobacteriacee), API STAPH (sistem de identificare pentru stafilococi), rapid ID 32 E (sistem de identificare rapidă a enterobacteriaceelor), API 50CHB (sistem standardizat pentru determinarea metabolismului carbohidraților). Testele au avut la bază protocolul de lucru dezvoltat în colaborare cu specialiștii din cadrul CCDP Nucet și modificat după cum urmează:

Tabelul 3.2. Protocol experimental pentru analizele microbiologice la specia *Cyprinus carpio*, Linnaeus 1758

Ziua	Activitatea	Metoda sau tehnica de lucru
Ziua 1	1. Prelevarea probelor și pregătirea lor	Tehnica descrisă de Whitman, K.A., 2004
	2. Inocularea probelor pe plăci Petri ce conțin medii solide uzuale, neselective (agar nutritiv sau MacConkey, agar-sânge) sau în tuburi cu medii lichide (bulion nutritiv sau MacConkey) (placile sau tuburile primare)	Inoculare de adâncime
	3. Incubarea plăcilor primare la o temperatură și atmosferă adecvată	T=25°C, la termostat, pentru 2-5 zile
Ziua 2 (24h)	1. Examinarea plăcilor primare însămânțate	Determinarea NTG-ului în plăcile cu mediu solid
	2. Selectarea coloniilor și subcultivarea lor pe aceleași medii solide ca în primul caz (medii universal valabile) pentru a obține culturi pure de bacterii (placile secundare)	T=25°C, la termostat, pentru 2-5 zile
	3. Re-incubarea primelor plăci sau tuburi	T=25°C, la termostat, pentru 2-5 zile
	4. Incubarea tuturor placilor (primare și secundare) în aceleași condiții de mediu ca în prima zi	T=25°C, la termostat, pentru 2-5 zile
Ziua 3 (48h)	1. Re-examinarea primelor plăci pentru identificarea bacteriilor cu care prezintă o viteză mai mică de creștere	Determinarea NTG-ului în plăcile cu mediu solid
	2. Verificarea purității subculturilor pe plăcile secundare	
	3. Realizarea primelor teste de identificare	
	4. Inocularea seturilor de identificare pentru studiul caracterelor biochimice ale microorganismelor	Medii sterile pregătite anterior în laborator sau kituri comerciale tip API
	5. Re-incubarea plăcilor primare	
Ziua 4 (72h)	1. Re-examinarea primelor plăci pentru bacteriile cu viteză mică de creștere. Re-incubarea plăcilor dacă există suspiciunea că	Determinarea NTG-ului în plăcile cu mediu solid

există bacterii care au nevoie de mai mult de 3 zile pentru creștere.	
2. Examinarea primelor seturi de identificare pentru studiul caracterelor biochimice ale microorganismelor însămânțate și înregistrarea rezultatelor după 24 h incubație	Citirea indicațiilor analitice trecute în tabelele de specialitate sau în prospectul testului de identificare utilizat.
Examinarea seturilor pentru caracterizarea biochimică a microorganismelor și înregistrarea rezultatelor la 48 de ore incubație. Se pot adăuga reactivii pentru reacția indolului, roșului de metil, reacției Voges-Proskauer	Citirea indicațiilor analitice trecute în tabelele de specialitate sau în prospectul testului de identificare utilizat.
Ziua 5 (96h)	
Interpretarea rezultatelor conform indicațiilor analitice de identificare	

III. 3. Rezultate și discuții

Cercetările experimentale au avut ca principal deziderat evaluarea efectului produselor probiotice asupra fiziologiei și performanței de creștere a puietului de crap (*Cyprinus carpio*, *Linnaeus 1758*) în sistem recirculant experimental. Evaluarea efectului probioticelor s-a realizat în patru variante experimentale (varianta martor, varianta cu *BioPlus® 2B*, varianta cu *BetaPlus®*, varianta cu *Lactobact premium*). În vederea evaluării efectului probioticelor utilizate asupra fiziologiei și performanței de creștere s-au realizat analize biochimice, hematologice și microbiologice.

III.3.1. Evaluarea dinamicii parametrilor de calitate a apei

Pentru sistemul recirculant experimental, parametrii de calitate ai apei au fost monitorizați prin analiza probelor de apă prelevate din unitățile de creștere. Fiind un sistem în care apa este recirculată într-o proporție de minim 90 %, echipamentele care asigură condiționarea calității apei (filtre mecanic, biologic, chimic) trebuie să fie eficiente. În plus, la nivelul fiecărui bazin se introduce aer sub presiune pentru asigurarea unui nivel optim al oxigenului solvit în apa tehnologică. Introducerea zilnică a unui volum de apă de înlocuire de 20-30 % din volumul total al sistemului a asigurat primenirea apei și menținerea celorlalți parametri chimici ai apei în ecartul optim, fără ca materialul de cultură să fie stresat.

III.3.2. Identificarea și caracterizarea microbiotei specifice speciei *Cyprinus carpio*, Linnaeus 1758

În vederea efectuării analizei și caracterizării microbiotei specifice speciei *Cyprinus carpio* crescut în sistemul recirculant experimental s-a realizat cultivarea, izolarea și testarea biochimică a tulpinilor bacteriene crescute în urma incubării, precum și identificarea acestora, rezultatele obținute fiind prezentate în cele ce urmează (tabelul 3.3.). Pe lângă microorganismele identificate și prezentate în tabelul 3.3., au fost întâlnite și bacteriile probiotice înglobate în furajul utilizat din genurile *Bacillus*, *Lactobacillus* și *Bifidobacterium*.

Tabelul 3.3. Specile de bacterii identificate la specia *Cyprinus carpio*, Linnaeus 1758.

Exemplar crap	Zona inițială a intestinului	Zona medie a intestinului	Zona posterioară a intestinului
1	Neexaminat	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Aeromonas hydro/caviae</i>
		<i>Shewanella putrefaciens</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>
		<i>Shewanella oneidensis</i>	
		<i>Staphilococcus xylosus</i>	
		<i>Acinetobacter sp</i>	
2	Neexaminat	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Aeromonas hydro/caviae</i>
		<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Shewanella putrefaciens</i>
		<i>Shewanella oneidensis</i>	
		<i>Serratia rubidaea</i>	
		<i>Aeromonas sobria</i>	
		<i>Aeromonas caviae</i>	
3	Neexaminat	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Aeromonas hydro/caviae</i>
		<i>Aeromonas hydro/caviae</i>	<i>Aeromonas sobria</i>
		<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Shewanella putrefaciens</i>
		<i>Shewanella putrefaciens</i>	
4	Neexaminat	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>
		<i>Aeromonas hydro/caviae</i>	<i>Aeromonas sobria</i>
		<i>Pseudomonas fluorescens</i>	
5	<i>Shewanella oneidensis</i>	Neexaminat	<i>Aeromonas sobria</i>
	<i>Aeromonas sobria</i>		<i>Aeromonas caviae</i>
	<i>Acinetobacter sp</i>		<i>Shewanella</i>

			<i>putrefaciens</i>
6	<i>Aeromonas sobria</i>	Neexaminat	<i>Aeromonas caviae</i>
	<i>Serratia rubidaea</i>		<i>Shewanella putrefaciens</i>
7	<i>Staphilococcus xylosus</i>	Neexaminat	<i>Aeromonas sobria</i>
	<i>Serratia rubidaea</i>		<i>Shewanella putrefaciens</i>
8	<i>Pseudomonas mendocina</i>	<i>Pantoea spp 3</i>	<i>Neexaminat</i>
	<i>Staphilococcus xylosus</i>	<i>Staphilococcus xylosus</i>	
	<i>Shewanella oneidensis</i>	<i>Proteus penneri</i>	
	<i>Serratia rubidaea</i>		
9	<i>Aeromonas sobria</i>	<i>Staphilococcus xylosus</i>	<i>Neexaminat</i>
	<i>Pseudomonas mendocina</i>		
	<i>Shewanella oneidensis</i>	<i>Pantoea spp 3</i>	
10	<i>Aeromonas sobria</i>	<i>Serratia rubidaea</i>	<i>Neexaminat</i>
	<i>Shewanella oneidensis</i>	<i>Aeromonas sobria</i>	
	<i>Serratia rubidaea</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	

În procesul de selecționare a microorganismelor cu beneficii asupra sănătății gazdei, trebuie îndeplinite mai multe criterii. Pentru a fi capabile să colonizeze tractul intestinal, potențialele microorganisme probiotice ar trebui să prezinte rezistență ridicată la acid și bilă și capacitate de aderență la suprafața intestinală.

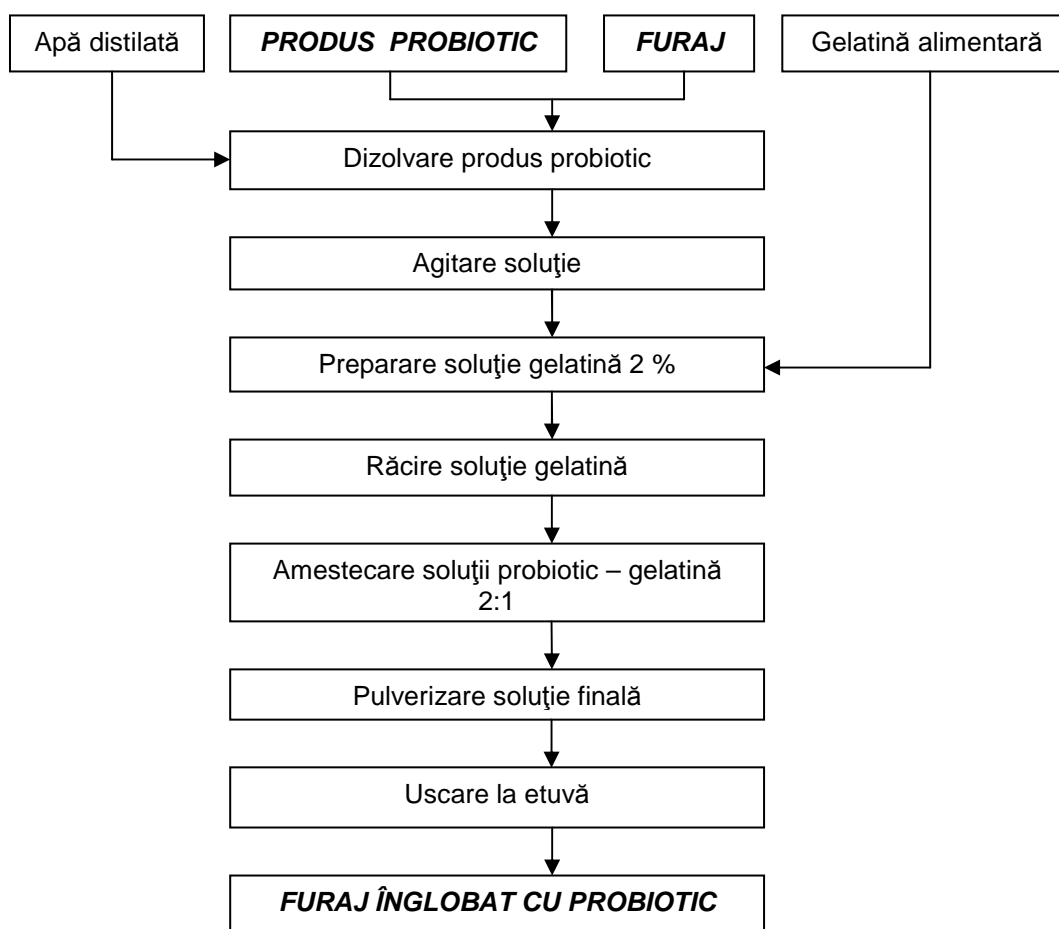
Aceste rezultate sunt în conformitate cu cele ale altor cercetători care au demonstrat că microorganismele probiotice reduc proliferarea patogenilor prin competiția aderenței la substrat.

III.3.3. Evaluarea efectului probioticelor asupra fiziologiei și performanței de creștere puietului de crap (*Cyprinus carpio*, Linnaeus 1758)

Cercetările experimentale realizate au avut ca principal obiectiv optimizarea managementului tehnologic de hrănire prin utilizarea diferitelor tipuri de probiotice înglobate în furajul administrat pe perioada experimentală, în sistemul recirculant experimental.

În urma cercetărilor efectuate s-a ajuns la schema cadru tehnologică de înglobare a probioticelor în furaj, după cum urmează:

Figura 3.31. Schema cadru tehnologică de înglobare a probioticelor în furaj.



III.3.3.1. Analiza indicatorilor biotehnologici

Obiectivul principal al acestui experiment a constat în evaluarea efectului diferitelor tipuri de probiotice utilizate asupra performanței de creștere prin analiza indicatorilor biotehnologici, astfel încât, raportul între rata de creștere și eficiența valorificării hranei (înglobate cu probiotic) să conducă la obținerea unei producții generatoare de profit.

Rezultatele obținute în urma experimentării sunt prezentate în tabloul sintetic privind indicatorii de performanță tehnologică a puietului de crap în cele 4 variante experimentale cu câte trei repetiții pentru fiecare variantă.

Tabelul 3.5. Tablou sintetic privind indicatorii de performanță tehnologică a puietului de crap în varianta martor.

Bazinul 1 (V1)				
Repetiția experimentală	R1	R2	R3	Media ± SD
Indicatorul:				
Concentrație probiotic (mg/ratia zilnica)	0	0	0	0
Concentrație probiotic (CFU/kg furaj)	0	0	0	0
Supraviețuirea (%)	100	100	100	100±0
Biomasa inițială (g)	266	275	276	272±5.50
Biomasa finală (g)	448	418	433	433±15
Spor creștere biomasa (g)	182	143	157	161±19.75
Masa medie inițială (g/ex)	38	39	39	39±0.78
Masa medie finală (g/ex)	64	60	62	62±2.14
Spor creștere individual (g)	26	20	22	23±2.82
Zile creștere	35	35	35	35±0
Proteina brută furaj (PB %)	41.0	41.0	41.0	41±0
Ratia zilnică (% biomasa)	3.5	3.5	3.5	4±0
Cantitatea totală de furaje distribuite (g)	317	317	317	317±0
GR (Rata creșterii zilnice) (g/zi)	5.20	4.09	4.49	5±0.56
SGR (%/zi)	1.49	1.20	1.29	1±0.15
FCR (g furaj/g spor biomasa)	1.74	2.22	2.02	2±0.23
PER (raportul eficienței proteinelor) (g/g)	1.40	1.10	1.21	1±0.15
Cantitatea totală de probiotic utilizată (g)	0	0	0	0

Tabelul 3.6. Tablou sintetic privind indicatorii de performanță tehnologică a puietului de crap în varianta cu BioPlus® 2B.

Bazinul 2 (V2)				
Repetiția experimentală	R1	R2	R3	Media ± SD
Indicatorul:				
Concentrație probiotic (mg/ratia zilnica)	5,5	5,5	5,5	5,5±0
Concentrație probiotic (CFU/kg furaj)	3,2×10 ⁹	3,2×10 ⁹	3,2×10 ⁹	3,2×10 ⁹
Supraviețuirea (%)	100	100	100	100±0
Biomasa inițială (g)	288	288	266	280.66±12.70
Biomasa finală (g)	481	492	438	470.33±28.53
Spor creștere biomasa (g)	193	204	172	189.66±16.25
Masa medie inițială (g/ex)	41	41	38	40.09±1.81
Masa medie finală (g/ex)	69	70	63	67.19±4.07
Spor creștere individual (g)	28	29	25	27.09±2.32
Zile creștere	35	35	35	35±0
Proteina brută furaj (PB %)	41.0	41.0	41.0	41±0
Ratia zilnică (% biomasa)	3.5	3.5	3.5	3.5±0
Cantitatea totală de furaje distribuite (g)	317	317	317	317±0
GR (Rata creșterii zilnice) (g/zi)	5.51	5.83	4.91	5.41±0.46
SGR (%/zi)	1.47	1.53	1.42	1.47±0.05
FCR (g furaj/g spor biomasa)	1.64	1.55	1.84	1.67±0.14
PER (raportul eficienței proteinelor) (g/g)	1.48	1.57	1.32	1.45±0.12
Cantitatea totală de probiotic utilizată (g)	0,193	0,193	0,193	0,193±0

Tabelul 3.7. Tablou sintetic privind indicatorii de performanță tehnologică a puietului de crap în varianta cu BetaPlus®.

Bazinul 3 (V3)				
Repetiția experimentală	R1	R2	R3	Media ± SD
Indicatorul:				
Concentrație probiotic (mg/ratia zilnica)	3,3	3,3	3,3	3,3±0
Concentrație probiotic (CFU/kg furaj)	3,2×10 ⁹	3,2×10 ⁹	3,2×10 ⁹	3,2×10 ⁹
Supraviețuirea (%)	100	100	100	100±0
Biomasa inițială (g)	282	278	274	278±4
Biomasa finală (g)	478	461	451	463.33±13.65
Spor creștere biomasa (g)	196	183	177	185.33±9.71
Masa medie inițială (g/ex)	40	40	39	39.71±0.57
Masa medie finală (g/ex)	68	66	64	66.19±1.95
Spor creștere individual (g)	28	26	25	26.47±1.38
Zile creștere	35	35	35	35±0
Proteina brută furaj (PB %)	41.0	41.0	41.0	41±0
Ratia zilnică (% biomasa)	3.5	3.5	3.5	3.5±0
Cantitatea totală de furaje distribuite (g)	317	317	317	317±0
GR (Rata creșterii zilnice) (g/zi)	5.60	5.23	5.06	5.29±0.27
SGR (%/zi)	1.51	1.45	1.42	1.45±0.04
FCR (g furaj/g spor biomasa)	1.62	1.73	1.79	1.71±0.08
PER (raportul eficienței proteinelor) (g/g)	1.51	1.41	1.36	1.42±0.07
Cantitatea totală de probiotic utilizată (g)	0,116	0,116	0,116	0,116±0

Tabelul 3.8. Tablou sintetic privind indicatorii de performanță tehnologică a puietului de crap în varianta cu Lactobact Premium.

Bazinul 4 (V4)				
Repetiția experimentală	R1	R2	R3	Media ± SD
Indicatorul:				
Concentrație probiotic (mg/ratia zilnica)	17,6	17,6	17,6	17,6±0
Concentrație probiotic (CFU/kg furaj)	3,2×10 ⁹	3,2×10 ⁹	3,2×10 ⁹	3,2×10 ⁹
Supraviețuirea (%)	100	100	100	100±0
Biomasa inițială (g)	272	260	272	268±6.92
Biomasa finală (g)	443	434	435	437.33±4.93
Spor creștere biomasa (g)	171	174	163	169.33±5.68
Masa medie inițială (g/ex)	39	37	39	38.28±0.98
Masa medie finală (g/ex)	63	62	62	62.47±0.70
Spor creștere individual (g)	24	25	23	24.19±0.81
Zile creștere	35	35	35	35±0
Proteina brută furaj (PB %)	41.0	41.0	41.0	41±0
Ratia zilnică (% biomasa)	3.5	3.5	3.5	3.5±0
Cantitatea totală de furaje distribuite (g)	317	317	317	317±0
GR (Rata creșterii zilnice) (g/zi)	4.89	4.97	4.66	4.83±0.16
SGR (%/zi)	1.39	1.46	1.34	1.39±0.06
FCR (g furaj/g spor biomasa)	1.85	1.82	1.94	1.87±0.06
PER (raportul eficienței proteinelor) (g/g)	1.32	1.34	1.25	1.30±0.04
Cantitatea totală de probiotic utilizată (g)	0,616	0,616	0,616	0,616±0

Pe toată perioada experimentală s-a urmărit optimizarea parametrilor furajării (rație furajeră și număr de mese) și eficiența utilizării diferitelor probiotice înglobate în furajele administrate (indicele de conversie al furajelor înglobate cu probiotic).

În cele patru variante experimentale, (V1 – varianta martor; V2 – varianta cu probioticul *BioPlus® 2B*; V3 – varianta cu probioticul *BetaPlus®*; V4 – varianta cu probioticul *Lactobact premium*), s-au obținut sporuri de creștere semnificative, în condițiile unei supraviețuirii de 100 % în toate repetițiile (fig. 3.32.).

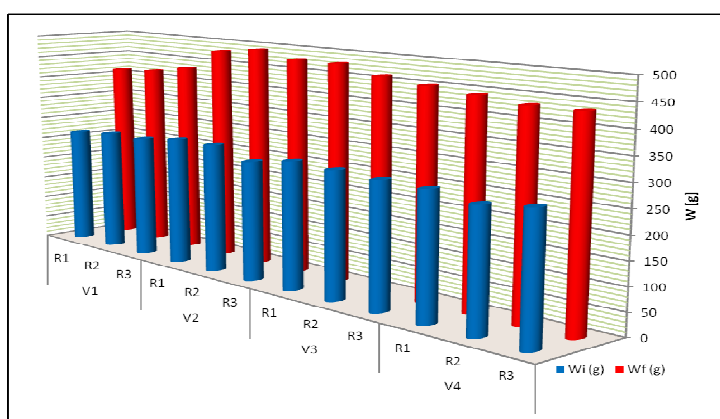


Figura 3.32. Dinamica ritmului de creștere în cele patru variante experimentale.

Printre cei mai semnificativi indicatori tehnologici se numără rata creșterii specifice (SGR) și coeficientul de conversie a hranei (FCR). Ambii indicatori au fost mai buni în varianta V2, unde s-a înregistrat o valoare mai mare. Astfel, în varianta V1 s-a obținut o valoare a SGR 1,20 g%/zi și un FCR de 2,22 g furaj/g spor creștere, în timp ce în varianta V2 s-a obținut o valoare a SGR de 1,53 g%/zi și un FCR de 1,55 g furaj/g spor creștere. Din figura 3.34. se observă corelația inversă ce există în mod logic între evoluția SGR și FCR; întotdeauna un FCR scăzut se obține atunci când SGR-ul crește.

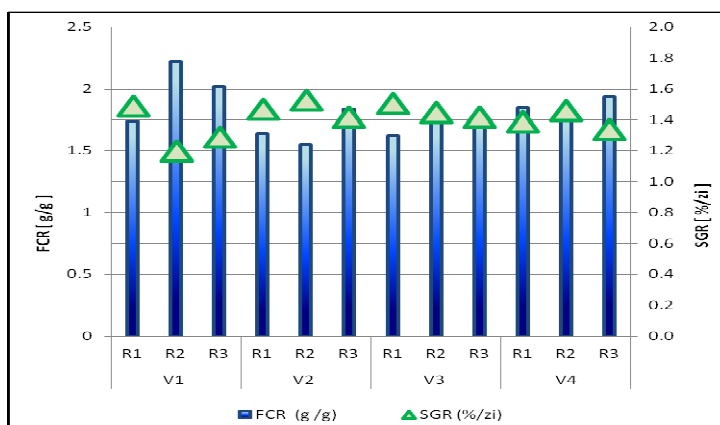


Figura 3.34. Variația coeficientului de conversie a hranei (FCR) și a ratei creșterii specifice (SGR).

Rezultatele obținute în cadrul acestui experiment evidențiază o creștere mai mare în varianta experimentală V2 (probioticul *BioPlus® 2B*) cu diferențe nesemnificative între repetițiile monitorizate.

III.3.3.2. Analiza biochimică și hematologică a sângelui

Hematopoieza este procesul de formare a elementelor figurate ale sângelui. Acest proces se desfășoară în țesuturile și organele specializate pentru acestea care se numesc țesuturi hematopoetice. În această etapă se începe cu celula stem multipotentă, foarte tânără, plastică, cu mari posibilități de a se transforma în alte celule stem, cap de serie pentru celelalte categorii de elemente celulare sanguine, pentru celelalte linii sanguine (eritrocite, granulocite, monocite, limfocite, trombocite) (fig. 3.35.).

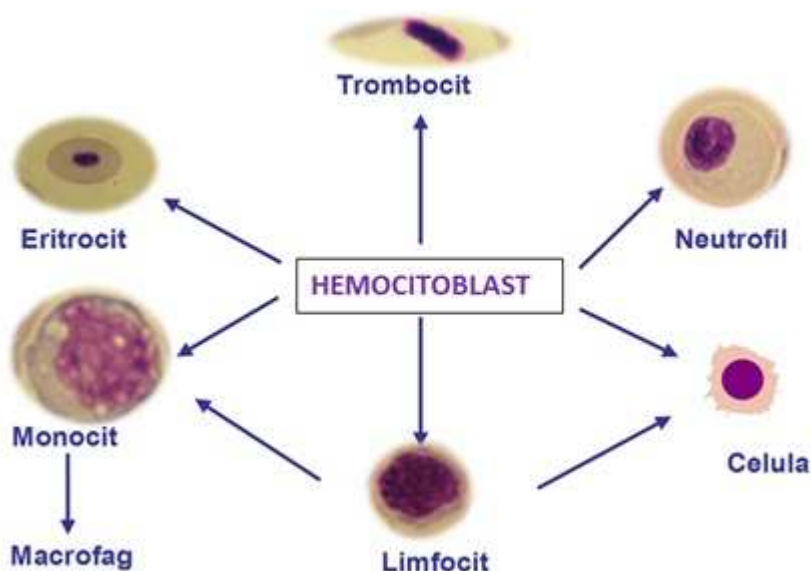


Figura 3.35. Hematopoieza la specia *Cyprinus carpio* (foto original).

Prin prelevarea probelor de sânge s-a urmărit aprecierea stării de sănătate și stabilirea relațiilor între indicii hematologici și diferite tipuri de probiotice utilizate în rația alimentară pentru creșterea puietului de crap în sistemul recirculant experimental. Colectarea probelor de sânge pentru determinările hematologice s-a efectuat la finalul perioadei experimentale în vederea identificării modificărilor survenite între varianta de control (martor) și variantele cu probiotice diferite. Pentru o apreciere de acuratețe s-a prelevat probe de sânge de la câte 6 exemplare/unitatea de creștere (reprezentând 85 % din biomasă) însumând un număr total de 72 probe de sânge. Indicatorii hematologici luați în studiu au fost hemoglobina, hematocritul și numărul de eritrocite, și constantele eritrocitare derivate VEM, HEM și CHEM, parametri semnificativi în caracterizarea stării fiziologice a peștilor.

Tabelul 3.9. Valorile înregistrate pentru hemoglobină, hematocrit și număr de eritrocite la puietul de crap hrănit cu probiotice diferite.

Variante exp.	Hb (g/dl)		Ht (%)		Nr. eritrocite (mil/ μ l)	
	min-max	X \pm SD	min-max	X \pm SD	min-max	X \pm SD
V1	8.96-11.08	10.15 \pm 0.56	26-35	31.52 \pm 2.37	1.20-1.92	1.47 \pm 0.14
V2	8.36-12.61	11.02 \pm 1.08	25-40	34.41 \pm 3.37	1.24-1.65	1.53 \pm 0.11
V3	6.42-13.26	11.20 \pm 1.88	19-40	33.76 \pm 4.30	1.36-1.76	1.56 \pm 0.11
V4	10.47-13.60	11.84 \pm 0.87	30-38	34.33 \pm 2.44	1.46-1.94	1.72 \pm 0.14

După cum se poate constata, din datele înscrise în tabelul 3.9., în perioada experimentală *hemoglobina* indică o creștere de până la 11,84 g/dl în varianta V4, comparativ cu varianta de martor unde hemoglobina a înregistrat o valoare de 10,15 g/dl, media acesteia din urmă încadrându-se în intervalul de normalitate (6,5-10,6 g/dl).

Hematocritul în cele trei variante experimentale cu probiotice diferite a înregistrat o creștere ușoară față de varianta martor (de până la 34,33 % în varianta V4), având în medie o valoare apropiată (31,52 %) de limita inferioară a intervalului de normalitate (32-43,8 %).

Numărul de eritrocite a înregistrat o creștere progresivă, cu valori medii cuprinse între 1,53 mil/ μ l și 1,72 mil/ μ l în variantele cu probiotice diferite, față de varianta martor unde media numărului de eritrocite a fost de 1,47 mil/ μ l, toate valorile obținute plasându-se în domeniul de normalitate (1,10-2,20 mil/ μ l).

Valorile obținute pentru acești indicatori hematologici intră în formulele pentru calcularea și caracterizarea constantelor eritrocitare derivate, conform tabelului 3.10.

Tabelul 3.10. Valorile înregistrate pentru constantele eritrocitare (VEM, HEM și CHEM) la puietul de crap hrănit cu probiotice diferite.

Variante exp.	VEM		HEM		CHEM	
	min-max	X \pm SD	min-max	X \pm SD	min-max	X \pm SD
V1	179.93-252.70	214.72 \pm 21.44	51.97-81.83	69.25 \pm 6.86	26.74-36.46	32.37 \pm 2.91
V2	195.71-280.70	224.88 \pm 22.13	64.37-86.60	72.02 \pm 6.89	28.78-33.69	32.06 \pm 1.32
V3	139.70-250.89	215.64 \pm 25.82	40.93-85.95	71.58 \pm 11.58	20.08-37.89	33.26 \pm 4.12
V4	173.44-228.22	199.24 \pm 13.71	56.99-79.89	68.78 \pm 5.57	31.09-39.10	34.56 \pm 2.31

Din analiza valorilor calculate pentru constantele eritrocitare s-a constatat următoarele modificări:

- *Volumul eritocitar mediu (VEM)*, a variat între 199.24 \pm 13.71 μ m³ în varianta V4 și 224.88 \pm 22.13 μ m³ în varianta V2 față de 214.72 \pm 21.44 μ m³ în varianta martor V1; valorile înregistrate fiind în domeniul de normalitate al acestui parametru (152-364 μ m³);
- Hemoglobina eritocitară medie (HEM) a înregistrat o medie de 69.25 \pm 6.86 pg în varianta martor V1, comparativ cu 72.02 \pm 6.89 pg în varianta V2 și 68.78 \pm 5.57 pg în

varianta V4, ceea ce înseamnă că valorile obținute sunt peste limita superioară a intervalului de normalitate (50-63 pg);

- *Concentrația de hemoglobină eritocitară medie (CHEM)* a înregistrat o ușoară creștere de la 32.37 ± 2.91 g/dl în varianta martor V1 până 34.56 ± 2.31 g/dl în varianta V4, valori care au depășit domeniul de normalitate (15-25 g/dl).

Din analiza rezultatelor obținute cu privire la indicatorii hematologici, se constată că în funcție de natura probioticului utilizat, nivelul de hemoglobină, valorile hematocritului și numărul de eritrocite indică un necesar mai mare de oxigen în cazul variantelor experimentale V3 și V4, comparativ cu varianta martor. Aceasta a indus o creștere accentuată a numărului de eritrocite, ele fiind recunoscute ca transportori de oxigen și dioxid de carbon în procesele de respirație.

Evaluarea reacțiilor leucocitare la puietul de crap, crescut într-un sistem recirculant experimental în condițiile utilizării probioticelor diferite.

În urma examinării microscopice a frotiurilor de sânge, colorate MGG, la puietul de crap din cele patru variante experimentale (respectiv, 12 repetiții experimentale), *limfocitele* au dominat în comparație cu celelalte tipuri de leucocite, fiind prezente într-un număr foarte mare. Se remarcă prezența foarte redusă a monocitelor, dar și a granulocitelor euzinofile și bazofile din sângele circulant, în schimb granulocitele neutrofile au fost prezente în toate variantele într-un număr apreciabil comparativ cu celelalte tipuri de granulocite.

Tabelul 3.11. *Media numărului absolut leucocitar al sângelui puietului de crap la finalul experimentului cu probiotice diferite.*

Varianta experimentală		Număr absolut (%)					
		limfocite		monocite	granulocite		
		mici	mari		neutrofile	eozinofile	bazofile
V1	R1	94.0	1.6	0.4	3.6	0.1	0
	R2	93.8	0.9	0.7	4.6	0.1	0
	R3	93.9	1.3	0.1	4.5	0.3	0
V2	R1	97.8	0.5	0.0	1.5	0.2	0
	R2	96.4	0.8	0.0	2.3	0.6	0
	R3	96.5	0.9	0.1	2.6	0.0	0
V3	R1	95.9	0.4	0.4	3.3	0.1	0
	R2	97.6	0.1	0.0	2.3	0.0	0
	R3	94.7	0.3	0.2	4.9	0.0	0
V4	R1	98.3	0.1	0.0	1.6	0.0	0
	R2	97.0	0.3	0.2	2.2	0.3	0
	R3	95.1	0.6	0.2	4.1	0.0	0

Studiile efectuate asupra tabloului leucocitar al diferitelor specii de pești au evidențiat faptul că acestia, spre deosebire de vertebratele superioare, posedă un sistem leucocitar

limfocitic (Ellis, A.S., 1977, Mondra, H. și col., 1998). Analizând numărul absolut de limfocite, se observă că acestea, raportat la celelalte tipuri de leucocite sunt dominante.

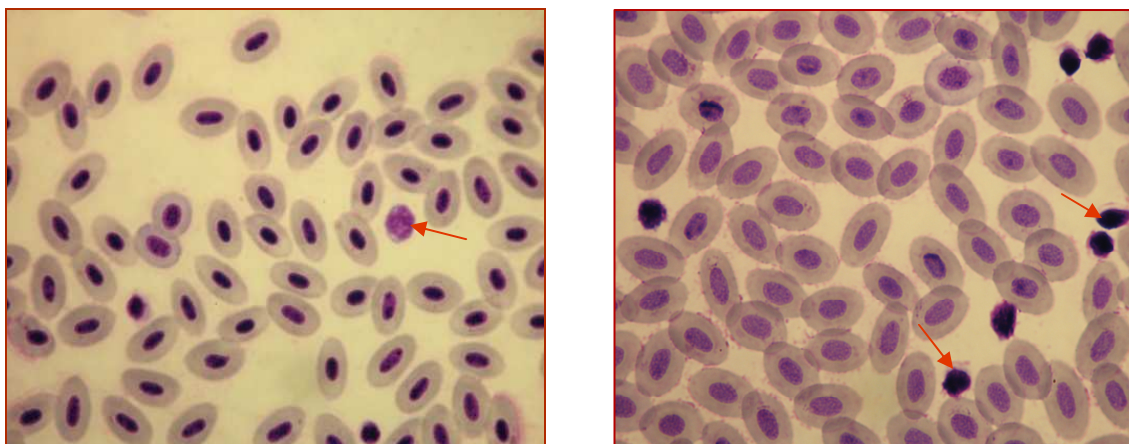


Foto 3.8. Limfocit mare și limfocite mici (10 oc x 100 ob, MGG – foto original).

Din categoria *limfocitelor granulocite*, neutrofilele au fost cele mai numeroase, identificându-se neutrofile în curs de segmentare și neutrofile segmentate într-o proporție mai mică în toate variantele experimentale.

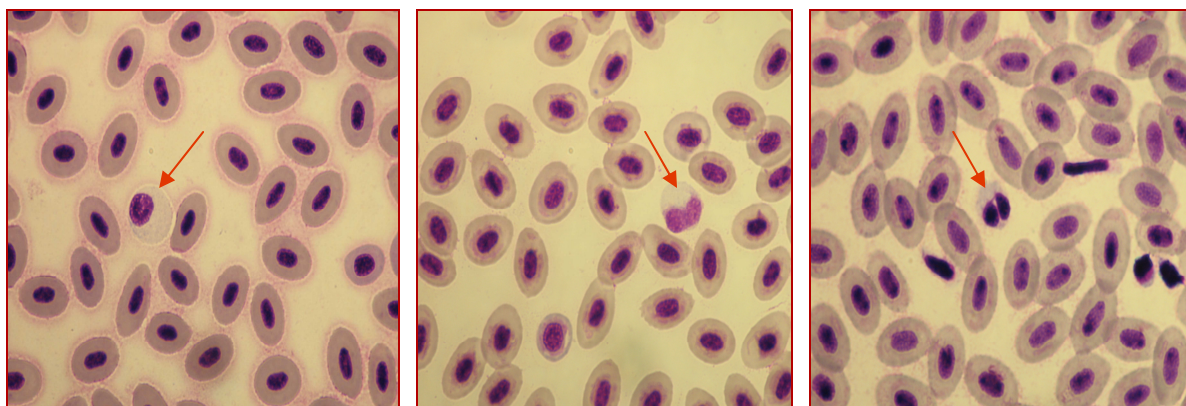


Foto 3.10. Neutrofil în curs de segmentare și neutrofil segmentat (10 oc x 100 ob, MGG – foto original).

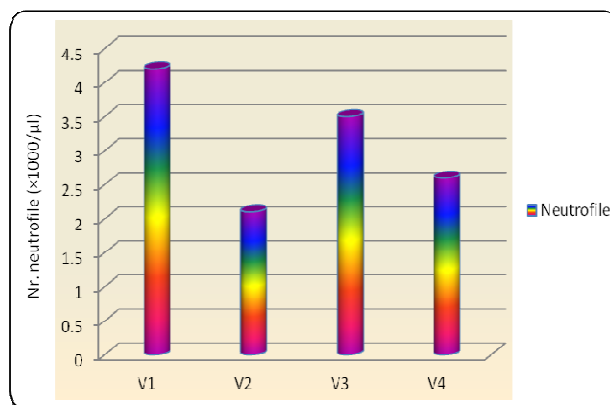


Figura 3.45. Media numărului absolut de neutrofile la finalul experimentului.

În cazul celor patru variante experimentale, numărul absolut al neutrofilelor evidențiază o *reacție neutrofilemică* neuniformă, cu unele modificări între varianta martor și variantele cu probiotice diferite. Astfel, se remarcă o reducere a procentului de neutrofile circulante în sângele puietului de crap din variantele V2, V3 și V4 față de varianta martor V1 (4,2 % în varianta martor, 2,1 % varianta V2, 3,5 % în varianta V3 și 2,6 % în varianta V4).

Analiza biochimică a sângelui

Glucoza este cea mai importantă componentă a glucidelor plasmatică și reprezintă o sursă permanentă și imediată de energie necesară pentru funcționarea inimii și a mușchilor. Concentrația de glucoză din sânge, exprimată în mg/dl este definită prin glicemie. Rezultatele obținute în urma determinării concentrației de glucoză din ser sunt prezentate în figura următoare:

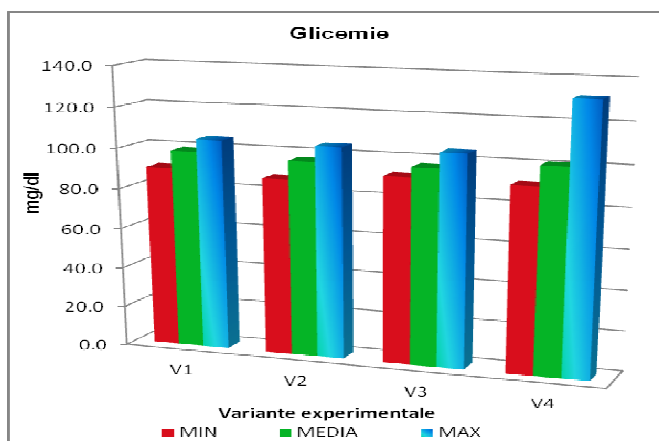


Figura 3.47. Valorile glicemiei înregistrate la finalul experimentului cu probiotice diferite.

În cazul experimentului de față valoarea glicemiei determinată la peștii proveniți din cele 4 variante experimentale (figura 3.47.) a înregistrat valori relativ constante care s-au încadrat puțin peste limitele normale (40-90 mg/dl), obținându-se o medie de 98.80 mg/dl în varianta martor și 97,00 mg/dl; 97.08 mg/dl; 101.07 mg/dl în variantele cu probiotice diferite.

III.3.3.3. Analiza biochimică a cărnii de pește

Analizele biochimice ale compoziției țesutului muscular (pentru fiecare variantă, considerate pentru greutatea medie a exemplarelor) au fost efectuate la finalul perioadei experimentale (după 35 de zile).

Rezultatele investigațiilor privind determinarea compoziției biochimice a cărnii exemplarelor de puiet de crap, crescut în sistemul recirculant experimental, este prezentată în figura 3.48.

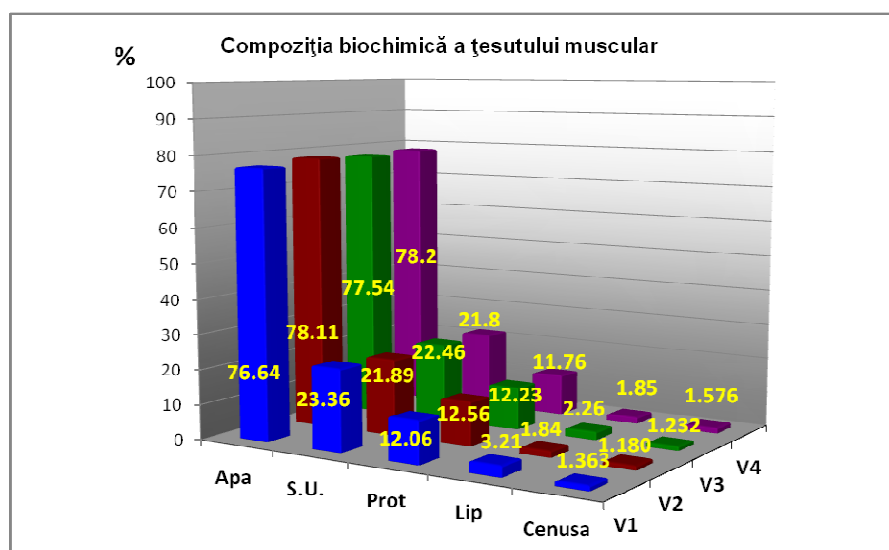


Figura 3.48. Compoziția biochimică a țesutului muscular la finalul perioadei experimentale.

În concluzie, putem afirma că, probioticele diferite înglobate în furajul administrat puietului de crap în sistem recirculant experimental are o influență pozitivă asupra performanței de creștere a materialului biologic, în timp ce compoziția biochimică este mai puțin afectată (calitatea țesutului muscular al puietului de crap din varianta martor a fost aproape similară cu cea a puietului de crap din cele trei variante experimentale cu probiotice diferite).

III.4. Concluzii

În urma cercetărilor realizate privind efectului probioticelor asupra fiziologiei și performanței de creștere a puietului de crap (*Cyprinus carpio*, Linnaeus 1758) s-au desprins următoarele concluzii:

- ☑ Analiza tabloului privind **indicatorii de calitate a apei** evidențiază faptul că, utilizarea unui furaj în care s-a înglobat diferite probiotice nu a influențat în mod negativ calitatea apei tehnologice, parametrii monitorizați nu au înregistrat diferențe semnificative între variantele experimentale și s-au încadrat în ecartul optim al speciei studiate.
- ☑ Rezultatele obținute cu privire la identificarea **microbiotei specifice** speciei *Cyprinus carpio*, Linnaeus 1578 sunt în conformitate cu cele ale altor cercetători care au demonstrat că microorganismele probiotice reduc proliferarea patogenilor prin competiția aderenței la substrat.
- ☑ **Rezultatele obținute în cadrul acestui experiment** evidențiază un spor de creștere mai mare al biomasei de cultură în varianta experimentală V2 (probioticul *BioPlus® 2B*) cu diferențe nesemnificative între repetițiile monitorizate. Valori mai bune ale

factorului de conversie al hranei (FCR) au fost înregistrate la variantele experimentale cu probiotice diferite ceea ce sugerează că înglobarea probioticelor în furaj îmbunătățește utilizarea eficientă a hranei. Rezultate similare au fost raportate și pentru alte specii de pești, unde s-a demonstrat că digestibilitatea a crescut în mod considerabil, odată cu utilizarea unui probiotic în rația administrată (Tovar-Ramirez et al, 2004; Lara-Flores et al, 2003.).

- ☑ **Rata de supraviețuire a puietului** de crap a fost 100% după cele 35 de zile ale perioadei experimentale în toate variantele, ceea ce se explică prin faptul că materialul biologic a prezentat o stare de sănătate bună.
- ☑ Din analiza **indicatorilor hematologici și biochimici** ai puietului de crap crescut în sistemul recirculant experimental, se poate concluziona că în aceleași condiții de mediu utilizarea celor două probiotice (*BetaPlus®* - V3 și *Lactobact Premium* –V4) impune introducerea artificială a oxigenului dizolvat în sistemul recirculant, fapt ce conduce la o creștere a consumurilor, comparativ cu varianta V2 (*BioPlus®* 2B) în condiții economice normale. De asemenea, utilizarea celor două probiotice în variantele V3 și V4 prin exacerbarea sistemului eritropoetic, conduc la o epuizare fiziologică a organismului și totodată, la creșterea consumului în vederea echilibrării funcțiilor fiziologice. Aceasta se realizează prin consum ridicat de hrană și forțare a funcțiilor hepatice, în condițiile în care s-a stabilit clar o rată de creștere mai mică pentru aceste variante experimentale.
- ☑ Toate **probioticele utilizate** în vederea completării rațiilor administrate au condus la obținerea unor performanțe de creștere și utilizare a hranei mai eficiente, decât în varianta experimentală martor, sugerând că adăugarea de probiotice în furaj contribuie la reducerea costurilor de producție a puietului de crap (*Cyprinus carpio*, *Linnaeus 1758*). Rezultate similare au fost observate și de către Ghosh et al. (2003) și Swain et al. (1996) pentru crapul indian. Noh et al. (1994) și et al Bogut. (1998), de asemenea, a raportat că preparatele comerciale probiotice de *Enterococcus faecium* a îmbunătățit performanța de creștere și utilizarea eficientă a hranei la crap.

Analiza rezultatelor prezentate evidențiază faptul că probioticele în a căror compoziție intra cele două specii de *Bacillus* (*Bacillus subtilis* și *Bacillus licheniformis*) le recomandăm pentru a fi utilizate ca bioaditivi în nutriția crapului. Acest fapt, rezultând din analiza indicatorilor biotehnologici care sunt superiori în cazul variantelor la nivelul cărora s-a aplicat o rație furajară cu aceste specii de bacterii probiotice, în comparație cu varianta martor și varianta cu bacterii probiotice aparținând genului *Lactobacillus*.

Capitolul IV. CERCETĂRI PRIVIND INFLUENȚA PROBIOTICULUI LACTOBACT PREMIUM ASUPRA PROFILULUI HEMATOLOGIC LA CREȘTEREA PUIETULUI DE CRAP (*Cyprinus carpio*, Linnaeus 1758)

IV.1. Introducere

Termenul de „bacterie acido-lactică” (LAB) este folosit pentru a descrie un grup de tulpini și coci care au o structură gram-pozitivă, catalază negativă care nu sporulează, de obicei imobilă, fermentează carbohidrații și formează acid lactic ca rezultat unic sau ca produs final. După Aguirre și Collins (1993) LAB cuprinde genurile: *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Erysipelothrix*, *Gemella*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus* și *Vagococcus*.

IV.2. Material și metode

Cercetările efectuate se încadrează în categoria investigațiilor de tip experimental, desfășurate în stația pilot de cercetare a Departamentului de Acvacultură, Știința Mediului și Cadastru, Universitatea “Dunărea de Jos” din Galați.

IV.2.1. Materialul biologic

Experimentul s-a desfășurat pe o perioadă de 30 zile debutând pe data de 31.05.2011 și finalizându-se pe data de 29.06.2011. Materialul biologic utilizat în vederea populării sistemului de creștere a fost puietul de crap (*Cyprinus carpio*, Linnaeus 1758) provenit de la Centrul de Cercetare-Dezvoltare pentru Piscicultură - Nucet.

Caracteristicile probioticului utilizat în vederea testării.

Probioticul ***Lactobact premium*** înglobat în furajul administrat pe perioada experimentală a fost reprezentat de un amestec în mod egal format din: *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Streptococcus thermophilus* (produsul nu conține lactoză, gluten și drojdii). Concentrația bacteriilor probiotice este de 1×10^9 CFU/g pulbere.

Experimentul a fost organizat în 4 variante experimentale pe parcursul căruia s-a urmărit testarea probioticului înglobat în furajul granulat în diferite concentrații și influența bacteriilor lactice constituente asupra profilului hematologic al puietului de crap, după cum urmează:

- V1 (B1) – probă martor, în furaj nu s-a înglobat probiotic;
- V2 (B2) – concentrație probiotic *Lactobact premium* $0,28 \times 10^9$ CFU/g furaj;
- V3 (B3) – concentrație probiotic *Lactobact premium* $0,48 \times 10^9$ CFU/g furaj;
- V4 (B4) – concentrație probiotic *Lactobact premium* $0,88 \times 10^9$ CFU/g furaj.

IV.2.2. Baza experimentală

Cercetările din prezentul experiment au fost realizate în scopul evaluării influenței bacteriilor lactice asupra profilului hematologic la creșterea puietului de crap (*Cyprinus carpio*, Linnaeus 1758) în sistem recirculant. La populare, în sistem a fost introdus un număr de exemplare asigurator pentru realizarea prelucrării statistice, reprezentând 13,96 kg puiet de crap cu greutatea individuală medie de 96 g/ex.

Cercetările din cadrul acestui capitol s-au desfășurat în sistemul recirculant pilot din cadrul Departamentului de Acvacultură, Știința Mediului și Cadastru, Universitatea „Dunărea de Jos” Galați, ale cărui unități de creștere sunt prezentate în figura 4.2.



Figura 4.2. Unitățile sistemului de creștere intensivă tip acvariu (foto original).

Starea generală a peștilor (comportamentul hrănirii, înotulul, mortalitatea) a fost evaluată și înregistrată zilnic.

IV.3. Rezultate și discuții

Având în vedere că utilizarea probioticelor în acvacultură este acum unanim recunoscută ca fiind una dintre măsurile necesare pentru prevenirea și controlul îmbolnăvirilor, scopul acestui experiment a fost de a evalua o parte din proprietățile benefice a bacteriilor lactice și asupra profilului hematologic al puietului de crap în scopul fundamentării științifice necesare pentru a propune aplicarea lor ca microorganisme cu potențial probiotic.

IV.3.1. Evaluarea efectului probiotic al bacteriilor din genul *Lactobacillus* asupra profilului hematologic al puietului de crap (*Cyprinus carpio*, Linnaeus 1758)

Studiul realizat a avut ca obiectiv și evaluarea efectului bacteriilor lactice asupra profilului hematologic al puietului de crap crescut în sistem recirculant și a constatat în:

- evaluarea indicatorilor de performanță tehnologică;
- aprecierea și evaluarea stării de sănătate a materialului biologic prin modificările profilului hematologic al sângelui.

IV.3.1.1. Evaluarea dinamicii parametrilor de calitate a apei

Evoluția parametrilor fizico-chimici ai apei tehnologice, pe durata experimentului, s-au încadrat în limitele optime, din punct de vedere tehnologic.

În condițiile specifice sistemului de creștere folosit chimismul apei a fost menținut în intervale optime, echipamentul de condiționare a calității apei reușind să trateze și să reutilizeze apa tehnologică în condițiile în care pierderile zilnice de apă nu au depășit 10 % din volumul total de apă al sistemului recirculant.

IV.3.1.2. Analiza indicatorilor biotehnologici

Pentru acest experiment cele patru bazine ale sistemul recirculant au fost populate cu un număr aproximativ egal de exemplare reprezentând biomase sensibil egale: B1 – 3,43 kg, B2 – 3,50 kg, B3 – 3,54 kg, B4 – 3,48 kg și, deci, totalizând o biomasa totală de 13,96 kg.

La finalul experimentului, desfășurat pe parcursul a 30 de zile experimentale, densitatea de populare a atins 5,02 kg/m³ în B1, 4,53 kg/m³ în B2, 4,18 kg/m³ în B3 și 4,20 kg/m³ în B4 (figura 4.11.).

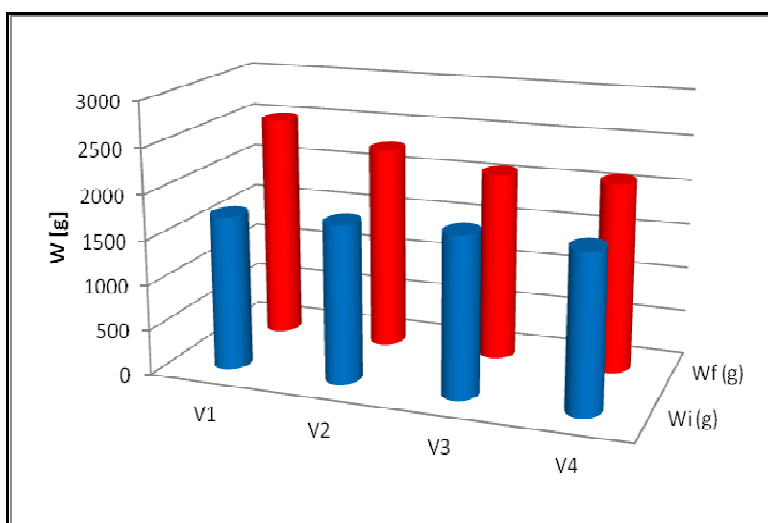


Figura 4.11. Biomasa inițială și finală a puietului de crap.

Rezultatele obținute în cadrul experimentului, referitoare la evoluția indicatorilor de performanță tehnologică a materialului biologic sunt redată sintetic în tabelul următor.

Tabelul 4.2. Tablou sintetic privind indicatorii biotehnologici ai puietului de crap în condițiile utilizării probioticului *Lactobact Premium*

Varianta experimentală Indicatorul	B1	B2	B3	B4
	V1-martor	V2	V3	V4
Concentrație probiotic (mg/rația zilnică)	0	280	480	880
Concentrație probiotic (CFU/g)	0	0,28×10 ⁹	0,48×10 ⁹	0,88×10 ⁹
Numar pești inițial	18	19	18	18
Număr pești final	18	19	15	16
Supraviețuirea (%)	100	100	83	89
Biomasa inițială (g)	1714	1750	1772	1742
Biomasa inițială (kg/m ³)	3.43	3.50	3.54	3.48
Biomasa finală (g)	2511	2265	2091	2101
Biomasa finală (kg/m ³)	5.02	4.53	4.18	4.20
Spor creștere biomasa (g)	797	515	319	359
Spor creștere biomasa (kg/m ³)	1.59	1.03	0.64	0.72
Masa medie inițială (g/ex)	95	92	98	97
Masa medie finală (g/ex)	140	119	139	131
Spor creștere individual (g)	44	27	41	35
Zile creștere	30	30	30	30
Proteina bruta furaj (PB %)	41.0	41.0	41.0	41.0
Ratia zilnică (% biomasa)	2.0	2.0	2.0	2.0
Cantitatea totală de furaje distribuite (g)	1050	1050	1050	1050
GR (Rata creșterii zilnice) (g/zi)	26.57	17.17	10.63	11.97
SGR (%/zi)	1.27	0.86	0.55	0.62
FCR (g furaj/g spor biomasa)	1.32	2.04	3.29	2.92
PER (raportul eficienței proteinelor) (g/g)	1.85	1.20	0.74	0.83
Cantitatea totală de probiotic utilizată (g)	0	8.4	14.4	26.4

Analiza indicatorilor de creștere evidențiază o performanță tehnologică mai mare a variantei martor față de cele trei variante cu concentrații diferite de probiotic, fiind diferențe semnificative (sporul de creștere în martor a fost de 797 g, comparative cu 319 g în varianta B3). Valorile experimentale au evidențiat o mai slabă valorificare a furajului înglobat cu probiotic în compoziția căruia intră bacteriile lactice și, în consecință, o mai slabă eficiență economică pentru varianta experimentală pentru care s-a aplicat o rație de furajeră cu aceste bacterii.

IV.3.1.3. Analiza hematologică și biochimică a sângelui

Dinamica indicatorilor și constantelor hematologice la exemplarele de puiet de crap, ce fac obiectul prezentului experiment, a fost analizată prin coroborare cu concentrațiile diferite de probiotic în a căruia compoziție intră bacteriile lactice, înglobat în diata furajeră din cele trei variante experimentale și o variantă martor.

Pentru a determina dacă conținutul anumitor concentrații diferite de bacterii lactice, din probioticul utilizat în furajul administrat, a determinat apariția unor modificări calitative ale profilului metabolic sanguin, s-a analizat variația valorilor indicilor hematologici, constantelor eritrocitare și diferitelor tipuri de leucocite la finalul perioadei experimentale, comparându-se varianta martor (V1) cu cele trei variante de diferite concentrații de bacterii lactice (V2, V3, V4).

Tabelul 4.3. Indicatorii hematologici ai puietului de crap la finalul experimentului.

Varianta exp.	Indicatorul hematologic (val. medii ± deviația standard)					
	Ht (%)	Hb (g/dl)	Nr. E $\times 10^6/\mu\text{l}$	VEM (μm^3)	HEM (pg)	CHEM (g/dl)
V1	33.57±3.06	6.76±0.87	1.75±0.13	192.92±22.36	38.88±6.15	20.48±4.51
V2	31.71±3.92	7.12±0.93	1.34±0.31	252.52±82.48	59.50±29.11	23.04±4.96
V3	32±3.70	6.92±0.79	1.74±0.20	184.65±20.65	40.56±8.34	22.08±4.26
V4	27.71±3.10	7.86±0.77	1.41±0.19	197±21.91	56.62±11.24	28.90±5.53

Analiza indicatorilor hematologici prezentați în tabelul 4.3. evidențiază o serie de modificări între varianta martor și celelalte variante experimentale, după cum urmează:

- *Hematocritul* în varianta martor s-a încadrat în intervalul de normalitate (32-43,9 %) înregistrând o valoare medie de 33,57 % în varianta martor, iar în cele trei variante s-au înregistrat o reducere de până la 27,71 % în varianta V4.
- *Hemoglobina* din sângele circulant al puietului de crap a înregistrat o creștere semnificativă în varianta V4 de până la 7,86 g/dl, comparativ cu varianta martor unde s-a înregistrat o medie de 6,76 g/dl, valorile obținute încadrându-se în intervalul de normalitate (6,5-10,6 g/dl).
- *Numărul de eritrocite* din sângele circulant al peștilor hrăniți cu furaj probiotic ce conține bacterii lactice, s-a redus ușor în variantele V2 și V4 ($1,34 \times 10^6/\mu\text{l}$ și $1,41 \times 10^6/\mu\text{l}$) față de varianta martor ($1,75 \times 10^6/\mu\text{l}$), valoarea acestora s-a menținut în limitele normale ($1,10-2,20 \times 10^6/\mu\text{l}$) ale speciei *Cyprinus carpio*.
- *Volumul eritocitar mediu (VEM)* s-a menținut în intervalul de normalitate ($152-364 \mu\text{m}^3$) pentru specia luată în studiu, remarcându-se o creștere de până la $252,52 \mu\text{m}^3$ în variantele V2, urmată de $197 \mu\text{m}^3$ în varianta V4, față de $192,92 \mu\text{m}^3$ care s-a înregistrat în varianta martor.
- *Hemoglobina eritocitară medie (HEM)* a înregistrat modificări cu diferențe între varianta martor și variantele cu concentrații diferite de probiotic, valorile calculate fiind sub limita inferioară de normalitate (50-63 pg) în varianta martor (38,88 pg), iar în cazul variantelor cu concentrații diferite de probiotic media a fost de 56,62 pg în varianta V4 și 59,50 pg în varianta V2, aceste valori încadrându-se în intervalul de

normalitate.

- *Concentrația de hemoglobină eritrocitară medie (CHEM)* a înregistrat o creștere în variantele cu concentrații diferite de probiotic față de varianta martor astfel, în varianta V4 media a fost de 28,90 g/dl depășind limita superioară a intervalului de normalitate (15-25 g/dl), față de valoarea medie înregistrată în varianta martor care a fost de 20,48 g/dl.

Rezultatele examenului hematologic în cazul puietului de crap, indică o creștere a cantității de hemoglobină și implicit, a constantelor eritrocitare derivate în variantele cu concentrații diferite de probiotic față de varianta martor. Aceasta creștere a hemoglobinei este corelată cu o nutriție corectă și echilibrată în care s-a adăugat concentrații diferite de probiotic și care prezintă o influență pozitivă asupra acestui indicator hematologic, valorile înregistrate încadrându-se în intervalul de normalitate pentru specia de cultură studiată.

Evaluarea reacțiilor leucocitare ale puietului de crap sub influența bacteriilor lactice din genul *Lactobacillus*.

Pentru a stabili efectul bacteriilor lactice din probioticul utilizat în furajul administrat asupra profilului hematologic, s-a acordat o atenție deosebită studiului tabloului leucocitar al exemplarelor de puiet de crap din cele trei variante experimentale cu diferite concentrații de probiotic, comparativ cu varianta martor.

În tabelul următor este prezentată media numărului absolut leucocitar al sângelui puietului de crap la finalul perioadei experimentale după înglobarea probioticului în furaj.

Tabelul 4.4. Media numărului absolut leucocitar al sângelui puietului de crap la finalul experimentului.

Varianta experimentală	Număr absolut (%)					
	limfocite		monocite	granulocite		
	mici	mari		neutrofile	eozinofile	bazofile
V1	91.1	4.6	0.1	3.7	0.4	0
V2	93.1	1.3	0.2	5.0	0.4	0
V3	88.4	1.4	0.6	5.8	3.8	0
V4	91.9	1.1	0.6	5.9	0.5	0

Leucograma exemplarelor de puiet de crap din cele patru variante experimentale analizate evidențiază predominarea limfocitelor, urmată de neutrofile, euzinofile și monocite.

În ceea ce privește seria *eritrocitară*, s-a constatat apariția eritrocitelor tinere în sânge, considerată a fi o consecință a stimulării eritropoezei datorită fenomenului de hipoxie, care s-a instalat în urma diminuării concentrației de oxigen dizolvat din apa tehnologică (Docan, A., și col., 2009).

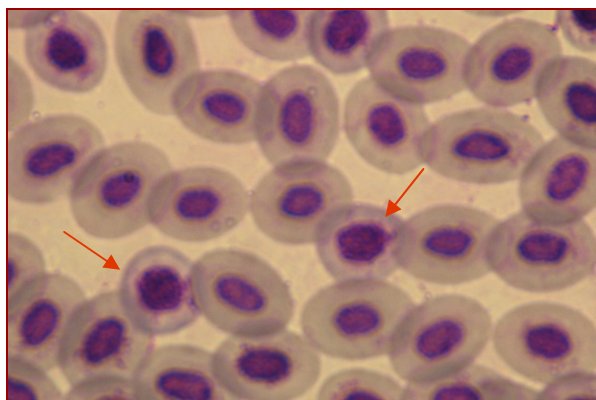


Foto 4.1. Eritrocite tinere (10 oc x 100 ob, MGG – foto original).

Limfocitele sunt leucocite implicate în apărarea umorală și celulară. La peștii teleosteeni, limfocitele sunt produse în principal de timus (organ limfoid imunogen primar) dar și de rinichi și splină (organe limfoide secundare) (Patriche, T., 2008).

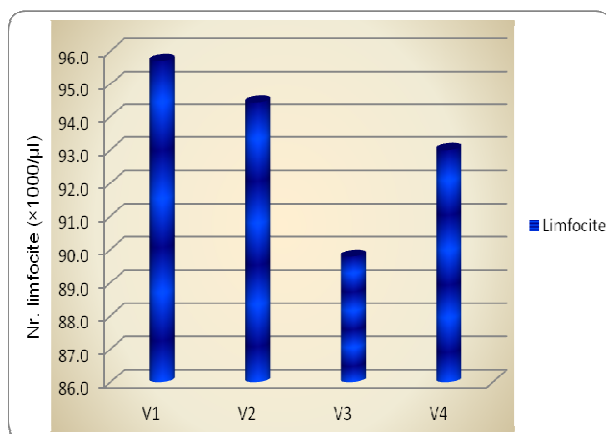


Figura 4.21. Media numărului absolut de limfocite.

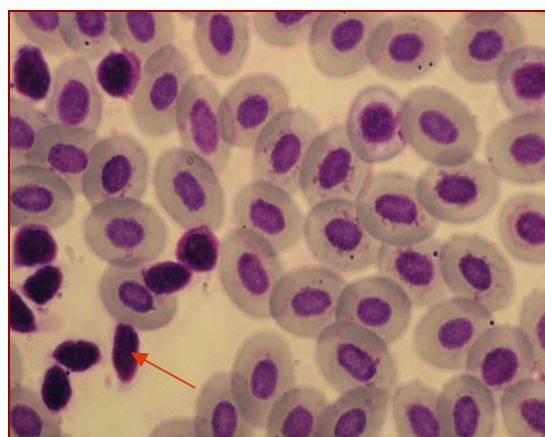


Foto 4.2. Limfocite (10 oc x 100 ob, MGG – foto original).

În formula leucocitară, limfocitele au înregistrat o reducere în variantele cu concentrații diferite de probiotic de până la $89,8 \times 10^3$ cel./ μl în varianta V3, comparativ cu varianta martor V1 ($95,7 \times 10^3$ cel./ μl).

Studiul frotiurilor de sânge arată că, raportat la totalul leucocitelor granulocite, neutrofilele ocupă primul loc. Din analiza rezultatelor obținute în urma numărării neutrofilelor pe frotiurile de sânge, se remarcă o reacție *neutrofilemică* în cazul variantelor cu diferite concentrații de probiotic.

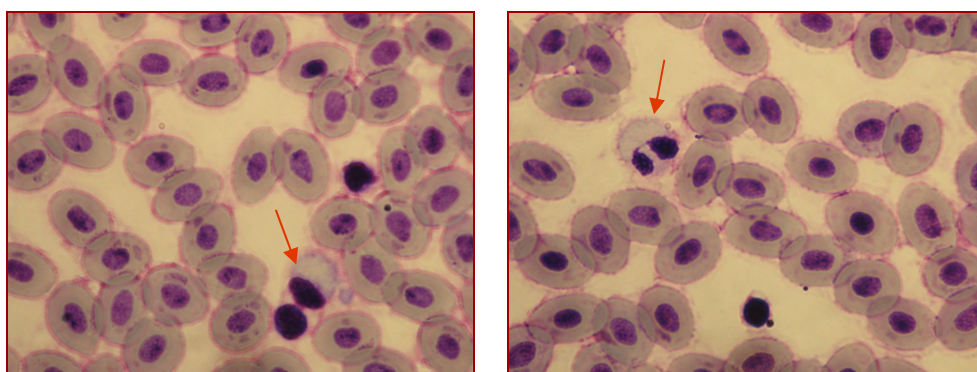


Foto 4.3. Granulocite neutrofile și neutrofil segmentat (10 oc x 100 ob, MGG – foto original).

În ceea ce privește studiul realizat, în care s-a urmărit influența bacteriilor lactice înglobate în furaj care a contribuit la îmbunătățirea calității furajelor administrate și implicit, la asigurarea sănătății metabolice a puietului de crap. Rezultatele obținute privind modificările tabloului sanguin al puietului de crap în condițiile experimentale date confirmă că o nutriție echilibrată și adecvată fiecărei specii se corelează cu valori normale ale principalilor indici hematologici (Misăilă, E.R., 1998).

Analiza biochimică a sângelui

Glicemia are un rol important în evaluarea stării de stres. În sângele peștilor concentrația glucozei este în mod normal de 40-90 mg/dl. Menținerea glicemiei între anumite limite normale este unul din mecanismele cu cel mai fin reglaj homeostatic, la care participa ficatul, unele tesuturi extrahepatice și o serie de glande endocrine (Patriche, T., et al. 2011).

Rezultatele obținute în urma determinării glicemiei sunt prezentate în figura 4.24. pentru cele patru variante experimentale.

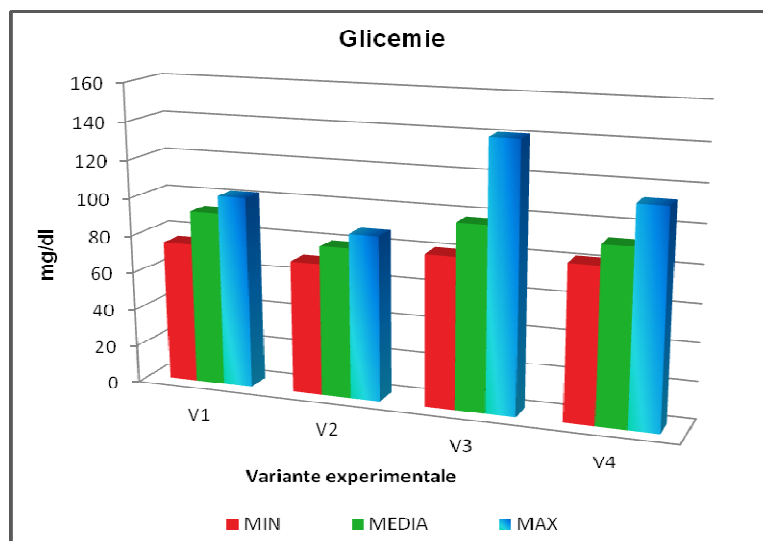


Figura 4.24. Valorile glicemiei înregistrate la finalul experimentului.

La puietul de crap crescut în sistemul recirculant pe o perioadă de 30 de zile în condițiile utilizării concentrațiilor diferite de probiotic în compoziția căruia predomină bacterii din genul *Lactobacillus* înglobate în rația furajeră, s-au înregistrat valori apropiate în ce privește media glicemiei serice determinate, însă valorile din varianta V3 fiind peste limita superioară a normalității (97,51 mg/dl), dar valorile înregistrate în variantă V2 (79,75 mg/dl) s-au încadrat în limitele normale (40-90 mg/dl) date de literatură de specialitate pentru această specie.

IV.3.1.4. Analiza biochimică a cărnii de pește

Obiectivul principal al acestei analize a fost de a investiga efectele utilizării concentrațiilor diferite de probiotic cu bacterii lactice asupra compoziției biochimice a țesutului muscular de puiet de crap. Rezultatele obținute la determinarea compoziției biochimice a țesutului muscular de puiet de crap, crescut în sistemul recirculant pilot sunt prezentate în figura 4.25.

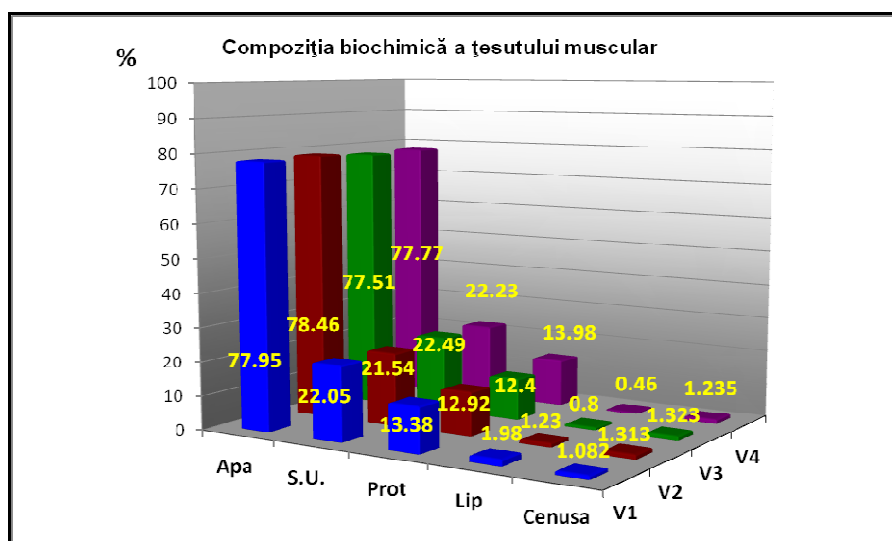


Figura 4.25. Compoziția biochimică a țesutului muscular în cele 4 variante experimentale.

Comparând rezultatele obținute în urma analizei se poate aprecia că, exemplarele din varianta martor prezintă o compoziție biochimică asemănătoare cu cea a variantelor experimentale în care s-a administrat concentrații diferite de probiotic în compoziția căruia intră bacterii lactice din genul *Lactobacillus* rezultând că, acest bioaditiv alimentar nu a influențat compoziția biochimică a țesutului muscular al cărnii puietului de crap.

IV.4. Concluzii

În urma experimentului, în care s-a realizat evaluarea efectului *Lactobact Premium* utilizat ca probiotic, se pot desprinde o serie de concluzii cu privire la influența bacteriilor lactice din genul *Lactobacillus* asupra profilului hematologic al puietului de crap (*Cyprinus carpio*, *Linnaeus 1758*), astfel:

- ☑ Evoluția parametrilor fizico-chimici ai apei, pe durata experimentului se încadrează în limitele optime din punct de vedere tehnologic, fapt ce confirmă influența pozitivă a probioticului utilizat.
- ☑ Analiza indicatorilor tehnologici de creștere a puietului de crap în sistemul recirculant, evidențiază o performanță tehnologică mai mare în varianta martor, față de cele trei variante cu concentrații diferite de probiotic, înregistrându-se diferențe semnificative între variantele experimentale.
- ☑ Toate rezultatele obținute privind supraviețuirea, creșterea și conversia la hrănire exprimă că, în varianta martor rezultatele au fost mai bune decât în variantele experimentale cu diferite concentrații de probiotic înglobate în furaj și ca urmare, utilizarea acestui probiotic nu este fezabilă pentru creșterea puietului de crap în sistem recirculant.
- ☑ Rezultatele obținute au indicat un efect pozitiv reprezentat prin creșterea concentrației de hemoglobină precum și, a constantelor eritrocitare derivate din aceasta, hematocritul și numărul de eritrocite încadrandu-se în intervalul de normalitate specific speciei de cultură. Reacția leucocitară a fost mai accentuată în variantele experimentale cu concentrații diferite de probiotic, decât în varianta martor. Aceste aspecte pot fi atribuite faptului că, probioticul utilizat a condus la creșterea valorilor indicatorilor hematologici, ca urmare a stimulării hematopoezei, fapt care totuși nu este de dorit având în vedere faptul că starea de sănătate a materialului biologic testat (*Cyprinus carpio*, *Linnaeus 1578*) a fost bună.
- ☑ Studiile hematologice realizate au oferit informații valoroase asupra stării de sănătate a peștilor în hrănirea cărora s-au folosit furaje cu probiotic în compoziția căruia intră bacteriile lactice, fiind un reper important și sub aspect economic deoarece s-a stabilit clar faptul că folosirea tipului discutat este inefficientă.

Concluzia finală privind rezultatul acestor cercetări semnalează faptul că bacteriile lactice din genurile *Lactobacillus* și *Bifidobacterium* utilizate sunt capabile să îmbunătățească starea de sănătate a puietului de crap redată prin analiza profilului hematologic dar nu sunt recomandate ca probiotice.

Capitolul V. CERCETĂRI PRIVIND INFLUENȚA PRINCIPALILOR FACTORI TEHNOLOGICI ÎN CONDIȚIILE UTILIZĂRII PROBIOTICELOR DIN SISTEMUL RECIRCULANT PENTRU CREȘTEREA CRAPULUI (*Cyprinus carpio*, Linnaeus 1758)

V.1. Introducere

Sistemele recirculante de producție acvatică, constituie o alternativă importantă la acvacultura tradițională, practică în heleșteu. Ca urmare a tratării apei și reutilizării acesteia, sistemele recirculante necesită o cantitate mult mai mică de apă decât un heleșteu pentru a realiza o producție similară. Temperatura optimă cerută pentru creștere și alte activități fiziologice variază în mare măsură în funcție de specie. Fiecare specie are o temperatură optimă pentru creștere care este determinată de temperatura optimă pentru activitatea specifică a cineticii de reacție fiziologică.

V.2. Material și metode

Cercetările din prezentul capitol se încadrează în categoria investigațiilor de tip experimental, desfășurate în cadrul sistemului recirculant intensiv pilot al Departamentului de Acvacultură, Știința Mediului și Cadastru, Universitatea "Dunărea de Jos" Galați și al Institutului de Cercetare-Dezvoltare pentru Ecologie Acvatică, Pescuit și Acvacultură, Galați.

V.2.1. Materialul biologic și baza experimentală

Materialul biologic a fost reprezentat de specia de cultură *Cyprinus carpio*, Linnaeus 1758 (crapul) în vârstă de 18 luni, provenit din sistemul recirculant pilot al bazei de cercetare Brateș, I.C.D.E.A.P.A. Galați. Materialul biologic, reprezentat de un lot de 320 exemplare de crap cu greutatea individuală medie de 182 g/ex., a fost selectat prin realizarea măsurătorilor biometrice în vederea obținerii unui lot omogen cu o distribuție normală.

Caracteristicile probioticului utilizat în vederea testării.

În vederea îndeplinirii obiectivului propus cu privire la cercetările demarate în cadrul acestui capitol, s-a utilizat un probiotic care au fost înglobat în furajul administrat în diferite concentrații, probioticul utilizat - *BioPlus® 2B* fiind reprezentat de un amestec format din *Bacillus licheniformis* (DSM 5749) și *Bacillus subtilis* (DSM 5750) în proporție de 1:1.

Experimentul a fost organizat în două etape pe parcursul cărora s-a urmărit testarea probioticului înglobat în furajul granulat în diferite concentrații și influența temperaturii mediului de creștere după cum urmează:

Etapa I s-a desfășurat pe o perioadă de 30 de zile la temperaturi ale mediului de creștere de 18 -19 °C, cu următoarele variante experimentale:

- V1 (B1) – probă martor, în furaj nu s-a înglobat probiotic;
- V2 (B2) – concentrație probiotic de $2,24 \times 10^9$ CFU/kg furaj;
- V3 (B3) – concentrație probiotic de $3,84 \times 10^9$ CFU/kg furaj;
- V4 (B4) – concentrație probiotic de $7,04 \times 10^9$ CFU/kg furaj.

Etapa a II-a s-a desfășurat tot pe o perioadă de 30 de zile cu aceleași variante experimentale, având ca obiectiv actualizarea rației alimentare în funcție de sporul de creștere al biomasei din prima etapă și corelarea acesteia cu temperatura mediului de creștere de 14-15 °C și totodată, actualizarea concentrațiilor de probiotic înglobate în furajul administrat.

Baza experimentală

Experimentul a urmărit evaluarea efectului diferitelor concentrații de probiotic și influenței temperaturii asupra fiziologiei și performanței de creștere a crapului crescut în sistem recirculant de acvacultură industrială. Acest experiment s-a desfășurat pe parcursul a 2 etape experimentale delimitate în timp prin cântărirea periodică, care a avut drept scop monitorizarea performanței tehnologice și ajustarea cantității de furaje distribuite, pe măsura acumulării biomasei de cultură și modificării temperaturii mediului de creștere.

Principial, sistemul recirculant pilot în care a fost organizat experimentul este alcatuit din 4 unități de creștere cu capacitatea de 1 m³ fiecare respectiv, un compartiment de condiționare a calității apei (fig.5.1.).

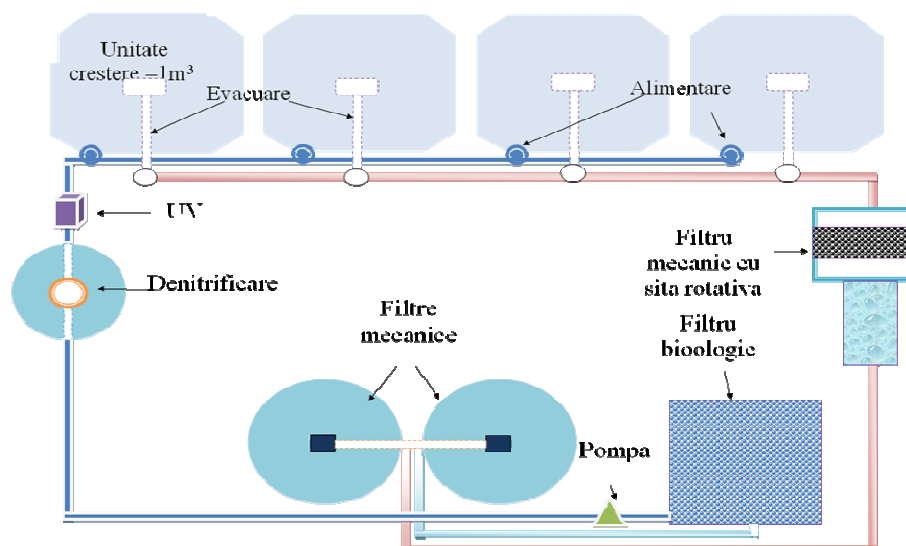


Figura 5.1. Configurația sistemului recirculant pilot.

În scopul testării diferitelor concentrații de probiotic utilizate, unitățile de creștere ale sistemului recirculant au fost populate randomizat cu un număr egal de exemplare, astfel încât să existe posibilitatea experimentării a 3 concentrații diferite de probiotic înglobate în furaj și un martor.

V.2.2. Metode de determinare a parametrilor de calitate ai apei

Pe parcursul desfășurării celor două etape experimentale din cadrul acestei cercetări, o atenție deosebită s-a acordat monitorizării zilnice a parametrilor de calitate a apei, precum și menținerea lor în limite optime din punct de vedere fiziologic pentru specie de cultură luată în studiu. Pentru fiecare din parametrii de calitate a apei s-au folosit metode de determinare și echipamente specifice a căror interval de măsurare este prezentat în tabelul 5.2.

Tabelul 5.2. *Echipamentele și metodele de determinare a parametrilor de calitate a apei.*

Indicatorii/ Parametrii de calitate	Echipament folosit	Metoda de determinare	Interval de măsurare
Oxigen	Senzori tip WATT TriOxmatic 700IQ(SW)	Metoda de măsurare cu senzori	0,0-7,89 mg/l
pH	Senzori tip WAT Sensolyt 700 IQ (SW)	Metoda de măsurare cu senzori	6,5-8,1 unit. de ph
Temperatura	Senzori tip WATT TrioxiTherm	Metoda de măsurare cu senzori	19-26,2 °C
Azot amoniacal N-NH ₄	Spectroquant Nova 400	Metoda de determinare colorimetrică cu kit tip Merck 1.14752.	0,53-1,65 mg/l
Nitriți (azotiti) NO ₂	Spectroquant Nova 400	Metoda de determinare colorimetrică cu kit tip Merck 1.14776	0.02-1,04 mg/l
Nitrați (azotati) NO ₃	Spectroquant Nova 400	Metoda de determinare colorimetrică cu kit tip Merck 1.14942	4,5-26 mg/l
Cl ⁻	Spectroquant Nova 400	Metoda de determinare colorimetrică cu kit tip Merck 1.14897	29,4-31,7 mg/l

V.2.5. Metode de investigații microbiologice

Prelevarea și analiza probelor microbiologice este prezentată în subcapitolul III.2.5.

La debutul experimentului precum și, la finalul fiecărei etape experimentale, câte 3 exemplare de crap din fiecare variantă experimentală au fost supuse analizei microbiologice.

De asemenea, au fost efectuate analize microbiologice din furajul înglobat cu probiotic în vederea verificării existenței celor două specii de bacterii din genul *Bacillus* înglobate în furajul administrat precum și, analiza microbiologică a apei de cultură în vederea stabilirii numărului total de germeni (NTG).

Prelevarea probelor de intestin s-a realizat conform protocolului prezentat în capitolul III (vezi III.2.5.) și se poate observa în foto 5.3.



Foto 5.3. Prelevarea probelor microbiologice (foto original).

V.3. Rezultate și discuții

Rezultatele prezentate în acest capitol reflectă o perioadă experimentală de 60 de zile. Acest experiment a urmărit evaluarea influenței unor factori tehnologici cum ar fi, temperatura asupra fiziologiei și performanței de creștere a crapului crescut în condițiile utilizării probioticelor într-un sistem recirculant de acvacultură industrială.

V.3.1. Evaluarea dinamicii parametrilor de calitate a apei din sistemul recirculant

Temperatura. Pe parcursul experimentului, regimul termic al mediului de cultură nu s-a încadrat în ecartul optim, înregistrându-se valori scăzute mai ales, în a doua etapă experimentală sub aspectul cerinței fiziologice a speciei (figura 5.6.).

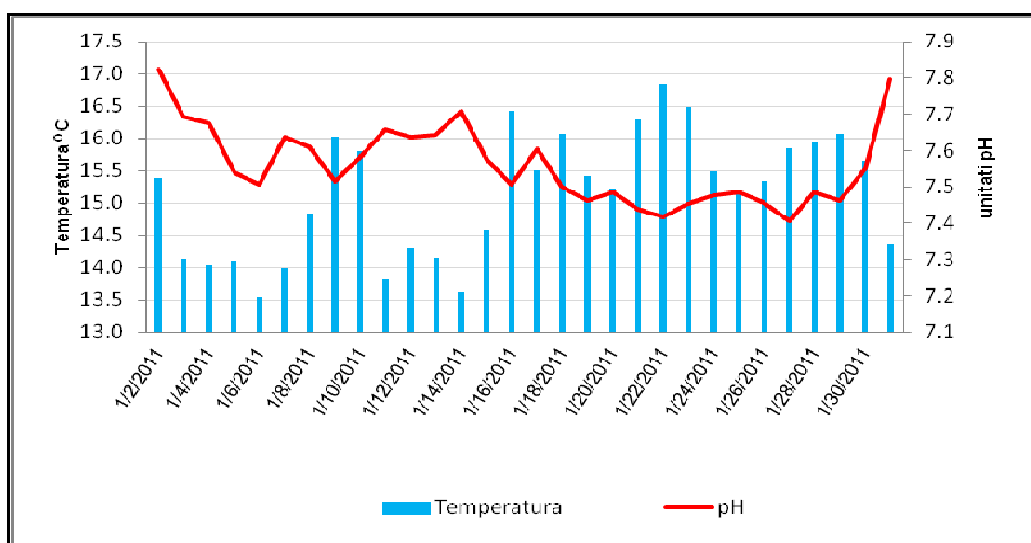


Figura 5.6. Variația temperaturii și pH-ului.

Oxigenul dizolvat (DO). Concentrația oxigenului dizolvat a oscilat între valorile admisibile și optime speciei luate în studiu (figura 5.7.).

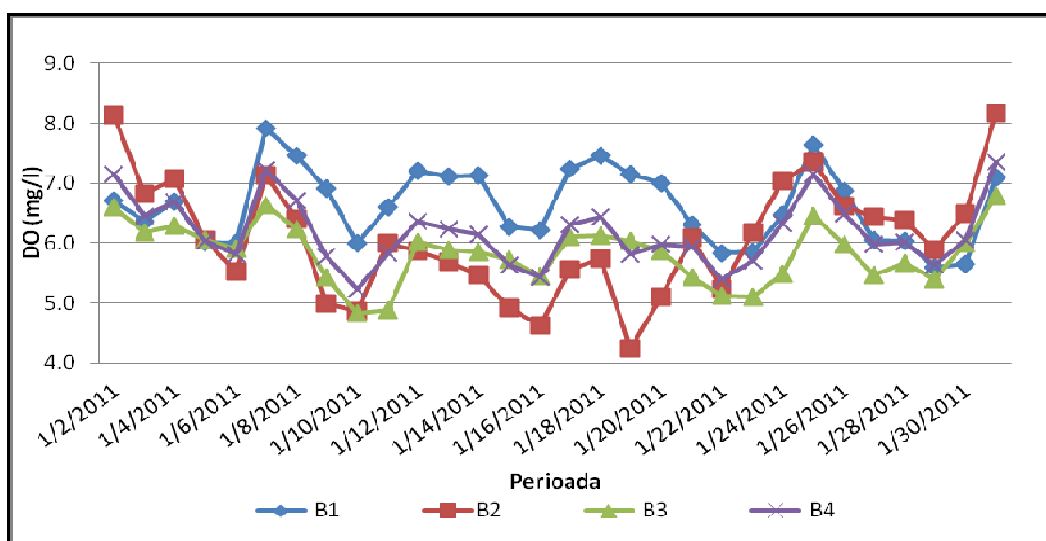


Figura 5.7. Dinamica oxigenului dizolvat.

Parametrii de calitate ai apei au fost menținuți în limite admisibile pentru creșterea puietului de crap pe toată perioada experimentală; când acești parametri nu s-au încadrat în ecartul optim s-a procedat la preminirea intensă a apei constând în înlocuirea zilnică a circa 10-20 % din volumul total al sistemului.

V.3.2. Evaluarea microbiotei speciei *Cyprinus carpio*, Linnaeus 1758, în condițiile creșterii intensive într-un sistem recirculant

Scopul acestui experiment a fost și acela de a testa efectul probioticului utilizat în concentrații diferite și, a evalua atât încărcătura microbiană din intestin, cât și încărcătura organică a apei la temperaturi scăzute din unitățile de creștere ale sistemului recirculant de acvacultură industrială.

Numărarea coloniilor de bacterii a fost efectuată în scopul determinării densității microbiene specifice microbiotei precum și, a apei din unitățile de creștere, în vederea comparării variantelor experimentale cu concentrații diferite de probiotic față de varianta martor.

Variația numărului total de germeni (NTG) pe perioada desfășurării experimentului de creștere a evidențiat faptul că nivelul total de germeni încadrează apa tehnologică a sistemului în categoria apelor cu încărcare microbiană redusă. Datorită performanțelor tehnice ale sistemului de creștere (filtru cu pat de cărbune, sterilizator cu (UV) numărului total de germeni (NTG) din unitățile de creștere scade, încadrându-se în ecartul specific apelor cu un grad de impurificare microbiologică „mediocru” spre „slab”.

V.3.3. Evaluarea efectului temperaturii asupra fiziologiei și performanței tehnologice a crapului (*Cyprinus carpio*, Linnaeus 1758) din sistemul recirculant în condițiile utilizării probioticelor

În ceea ce privește, evaluarea efectului principalilor factori tehnologici asupra fiziologiei și performanței de creștere a crapului, un rol deosebit îl joacă stabilitatea probioticelor care este influențată de acești factori și care periclitează garantarea eficacității utilizării lor și abilitatea acestora de a induce organismului gazdă efecte benefice în formula producției finale (Fonseca et al., 2001).

V.3.3.1. Analiza indicatorilor biotehnologici

Pentru acest experiment, în prima etapă cele patru unități de creștere ale sistemul recirculant au fost populate cu un număr egal de exemplare și biomase sensibil egale, totalizând o biomasa totală de 116,24 kg. Greutatea inițială medie a exemplarelor de crap care au reprezentat materialul biologic în vederea populării unităților de creștere a fost în medie de 182 g/exemplar, iar densitatea de populare a fost de 29,06 kg/m³.

Tabelul 5.4. *Tablou sintetic cu principalii indicatori de performanță tehnologică privind creșterea crapului în prima etapă experimentală.*

Indicatorul	Varianta experimentală			
	B1 V1-martor	B2 V2	B3 V3	B4 V4
Concentrație probiotic (mg/rația zilnică)	0	196	336	616
Concentrație probiotic (CFU/kg furaj)	0	2,24×10 ⁹	3,84×10 ⁹	7,04×10 ⁹
Concentrație probiotic (CFU/zi)	0	0,67×10 ⁹	1,15×10 ⁹	2,11×10 ⁹
Numar pesti inițial	80	80	80	80
Număr pești final	80	80	80	80
Supraviețuirea (%)	100	100	100	100
Biomasa inițială (g)	14577	14484	14598	14463
Biomasa inițială (kg/m ³)	29,15	28,97	29,20	28,93
Biomasa finală (g)	19662	19828	20867	19837
Biomasa finală (kg/m ³)	39,32	39,66	41,73	39,67
Spor creștere biomasa (g)	5085	5344	6269	5374
Spor creștere biomasa (kg/m ³)	10,17	10,69	12,54	10,75
Masa medie inițială (g/ex)	182	181	182	181
Masa medie finală (g/ex)	246	248	261	248
Spor creștere individual (g)	64	67	78	67
Zile creștere	30	30	30	30
Proteina brută furaj (PB %)	30,0	30,0	30,0	30,0
Rația zilnică (% biomasa)	2,0	2,0	2,0	2,0
Cantitatea totală de furaje distribuite (g)	8400	8400	8400	8400
GR (Rata creșterii zilnice) (g/zi)	169,50	178,13	208,97	179,13
SGR (%/zi)	1,00	1,05	1,19	1,05
FCR (g furaj/g spor biomasa)	1,65	1,57	1,34	1,56
PER (raportul eficienței proteinelor) (g/g)	2,02	2,12	2,49	2,13
Cantitatea totală de probiotic utilizată (g)	0	5.88	10.08	18.48

Rezultatele obținute evidențiază o evoluție descendentă a variantelor cu concentrații diferite de probiotic față de varianta martor. Astfel, indicatorii performanței tehnologice au înregistrat valorile cele mai bune pentru varianta V3, în care s-a administrat o concentrație de $3,84 \times 10^9$ CFU/kg furaj înglobată în furajul granulat utilizat pentru rația alimentară zilnică.

Rezultatele obținute în cea de-a doua etapă experimentală, referitoare la dinamica ritmului de creștere a materialului biologic sunt redată sintetic în tabelul următor:

Tabelul 5.5. *Tablou sintetic cu principalii indicatori de performanță tehnologică privind creșterea crapului în a doua etapă experimentală.*

Indicatorul	Varianta experimentală			
	B1 V1-martor	B2 V2	B3 V3	B4 V4
Concentrație probiotic (mg/rația zilnică)	0	280	480	880
Concentrație probiotic (CFU/kg furaj)	0	$2,24 \times 10^9$	$3,84 \times 10^9$	$7,04 \times 10^9$
Concentrație probiotic (CFU/zi)	0	$0,67 \times 10^9$	$1,15 \times 10^9$	$2,11 \times 10^9$
Numar pesti inițial	73	80	77	80
Număr pești final	73	80	77	80
Supraviețuirea (%)	100	100	100	100
Biomasa inițială (g)	18270	19828	19935	19837
Biomasa inițială (kg/m ³)	36,54	39,66	39,87	39,67
Biomasa finală (g)	21034	23988	23892	24106
Biomasa finală (kg/m ³)	42,07	47,98	47,78	48,21
Spor creștere biomasa (g)	2764	4160	3957	4269
Spor creștere biomasa (kg/m ³)	5,53	8,32	7,91	8,54
Masa medie inițială (g/ex)	250	248	259	248
Masa medie finală (g/ex)	288	300	310	301
Spor creștere individual (g)	38	52	51	53
Zile creștere	30	30	30	30
Proteina brută furaj (PB %)	30,0	30,0	30,0	30,0
Rația zilnică (% biomasa)	1,2	1,2	1,2	1,2
Cantitatea totală de furaje distribuite (g)	6600	7200	7200	7200
GR (Rata creșterii zilnice) (g/zi)	92,13	138,67	131,90	142,30
SGR (%/zi)	0,47	0,63	0,60	0,65
FCR (g furaj/g spor biomasa)	2,39	1,73	1,82	1,69
PER (raportul eficienței proteinelor) (g/g)	1,40	1,93	1,83	1,98
Cantitatea totală de probiotic utilizată (g)	0	8.4	14.4	26.4

Din datele prezentate în tabelul 5.5. cu privire la eficiența reținerii proteice și factorul de conversie al hranei, cele mai bune rezultate s-a obținut în varianta V4 unde am înglobat concentrația cea mai mare de probiotic în furajul administrat, rezultând în acest caz că, concentrația optimă este de $7,04 \times 10^9$ CFU/kg furaj.

Așa cum se poate observa în figura 5.27., sporul de creștere înregistrat în cele două etape experimentale a înregistrat diferențe între variante martor și variantele cu concentrații diferite de probiotic, atât în prima cât și în a doua etapă experimentală.

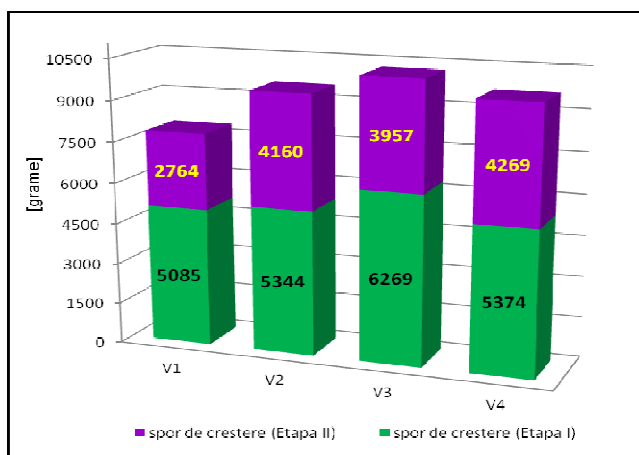


Figura 5.27. Sporul de creștere al biomasei în cele două etape experimentale.

Concluzionând, putem afirma că și în condițiile influenței unor factori tehnologici cum ar fi, temperatura se poate obține un spor de creștere al biomasei de cultură ridicat prin utilizarea probioticelor ca bioadivi alimentari, având rol benefic în stimularea apetitului de hranire și îmbunătățirea stării de sănătate a materialului biologic.

V.3.3.2. Analiza hematologica și biochimică a sângelui

Pentru a evidenția într-un mod cât mai fidel răspunsul fiziologic al acțiunii stresante a factorilor tehnologici (în special, temperatura) s-a analizat dinamica indicatorilor hematologici și constantelor eritrocitare la debutul și respectiv, finalul celor două etape experimentale.

Indicatorii luați în studiu au fost hemoglobina, hematocritul și numărul de eritrocite și constantele eritrocitare derivate VEM, HEM și CHEM, parametri semnificativi în caracterizarea stării fiziologice a peștilor.

Tabelul 5.7. Valorile înregistrate la debutul primei etape experimentale pentru hemoglobină, hematocrit și număr de eritrocite la crapul crescut în sistem recirculant.

Variante experimentale	Hb (g/dl)		Ht (%)		Nr. eritrocite (mil/μl)	
	min-max	X±SD	min-max	X±SD	min-max	X±SD
V1	4.20-6.40	4.96±0.79	27-28	27.4±0.49	1.02-1.45	1.27±0.18
V2	3.90-6.70	4.66±1.03	24-36	30±4.38	1.22-1.40	1.31±0.06
V3	3.90-4.70	4.22±0.28	23-30	25.8±2.48	0.72-1.40	1.02±0.22
V4	3.40-5.90	4.06±0.94	24-29	26.2±1.94	0.91-1.88	1.41±0.37

După cum se poate observa în figurile de mai sus, în această primă etapă supusă analizelor hematologice, hemoglobina prezintă o tendință de descreștere progresivă de la 4,96 g/dl (valoarea medie înregistrată în cazul variantei V1) până la 4,06 g/dl (valoarea medie rezultată pentru varianta V4). În cazul hematocritului au fost evidențiate valori cuprinse între 27,4 % în varianta martor și 30 % la nivelul variantei V2. În ceea ce privește numărul de eritrocite, acesta a avut o evoluție preponderent ascendentă în cele 4 variante

experimentale, valorile medii fiind cuprinse între 1,27 mil/μl (în varianta martor) și 1,41 mil/μl (valori înregistrat la nivelul variantei V4).

Tabelul 5.9. *Valorile înregistrate la finalul primei etape experimentale pentru hemoglobină, hematocrit și număr de eritrocite la crapul crescut în sistem recirculant.*

Variante experimentale	Hb (g/dl)		Ht (%)		Nr. eritrocite (mil/μl)	
	min-max	X±SD	min-max	X±SD	min-max	X±SD
V1	6.60-8.80	7.9±0.81	33-38	36±1.67	0.86-1.50	1.24±0.21
V2	8.60-12	10.14±1.44	30-39	34±3.16	1.19-1.45	1.34±0.10
V3	6.40-9.40	7.66±0.99	32-39	35.8±2.79	1.23-1.67	1.46±0.17
V4	6.20-10.40	8.58±1.36	29-39	34±3.22	1.28-1.44	1.37±0.06

Conform datelor evidențiate în tabelul de mai sus, la finalul primei etape de creștere a crapului în sistem recirculant, care coincide cu debutul celei de-a doua etape de creștere, analiza indicatorilor hematologici a fost următoarea:

- ✓ hemoglobina a avut cea mai scăzută valoare medie (7,66 g/dl) în variante V3, iar valoarea superioară a mediei (10,14 g/dl) a fost înregistrată în cadrul variantei V2;
- ✓ valorile hematocritului au fost cuprinse între 29,00 % și 39 % (înregistrând valori maxime aproximativ egale în cele 4 variante experimentale);
- ✓ numărul de eritrocite a înregistrat valoarea medie minimă (1,24 mil/μl) la nivelul variantei experimentale V1-martor, în vreme ce valoarea medie maximă (1,46 mil/μl) a fost constatată în variant V3.

Tabelul 5.11. *Valorile înregistrate la finalul celei de-a doua etapă experimentală pentru hemoglobină, hematocrit și număr de eritrocite la crapul crescut în sistem recirculant.*

Variante experimentală	Hb (g/dl)		Ht (%)		Nr. eritrocite (mil/μl)	
	min-max	X±SD	min-max	X±SD	min-max	X±SD
V1	6.90-8.80	7.92±0.82	26-36	31.2±3.31	0.89-1.52	1.37±0.24
V2	6.40-11	7.92±1.62	30-39	33.20±3.31	1.70-2.10	1.93±0.13
V3	6.00-8.90	7.24±1.00	29-41	33±4.56	1.14-1.84	1.46±0.27
V4	5.80-7.00	6.30±0.46	30-36	32.8±2.32	1.30-1.73	1.58±0.16

În această ultimă etapă sunt evidențiate următoarele: hemoglobina crește de la 6,30 g/dl (minimumul mediei înregistrat în varianta V4) până la 7,92 g/dl (valoarea medie maximă rezultată pentru varianta V2); hematocritul oscilează între 31,2 % (valoarea medie minimă fiind evidențiată la nivelul variantei martor) și 33,20 % (valoarea medie maximă fiind evidențiată la nivelul variantei V2); numărul de eritrocite fiind cuprins între 1,37 mil/μl (minimumul mediei înregistrat la nivelul variantei martor) și 1,93 mil/μl (maximumul mediei înregistrat la nivelul variantei V2).

Evaluarea reacțiilor leucocitare ale crapului sub influența factorilor tehnologici.

În ceea ce privește *formula leucocitară*, s-au analizat froțiurile realizate la popularea și recoltarea materialului biologic și respectiv, la jumătatea perioadei experimentale pentru a observa modificările survenite, în vederea evaluării influenței principalelor factori tehnologici.

Tabelul 5.13. *Media numărului absolut leucocitar al sângelui crapului la debutul perioadei experimentale.*

Varianta experimentală	Număr absolut (%)					
	limfocite		monocite	granulocite		
	mici	mari		neutrofile	eozinofile	bazofile
V1	84.1	7.5	3.8	4.5	0.1	0
V2	85.4	5.7	4.1	4.2	0.4	0.2
V3	86.2	8.1	2.5	3	0.2	0
V4	85.9	4.7	6.1	2.9	0.4	0

Tabelul 5.14. *Media numărului absolut leucocitar al sângelui crapului la finalul primei etape experimentale.*

Varianta experimentală	Număr absolut (%)					
	limfocite		Monocite	granulocite		
	mici	mari		neutrofile	eozinofile	bazofile
V1	73.3	12.1	9.2	4.7	0.4	0.3
V2	65.3	14.6	10.5	9.1	0.1	0.4
V3	67	7.7	12.7	12.2	0.1	0.3
V4	71.3	13	11.4	4.3	0	0

Tabelul 5.15. *Media numărului absolut leucocitar al sângelui crapului la finalul perioadei experimentale.*

Varianta experimentală	Număr absolut (%)					
	limfocite		Monocite	granulocite		
	mici	mari		neutrofile	eozinofile	bazofile
V1	85.9	8.6	2.8	2.5	0.2	0
V2	84.7	7.6	4.2	3.4	0.1	0
V3	87.5	4.8	2.9	4	0.8	0
V4	88.3	5.2	4.1	2.4	0	0

O primă analiză a valorilor medii a numărului absolut al leucocitelor precum și a diferitelor tipuri de leucocite evidențiază o reducere a limfocitelor după administrarea furajului în care s-a adăugat probiotic (*Bacillus licheniformis* (DSM 5749) și *Bacillus subtilis* (DSM 5750)) și o creștere a procentului monocitelor, urmată de creșterea procentului de neutrofile.

Se poate concluziona că probioticele pot fi utilizate pentru consolidarea sistemului imunitar și a stării de sănătate, îmbunătățind astfel rezistența materialului biologic la boli, îmbunătățind totodată și performanța creșterii.

Analiza biochimică a sângelui

Colectarea probelor de sânge pentru analiza biochimică s-a efectuat în trei etape importante: la populare, intermediar (la sfârșitul primei etape experimentale care coincide cu inițialul celei de-a doua) și la recoltare. Pentru această analiză a sângelui s-a recoltat un număr total de 60 probe de sânge (20 de probe de sânge pentru fiecare etapă) de la peștii care au făcut obiectul creșterii în condițiile utilizării probioticelor de diferite concentrații în sistem recirculant. Rezultatele obținute, în urma determinării parametrilor biochimici serici sunt prezentate în tabele 5.16., 5.17. și 5.18.

Tabelul 5.16. *Valorile înregistrate la debutul primei etape experimentale pentru parametrii serici biochimici.*

Varianta experimentală	Glucoza mg/dl		Proteine totale g/dl		Imunoglobuline mg/dl	
	min-max	X±SD	min-max	X±SD	min-max	X±SD
V1	68-170	101,8±42,00	4,3-5,0	4,64±0,26	35,84-42,68	38,7±2,64
V2	82-132	104,6±18,10	3,9-4,3	4,12±0,14	38,04-42,57	40,00±2,05
V3	64-196	102,2±53,65	4,1-4,9	4,4±0,3	38,24-44,41	40,14±2,44
V4	87-143	116,2±20,31	3,9-4,6	4,26±0,27	36,94-41,18	39,13±1,72

Tabelul 5.17. *Valorile înregistrate la finalul primei etape experimentale (începutul etapei a doua) pentru parametrii serici biochimici.*

Varianta experimentală	Glucoza mg/dl		Proteine totale g/dl		Imunoglobuline mg/dl	
	min-max	X±SD	min-max	X±SD	min-max	X±SD
V1	31-118	71±33,06	4,7-5,1	4,9±0,18	36,43-39,8	38,83±1,38
V2	75-119	95,8±19,26	4,2-4,6	4,4±0,15	35,96-43,97	40,74±3,57
V3	82-187	118±44,34	3,9-5,1	4,48±0,54	36,09-50,29	40,6±5,93
V4	102-128	115,8±11,88	3,9-4,3	4,08±0,14	35,05-39,2	37,27±1,67

Tabelul 5.18. *Valorile înregistrate la finalul etapei a doua experimentale pentru glicemie și proteinele serice totale la crapul crescut în sistem recirculant.*

Varianta experimentală	Glucoza mg/dl		Proteine totale g/dl	
	min-max	X±SD	min-max	X±SD
V1	69-82	76,8±5,54	3,7-4,5	4,2±0,30
V2	74-131	99±24,01	3,5-4,4	4,02±0,32
V3	85-111	98,4±10,06	3,7-4,1	3,9±0,18
V4	87-141	118,8±19,79	3,6-4,7	4,04±0,45

Factorii cum fi: vârsta, sexul, condițiile de mediu și regimul alimentar prezintă o influență semnificativă asupra valorilor parametrilor biochimici serici (Patriche, T., et al 2011).

V.3.3.3. Analiza biochimică a cărnii de pește

Obiectivul principal al acestei analize a fost de a investiga efectele utilizării diferitelor concentrații de probiotic și influența temperaturii scăzute asupra compoziției biochimice a țesutului muscular de crap.

Analizele biochimice ale compoziției corporale (pentru fiecare variantă, considerate pentru greutatea medie a exemplarelor) au fost efectuate la sfârșitul fiecărei etape experimentale. Compoziția biochimică a țesutului muscular în prima etapă experimentală este prezentată în figura următoare:

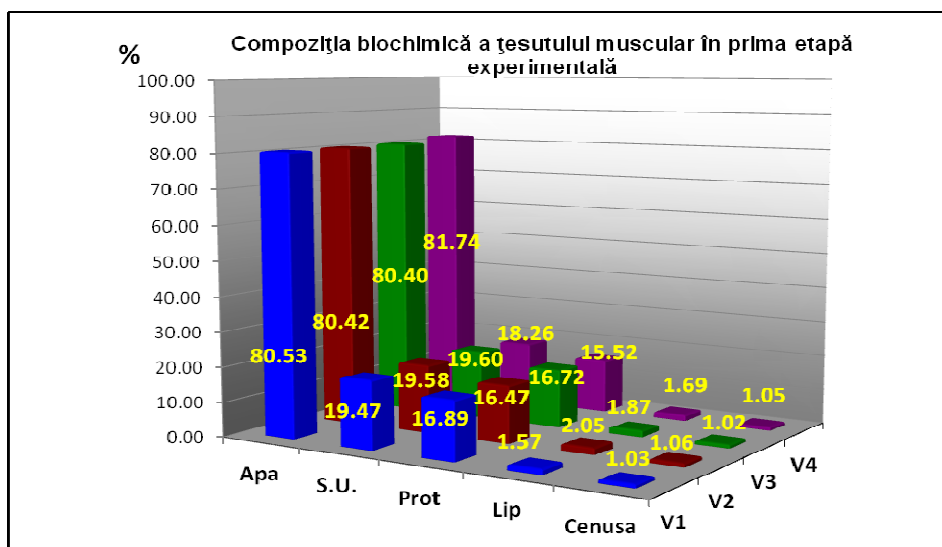


Figura 5.59. Compoziția biochimică a țesutului muscular în prima etapă experimentală.

Compoziția biochimică a țesutului muscular din a doua etapă experimentală este prezentată în figura următoare:

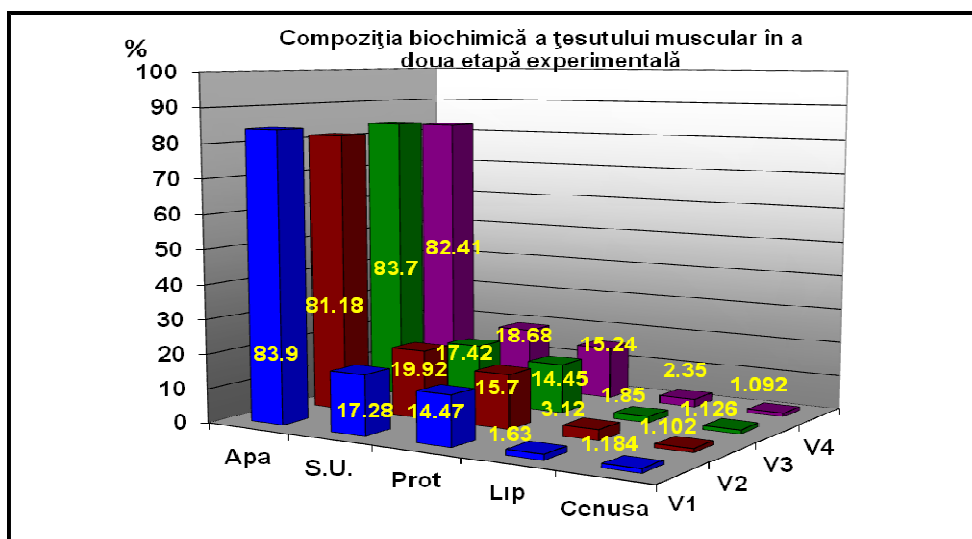


Figura 5.60. Compoziția biochimică a țesutului muscular în a doua etapă experimentală.

În concluzie, compoziția biochimică a cărnii de crap crescut în sistemul recirculant, în condițiile influenței factorilor tehnologici prezintă valori mai reduse la finalul perioadei experimentale, tocmai datorită scăderii temperaturii mediului de creștere și neasimilării corespunzătoare a principalilor nutrienți ai furajului. În cadrul variantelor experimentale, nu au fost înregistrate diferențe semnificative între varianta martor și variantele cu concentrații diferite de probiotic, ceea ce relevă faptul că acestea din urmă, nu prezintă o influență asupra compoziției biochimice a cărnii de crap.

V.4. Concluzii

Concluziile desprinse după interpretarea rezultatelor ce au vizat atât influența factorilor de mediu – temperatura, pH-ul, etc. cât și influența concentrațiilor diferite de probiotic asupra performanței de creștere și fiziologiei organismului, se referă la:

- ☑ Analiza tabloului privind **indicatorii de calitate a apei** evidențiază faptul că utilizarea unui furaj în care s-a înglobat probiotic la diferite concentrații nu a influențat în mod negativ calitatea apei tehnologice, parametrii fizico-chimici monitorizați nu au înregistrat diferențe semnificative în toate punctele de prelevare a probelor.
- ☑ Evaluarea nivelului optim de hrănire este cu atât mai strictă în cazul sistemelor recirculante de producție, cunoscut fiind faptul că furajele neutilizate (neconsumate și nedigerate) reprezintă principala sursă de poluare a apei de cultură. Din analiza datelor privind **evaluarea numărului total de germeni (NTG)** pe perioada desfășurării experimentului de creștere s-a evidențiat faptul că, nivelul total de germeni încadrează apa din unitățile de creștere ale sistemului recirculant în categoria apelor cu încărcare microbiană redusă.
- ☑ O analiză critică a rezultatelor obținute pe durata experimentului reliefează o strânsă corelație între **rata creșterii, eficiența economică și utilizarea probioticelor înglobate în hrană**, în sensul aprecierii performanței tehnologice odată cu amplificarea concentrației de probiotic administrată biomasei de cultură în condițiile influenței factorilor de mediu. Totuși, s-au constatat diferențe în ceea ce privește eficiența conversiei hranei și utilizării proteinelor, acestea însă fiind de neglijat în alegerea unei variante tehnologice optime ce vizează o utilizare eficientă a probioticului în hrana crapului de cultură.
- ☑ Din analiza datelor privind **indicatorii hematologici și biochimici** care indică modificările survenite, în condițiile influenței principalilor factori tehnologici asupra evaluării stării fiziologice a crapului crescut în sistemul recirculant, rezultă faptul că probioticele pot fi utilizate pentru consolidarea sistemului imunitar și a stării de

sănătate, îmbunătățind astfel rezistența materialului biologic la boli și performanța de creștere.

Din cele expuse anterior se poate concluziona că și în condițiile influenței unor factori tehnologici cum ar fi, temperature, pH-ul etc. se poate obține un spor de creștere al biomasei de cultură ridicat prin utilizarea probioticelor ca bioadivi alimentari, având rol benefic în stimularea apetitului de hrănire și bunăstării materialului biologic.

Capitolul VI. EVALUAREA BIOECONOMICĂ A UNUI SISTEM RECIRCULANT DE ACVACULTURĂ INDUSTRIALĂ A CRAPULUI ÎN CONDIȚIILE UTILIZĂRII PROBIOTICELOR

VI.1. Proiecția financiară a unei unități de creștere a crapului în sistem recirculant

În cadrul acestui capitol obiectivul propus este reprezentat de evaluarea bioeconomică a unui sistem recirculant comercial pentru creșterea intensivă a crapului (*Cyprinus carpio*, *Linnaeus 1578*) în condițiile utilizării probioticelor. Datorită faptului că furajele reprezintă în mod frecvent componenta unică și cea mai mare a costului de producție care conduce la majorarea acestuia în formula producției finale. O hrănire atentă și în mod corespunzător va asigura o mai bună rată de conversie a hranei și va avea ca rezultat obținerea mai multor kilograme de pește produs pe kg de furaj utilizat. Astfel, s-a analizat măsura în care utilizarea bioaditivilor alimentari (probioticelor) înglobați în furaj prezintă un avantaj în sensul maximizării producției și minimizării costurilor.

VI.1.1. Analiza rentabilității unității de producție

Analiza rentabilității unităților de producție, permite dezvoltarea și evaluarea sistemelor de producție din acvacultură precum și a tehnicilor de conducere la nivel operațional și strategic. Se poate astfel determina rentabilitatea potențială a unei ferme piscicole pentru diferite niveluri investiționale corespunzătoare unor indicatori de performanță diferiți prin analizarea modului în care modificările survenite influențează rentabilitatea, permițând determinarea nivelului optim al producției în condițiile minimizării costului.

În cazul unei noi investiții în domeniul acvaculturii sau în cadrul unei activități deja existente, se realizează analiza indicatorilor de rentabilitate economică pentru o dimensiune specifică unei unități de producție și pentru o specie particulară analizată. Astfel, în cazul de față sunt redați indicatorii economici corespunzători unui ciclu de producție în tabelul următor:

Tabelul 6.7. Indicatorii economici corespunzători unui ciclu de producție.

Indicatorii economici	U.M.	Valoare
VALOAREA TOTALA A INVESTIȚIEI, cu fondurile UE incluse	(€)	600.000
VALOAREA TOTALA A INVESTIȚIEI, fără fondurile UE incluse	(€)	240.000
SUPRAFAȚA TOTALĂ	(m ²)	1250
INVESTIȚIA SPECIFICĂ, cu fondurile UE incluse	(€/m ²)	480
INVESTIȚIA SPECIFICĂ, fără fondurile UE incluse	(€/m ²)	192
INVESTIȚIA SPECIFICĂ, cu fondurile UE incluse	(€/ Kg)	17
INVESTIȚIA SPECIFICĂ, fără fondurile UE incluse	(€/ Kg)	6,8
VALOAREA PRODUCȚIEI	(€)	133.000
COSTUL PRODUCȚIEI	(€)	120.298
CAPACITATEA DE PRODUCȚIE	(t/an)	35
FONDURI NERAMBURSABILE UE	(€)	360.000
PROFIT BRUT	(€)	12.702
RENTABILITATE		0,105
AMORTIZARE	(€/an)	6.000
PRODUCTIVITATEA MUNCII pentru angajații cu normă întreagă	(kg/angajat)	6.000
PRODUCTIVITATEA MUNCII pentru angajații cu jumătate de normă	(kg/angajat)	3.000
PRODUCTIVITATEA MUNCII pentru angajații cu norma întreagă	(€/angajat)	27.600
PRODUCTIVITATEA MUNCII pentru angajații cu jumătate de normă	(€/angajat)	13.800
DURATA UNUI CICLU DE PRODUCȚIE	(zile)	365
RATA PROFITULUI	(%)	9,55
RECUPERAREA INVESTIȚIEI, cu fondurile UE	(ani)	47
RECUPERAREA INVESTIȚIEI, fără fondurile UE	(ani)	19
RENTABILITATEA VALORICĂ	(€)	40.279
PREȚ VÂNZARE/KG	(€/kg)	3,8
COST MEDIU VARIABIL	(€/kg)	2,28

VI.2. Concluzii

În urma experimentărilor tehnologiei de creștere a crapului în sistemul recirculant, în condițiile utilizării probioticelor realizate în cadrul acestei lucrări, se poate concluziona că acesta corespunde din toate punctele de vedere (tehnic, ecologic și economic) scopului propus și anume: evaluării bioeconomice a unui sistem recirculant comercial pentru creșterea intensivă a crapului (*Cyprinus carpio*, Linnaeus 1578) în condițiile utilizării probioticelor.

Din analiza indicatorilor economici rezultă faptul că, o unitate de producție (fermă piscicolă) care are drept obiect de activitate creșterea crapului în sistem recirculant de acvacultură în condițiile utilizării probioticelor este fezabilă din punct de vedere economic.

Capitolul VII. CONCLUZII FINALE

În urma cercetărilor realizate privind utilizarea probioticelor în acvacultura industrială din sistemele recirculante s-au desprins următoarele concluzii finale:

- ▶ Analiza tabloului privind indicatorii de calitate a apei evidențiază faptul că, utilizarea unui furaj în care s-a înglobat probiotice nu a influențat în mod negativ calitatea apei tehnologice, parametrii monitorizați nu au înregistrat diferențe semnificative între variantele experimentale și s-au încadrat în ecartul optim al speciei studiate.
- ▶ Rezultatele obținute cu privire la identificarea microbiotei specifice speciei *Cyprinus carpio*, *Linnaeus 1578* sunt în conformitate cu cele ale altor cercetători care au demonstrat că microorganismele probiotice reduc proliferarea patogenilor prin competiția aderenței la substrat. De asemenea, este necesar a se adânci studiile pentru observarea factorilor care determină producerea efectului probiotic în tractul digestiv al peștelui pentru a putea analiza astfel, mai îndeaproape, proprietățile tulpinilor izolate în scopul utilizării acestora ca și probiotice pentru normalizarea microflorei intestinale la peștii luați în studiu.
- ▶ Evaluarea nivelului optim de hrănire este cu atât mai strictă în cazul sistemelor recirculante de producție, cunoscut fiind faptul că furajele neutilizate (neconsumate și nedigerate) reprezintă principala sursă de poluare a apei de cultură. Din analiza datelor privind evaluarea numărului total de germeni (NTG) pe perioada desfășurării experimentului de creștere s-a evidențiat faptul că, nivelul total de germeni încadrează apa din unitățile de creștere a sistemului recirculant în categoria apelor cu încărcare microbiană redusă.
- ▶ Rezultatele obținute în cadrul cercetărilor efectuate privind ritmul de creștere al biomasei de cultură evidențiază un spor de creștere mai mare în cazul utilizării probioticului *BioPlus® 2B* în a cărei compoziție intră cele două specii de bacterii aparținând genului *Bacillus* (***Bacillus subtilis*** și ***Bacillus licheniformis***), în toate experimentările realizate. Valori mai bune ale factorului de conversie al hranei (FCR) au fost înregistrate la variantele experimentale cu probiotice ceea ce sugerează că înglobarea probioticelor în furaj îmbunătățește utilizarea eficientă a hranei. Probioticele utilizate în vederea completării rațiilor administrate a condus la obținerea unor performanțe de creștere și utilizare a hranei mai eficiente, decât în varianta experimentală martor, indicând că adăugarea de probiotice în furaj contribuie la reducerea costurilor de producție a crapului (*Cyprinus carpio*, *Linnaeus 1758*).

- ◆ Din analiza indicatorilor hematologici și biochimici ai crapului crescut în sistemul recirculant privind evaluarea stării fiziologice, se confirmă faptul că probioticele pot fi utilizate pentru consolidarea sistemului imunitar și a stării de sănătate, îmbunătățind astfel rezistența materialului biologic la boli și performanța de creștere.

Concluziile care converg din studiile realizate în lucrarea de față pot fi grupate în următoarea concluzie generală, și anume: alegerea variantei tehnologice optime de creștere a crapului în sistem recirculant de acvacultură se realizează în urma analizei tuturor indicatorilor de performanță tehnologică și indicatorilor hematologici și biochimici, astfel încât să existe un echilibru între calitatea producției și eficiența economică, ceea ce, se definește prin profitabilitate.

Sintetizând, considerăm că lucrarea de față aduce o importantă contribuție la cunoașterea și dezvoltarea conceptului de utilizare a probioticelor în sistemele recirculante de acvacultură prin:

- ◆ *Selectarea probioticelor utilizate în acvacultură prin aplicarea rezultatelor cercetărilor realizate pe plan mondial;*
- ◆ *Stabilirea dozelor de probiotic în vederea obținerii unui produs care să asigure siguranță alimentară;*
- ◆ *Realizarea schemei cadru tehnologice de înglobare a probioticelor în furajul utilizat pentru creșterea crapului în sistem recirculant de acvacultură;*
- ◆ *Optimizarea fazei tehnologice de nutriție a crapului crescut în sistem recirculant de acvacultură;*
- ◆ *Stabilirea microbiotei specifice a speciei *Cyprinus carpio*, Linnaeus 1758;*
- ◆ *Stabilirea tabloului biochimic și hematologic al crapului crescut în condițiile utilizării probioticelor în sisteme recirculante de acvacultură;*
- ◆ *Stabilirea calității cărnii de pește în condițiile utilizării furajelor cu probiotic;*
- ◆ *Realizarea modelului economic al creșterii intensive a crapului în condițiile utilizării probioticelor.*

BIBLIOGRAFIE

1. Angelica Docan, V. Cristea, Iulia Grecu, Lorena Dediu, 2010. Haematological response of the European catfish, *Silurus glanis* reared at different densities in „flow-through” production system, *Archiva Zootechnica* 13:2, 63-70.
2. Balcázar, J.L., de Blas, I., Ruiz-Zarzuola, I., Cunningham, D., Vendrell, D., Múzquiz, J.L., 2006. The role of probiotics in aquaculture. *Vet. Microbiol.* 114: 173–186.
3. CRISTEA, V., GRECU I., CEAPĂ, C., 2002 - *Ingineria sistemelor recirculante din acvacultură*, Editura Didactică și Pedagogică București, ISBN 973-30-2785-5.
4. CRISTEA, V., SFETCU, L., IORDACHE, G., 2003 - *The influence of stoking densities on growth performances of carp fingerlings reared in a recirculating aquaculture system*. *Analele Universității Galați*, fascicula VII, Tehnică Piscicolă.
5. CRISTEA V., SFETCU L., IORDACHE G., 2004 - *The influence of different stoking densities on growth performances of carp fingerlings reared in a recirculating aquaculture system*. *Analele Universității „Dunărea de Jos” Galați*, fascicula VII, Pescuit și Acvacultură, ISSN 1453-0821, pag. 24-30;
6. CRISTEA V., SFETCU L., IORDACHE G., GRECU I., SÂRBU A., 2004 – *Preliminary studies regarding intensive fingerlings carp rearing in a recirculating aquaculture system*. Simpozionul „A 33-a Sesiune Internațională de Comunicări Științifice a Facultății de Zootehnie”, București, 24 – 26 noiembrie, Seria C, vol. XLVI-XLVII.
7. CRISTEA, V., s.a., 2009 – *Raport Științific de Cercetare: proiectul „Asigurarea Biosecurității Sistemelor Recirculante de Acvacultură Intensivă prin Utilizarea Probioticeleor-PROBIOACVA, Universitatea “Dunărea de jos din Galați”*.
8. CRISTEA, V., s.a., 2010 – *Raport Științific de Cercetare: proiectul „Asigurarea Biosecurității Sistemelor Recirculante de Acvacultură Intensivă prin Utilizarea Probioticeleor-PROBIOACVA, Universitatea “Dunărea de jos din Galați”*.
9. Decamp O. 2004. Probiotics in Aquaculture: A commentary based on some recent observations. *Aqua Feeds: Formulations Beyond* 1(4): 12-13.
10. DEDIU, A., 2010 - *Cercetări privind influența factorilor ecotehnologici din sistemele recirculante de acvacultură industrială asupra fiziologiei și stării de sănătate a biomasei de cultură*. Teza de doctorat. Universitatea “Dunărea de Jos” Galați.
11. Dobšikova R., Svobodova Z., Blahova J., Modra H., Velišek J., 2009 The effect of

- transport on biochemical and haematological indices of common carp (*Cyprinus carpio* L.), *Czech J. Anim. Sci.*, 54, (11): 510–518.
12. Docan A., Grecu, I., Sfetcu, L., Vasilean I., Cristea, V., 2008. *Studies regarding the presence of the pathogens bacteria into a recirculating system of beluga sturgeon intensive rearing*. *Lucrări științifice Zootehnie și Biotehnologii, Timișoara*, vol. 41 (2):p. 148-154.
13. **Elena Bocioc**, V. Cristea, N. Patriche, Iulia Grecu, Săndița (Placintă) Ion, M.T. Coadă, T.I. Ionescu; (2011) "Water Quality Monitoring Into A Recirculating Aquaculture System For Intensive Rearing Of Carp (*Cyprinus Carpio*) Juveniles Fed With Probiotics Supplement", *LUCRARI STIINTIFICE SERIA ZOOTEHNIE VOL 55(16)*, pag. 289-294., Editura "ION IONESCU DE LA BRAD" IASI , Print ISSN: 1454-7368, Electronic ISSN: 2067-2330.
14. **E. Bocioc**, V. Cristea, I. Grecu, A. Docan, L. Dediu, N. Patriche, (2011) "Haematological profile of the juvenile carp (*Cyprinus Carpio*) reared into a recirculating aquaculture system with probiotics supplement", *Journal of Environmental Protection and Ecology*, <http://www.gen.teithe.gr/~bena/journal.html> (In press).
15. **E. Bocioc**, I.Sandita (Placintă), V. Cristea, N. Patriche, I. Grecu, M. (Crețu) Mocanu, M. T. Coadă, (2011) "Study concerning biochemical composition of carp (*Cyprinus carpio*) fed with probiotics supplement in recirculating aquaculture system", *Journal of Environmental Protection and Ecology*, <http://www.gen.teithe.gr/~bena/journal.html> (In press).
16. Fuller, R., 1989. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* 66, 365–378.
17. Gatesoupe, F.J., 1999. The use of probiotics in aquaculture, *Aquaculture* 180, 147-165.
18. Gomez-Gil, B., Roque, A., Turnbull, J.F., 2000. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture* 191, 259–270.
19. GRECU, I., CRISTEA, V., SFETCU, L., IORDACHE, G., 2005 – *Growth performances of the stellate sturgeon (Acipenser stellatus) and carp (Cyprinus carpio) juveniles reared into a recirculating system*. Volumul Simpozionului Internațional "Creșterea animalelor în contextul integrării europene" – Timișoara, Editura Agroprint Timișoara, ISSN 1221-5287, pag. 506-512.
20. Jan, Mazurkiewicz., Antoni, Przybyl., Anna, Sip., Włodzimierz, Grajek., 2007. *Effect of Canobacterium divergens and Enterococcus hirae as probiotic bacteria in feed for*

- common carp, Cyprinus carpio L.*, Arhives of Polish Fisheries, Vol 15, Fasc. 2, 93-102.
21. Ioan IONESCU, Victor CRISTEA, Ion VASILEAN, Iulia GRECU, **Elena BOCIIOC**, Sandita ION (PACINTA), Ionica ENACHE (2010) *“Influence of feeding frequency on growth of juvenile carp in an intensive aquaculture recirculating system”*, Journal of Environmental Protection and Ecology <http://www.gen.teithe.gr/~bena/journal.html> (In press).
22. IORDACHE G., 2010 - *Cercetări privind creșterea intensivă a crapului în sisteme recirculante*. Teza de doctorat. Universitatea “Dunărea de Jos” Galați.
23. Ionica ENACHE, Victor CRISTEA, Tudor IONESCU, Săndița ION; (2011) *„The influence of stocking density on the growth of common carp, Cyprinus carpio, in a recirculating aquaculture system”*, AACL Bioflux, Volume 4(2):146-153.
24. Ionica ENACHE, Victor CRISTEA, Angelica DOCAN and Adina POPESCU; (2011) *„Hematological profile in juvenile carp reared under a recirculating system condition”*, AACL Bioflux, Volume 4(5):644-650.
25. Kimberley, A., Whitman, 2004. *Finfish and Shellfish Bacteriology – Manual, Techniques and Procedures*, Iowa State Press – A Blackwell Publishing Company, ISBN: 0-8138-1952-0.
26. Lucian OPREA, Victor CRISTEA, Neculai PATRICHE, Corina SION (BADALAN), **Elena BOCIIOC**, 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”*, Journal of Environmental Protection and Ecology, <http://www.gen.teithe.gr/~bena/journal.html> (In press).
27. Mariana Lupoae, V. Cristea, D. Coprean, Mirela Mocanu, Tanți Patriche, **Elena Bocioc** (2011) *“Biochemical Determinations And Oxidative Stress Evaluation On Oncorhynchus Mykiss Grown In Recirculating System”*, LUCRARI STIINTIFICE SERIA ZOOTEHNIE VOL 55(16), pag. 306-310., Editura “ION IONESCU DE LA BRAD” IASI , Print ISSN: 1454-7368, Electronic ISSN: 2067-2330.
28. Marian T. Coadă, Neculai Patriche, Victor Cristea, Mioara Costache, **Elena Bocioc**, Săndița Ion; (2011) *“Preliminary results on growth of the Polyodon spathula juveniles in recirculating system conditions”*, AACL Bioflux 4(2):209-215.
29. M. T. Coadă, N. Patriche, V. Cristea., Mioara Costache, **Elena Bocioc**, Petronela Georgiana Călin (Sandu), Corina Sion (Bădălan) (2011) *“Preliminary Results On The*

- Quality Of Feed On Growth Performance Species Polyodon Spathula (Walbaum, 1792) The Conditions Of A Recirculating System”, LUCRARI STIINTIFICE SERIA ZOOTEHNIE VOL 55 (16), pag. 341-345, Editura “ION IONESCU DE LA BRAD” IASI, Print ISSN: 1454-7368, Electronic ISSN: 2067-2330.*
30. M. Mocanu (Cretu), V. Cristea, L. Dediu, A. Dogan, I.R. Grecu, **E. Bocioc**, I. Sandita (Placinta), (2011) “The effect of probiotic diet on growth and hematology parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792)”, Journal of Environmental Protection and Ecology, <http://www.gen.teithe.gr/~bena/journal.html> (In press).
31. Munteanu G., Bogatu D. 2003. *Tratat de ihtiopatologie*. Editura Excelsior Art., Timișoara, ISBN 973-592-085-9.
32. Nicky, B., Buller, 2009. *Bacteria from Fish and Other Aquatic Animals – A Practical Identification Manual*, CABI Publishing, ISBN – 10:0-85199-738-4.
33. Oprea L., 1996. Teză de doctorat - Cercetări privind utilizarea furajelor granulate în alimentația peștilor, în diferite sisteme de cultură, Universitatea “Dunărea de Jos” din Galați.
34. Oprea L., Georgescu R., 2000. *Nutriția și alimentația peștilor*. Editura tehnică București.
35. Patriche, T., 2007, *Cercetări imunologice la speciile de pești de cultură din România – Teză de doctorat*, Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați.
36. Patriche, T., 2008, *Imunitatea la pești*. Ed. Didactică și Pedagogică București, p. 5-8; 18-36.
37. Patriche, T. & Patriche, N., (2008) “*Determination of protein fractions in the blood of the high economic value fish farmed species in Romania*”, International Scientific Symposium, Animal Husbandry and Biotechnology Scientific Papers, vol. 41(2), p.119-123, Publishing Agroprint, Timișoara.
38. Patriche T., Patriche N., **Bocioc E.**, (2010) “*Serum biochemical parameters of juvenile stages the ossetra sturgeon Acipenser güldenstaedti (BRANDT, 1833)*”, BULLETIN OF UNIVERSITY OF AGRICULTURAL SCIENCES AND VETERINARY MEDICINE CLUJ-NAPOCA, ISSN: 1843-536X, p. 300-303.
39. Păltânea, E., Patriche N., Jecu, E., Talpeș, M., Mocanu, E. (2008) “*Rearing efficiency and nutritional quality assessment for carp sapling (Cyprinus carpio Linne, 1758) from recirculating systems*”, *Lucrări științifice Zootehnie și Biotehnologii*, vol. 41 (2), Timisoara.
40. Păltânea E., 1999. Teză de doctorat – Cercetări privind obținerea unor furaje

- hidrolizate enzimatic utilizate în piscicultura intensivă, Universitatea “Dunărea de Jos” din Galați.
41. Savin, C., Cristea, V., Vasilean I., Patriche, N., Marilena Talpeș. 2009. *Monitorizarea calității apei în cultura intensivă a sturionilor din sisteme recirculante*, Lucrări științifice Zootehnie și Biotehnologii, vol. 42 (2), Timișoara. p. 107-115, ISSN 1221-5287.
 42. Săndița ION (PĂCINTĂ), Victor CRISTEA, **Elena BOCIOC**, Tudor Ioan IONESCU, Marian Tiberiu COADA, Ionica ENACHE (2010) “*Monitoring The Water Quality In The Recirculating Aquaculture System*”, Journal of Environmental Protection and Ecology, <http://www.gen.teithe.gr/~bena/journal.html> (In press).
 43. SFETCU, L., 2008 – *Cercetări privind creșterea peștilor în sisteme recirculante integrate*. Teza de doctorat. Universitatea “Dunărea de Jos” Galați;
 44. SFETCU, L., PĂLTÂNEA, E., CRISTEA, V., OPREA, L., DOCAN, A., 2005 - *Data regarding biochemical composition of carp fingerlings (Cyprinus carpio, Linne, 1758) reared in a recirculating system*. Volumul Simpozionului Internațional USAMV Iași.
 45. Soroush Ghodrati Zadeh, Zahar Ghodrati Zadeh, Mayram Farhoudi and Reza Habibian 2011. Effects of Addition of Saccharomyces cerevisiae and Bacillus subtilis in Diet on Aected Hematological and Biochemical Parameters in Cammon Carp (*Cyprinus carpio*), World Journal of Fish and Marine Sciences 3(1):96-99, 2011, IDOSI Publications, ISSN: 2078-45-89.
 46. Staykov Y., Spring P, Sweetman, J, Denev, SA. 2007a. The influence of 2 and 4% Nu-Pro® on the growth performance Common carp (*Cyprinus carpio* L.), raised in net cages. Proceedings of the 22nd Annual Symposium “Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries” (Suppl. Abstracts of Poster Presented), (Eds: T. P. Lyons and K. A. Jacques) April 23-26th, 2007, Lexington, Kentucky, USA, pp. 84.
 47. Stăncioiu, S., Patriche, N., Patriche, T., 2006, Ihtiologie generală. Ed. Didactică și Pedagogică, București.
 48. Suxu He, Wenshu Liu, Zhigang Zhou, Wei Mao, Pengfei Ren, Toshihiro Marubashi and Einar Ringø, 2011. Evaluation of probiotic strain Bacillus subtilis C-3102 as a feed supplement for koi carp (*Cyprinus carpio*), Aquaculture Research & Development, <http://dx.doi.org/10.4172/2155-9546.S1-005>.
 49. Tanti Patriche, Neculai Patriche, **Elena Bocioc**, Marian T. Coada (2011) “*Serum biochemical parameters of farmed carp (Cyprinus carpio)*”, AACL Bioflux, Volume 4(2):137-140.

50. Tanti Patriche, Neculai Patriche, **Elena Bocioc** (2011) “*Determination of some normal serum parameters in juvenile Sevruga sturgeons *Acipenser stellatus* (Pallas, 1771)*”, *Archiva Zootechnica* 14:1, 49-54.
51. Tofan, C., Bahrim, G., Nicolau, A., Zara M. 2002. *Microbiologia produselor alimentare. Tehnici și analize de laborator*. Ed. AGIR, București, 544 p.
52. VELISEK J., SVOBODOVA Z., 2004 *Anaesthesia of Common Carp (*Cyprinus carpio* L.) with 2-phenoxyethanol: Acute Toxicity and Effects on Biochemical Blood Profile*, *ACTA VET. BRNO*, 73: 247-252.
53. Wang YB, Xu ZR. 2006. *Effect of probiotics for common carp (*Cyprinus carpio*) based on growth performance and digestive enzyme activities*. *Animal Feed Sci Technol* 127: 283-292.
54. Yanbo W, Zirong X. 2006. *Effect of probiotics for common carp (*Cyprinus carpio*) based on growth performance and digestive enzyme activities*. *Animal Feed Sci Technol* 127: 283-292.