



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2011 01390**

(22) Data de depozit: **12.12.2011**

(41) Data publicării cererii:
30.08.2013 BOPI nr. **8/2013**

(71) Solicitant:
• UNIVERSITATEA "DUNĂREA DE JOS"
DIN GALAȚI, STR.DOMNEASCĂ NR.47,
GALAȚI, GL, RO

(72) Inventatori:
• CRISTEA VICTOR, STR. BRĂILEI NR. 58,
BL. BR2, AP. 101, GALAȚI, GL, RO;
• GRECU IULIA RODICA,
STR. CRISTOFOR COLUMB NR. 6, GALAȚI,
GL, RO;
• DEDIU LORENA, STR. MACEDONA
NR. 11, BL. A11, SC. 2, AP. 3, GALAȚI, GL,
RO;

• DOCAN ANGELICA IONELIA,
STR. CLUJ NR. 11, BL. D5, AP. 38, GALAȚI,
GL, RO;
• BOCIOC ELENA, CHILIILE, BZ, RO;
• TALPEȘ MARILENA,
STR. CONSTANTIN BRÂNCOVEANU
NR. 2, BL. D1, SC. 1, AP. 8, GALAȚI, GL,
RO;
• NICULIȚA PETRU, INTRAREA EPISTOLEI
NR. 1, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
• POPA MONA, STR. MAIOR VASILE
BĂNCILĂ NR.35, BL.33A, ET. 7, AP.30,
SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;
• COSTACHE MIOARA, STR. OLARI
NR. 204, COMUNA NUCET, DB, RO;
• BUCUR CECILIA, STR. I.C.VISARION
NR. 20, BL. M2, AP. 11, TITU, DB, RO

(54) **PROCEDEU DE BIOSECURIZARE A SISTEMELOR
RECIRCULANTE DE ACVACULTURĂ INTENSIVĂ PRIN
STIMULAREA RĂSPUNSULUI IMUN LA PEȘTI, PRIN
UTILIZAREA PROBIOTICELOR**

(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la un procedeu tehnologic de tratare a biomasei de cultură ciprinicole cu probiotic, în vederea obținerii unei producții superioare și a biosecurizării sistemului recirculant de creștere prin stimularea sistemului imun al peștilor, prin folosirea unui produs probiotic pentru uz zootehnic, aditivat furajului într-o concentrație de 3, 2...3, 84*10⁹ UFC/kg furaj. Procedeu conform invenției constă în aceea că se asigură exprimarea potențialului bioprodusiv al speciei *Cyprinus carpio*, în vârstă de un an, prin creșterea

sporului mediu zilnic cu 5...40% față de martor, concomitent cu stimularea răspunsului imun al gazdei, prin creșterea semnificativă a limfocitelor și scăderea numărului de neutrofile la nivelul tabloului leucocitar, respectiv, prin creșterea cantității de hemoglobină și a numărului de eritrocite.

Revendicări: 1

Figuri: 8

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



PROCEDEU DE BIOSECURIZARE A SISTEMELOR RECIRCULANTE DE ACVACULTURĂ INTENSIVĂ PRIN STIMULAREA RĂSPUNSULUI IMUN LA PEȘTI PRIN UTILIZAREA PROBIOTICELOR

În sistemele de producție intensivă din acvacultura, așa cum este cazul sistemelor recirculante, organismele acvatice sunt expuse unor condiții stresante de viață ce conduc deseori la declansarea unor boli, mai ales de natură infecțioasă, și de deteriorarea rapidă a condițiilor de viață ce se traduc în pierderi economice serioase. La momentul actual, prevenirea și controlul stărilor patologice au condus la o escaladă în utilizarea unor substanțe chimice în producția zootehnică care fie se acumulează în carnea și ficatul peștilor, fie conduce la apariția unor forme de rezistență la bacterii determinând o incidență crescută a îmbolnăvirilor.

O serie de studii experimentale au demonstrat faptul că acești agenți patogeni pot fi eliminați sau reduși prin procese de biocontrol exercitate de o serie de microorganisme considerate probiotice. Aceste probiotice, de cele mai multe ori bacterii benefice, au fost și sunt studiate și utilizate în nutriția umană și a animalelor terestre de mai mult timp (Fuller, 1989; Bengmark, 1998) însă introducerea și aplicarea lor pentru prevenirea și, eventual, controlul stării sanitare a populațiilor de organisme acvatice (pești, creveți) este de dată mai recentă (Balcazar, 2006; Gatesoupe, 1999; Gomez-Gil și al., 2000; Verschuer și al., 2000; Irianto și Austin, 2002) asigurând, simultan, atât reducerea problemelor de sănătate de la nivelul populațiilor acvatice de cultură, cât și îmbunătățirea supraviețuirii și ratei de creștere. În literatura de specialitate non-brevet s-au descris o serie de mecanisme de acțiune ale probioticelor: activitate antimicrobiană, furnizarea de nutrienți esențiali și asigurarea unor enzime digestive pentru stimularea nutriției și digestiei, îmbunătățirea calității apei în unitățile de creștere și, nu în ultimul rând, stimularea răspunsului imun al gazdei. Sub aspectul exercitării unei acțiuni inhibante asupra proliferării unor bacterii patogene sau condiționat patogene care apar în sistemele de producție din acvacultură, microorganismele de tip probiotic sunt apreciate, din ce în ce mai mult, ca o alternativă ecologică la tratamentul cu antibiotice.

Autoritatea Europeană pentru Siguranța Alimentelor (EFSA) a aprobat o serie de preparate probiotice ca aditivi alimentari cu uz zootehnic. Unul dintre aceste produse este aditivul BioPlus 2B de la firma Chr. Hansen A/S și care conține 2 tulpini de *Bacillus*: *Bacillus licheniformis* DSM 5749 și *Bacillus subtilis* DSM 5750 în proporție 1:1 într-o concentrație de min. 3.2×10^9 UFC/g (1.6×10^9 /tip bacterie) cu aplicabilitate demonstrată pentru păsări (pui, curcani) dar și pentru porci, iepuri (conform literaturii).

În general, conceptul de probiotic a fost dezvoltat la organismele terestre iar extinderea aplicației acestor bioproduse în acvacultură obligă la o analiză profundă în ceea ce privește efectul lor asupra unor organisme atât de diferite din punct de vedere al mediului de viață. În acvacultură, practica tehnologică a demonstrat faptul că vechiul dicton după care "este cu mult mai ușor să previi decât să tratezi o boală" este de importanță majoră în patologia animalelor acvatice, lupta împotriva îmbolnăvirilor prin profilaxie, având o importanță chiar mai mare decât în cazul vertebratelor terestre, date fiind caracteristicile mediului acvatic care îngreunează diagnosticul timpuriu al diferitelor boli, condiție esențială pentru împiedicarea la timp a extinderii acestora

Acțiunea probiotică a tulpinilor de *Bacillus* sp este cunoscută ca fiind legată de inhibarea proliferării unor bacterii patogene pentru organismul gazda prin fenomene de excludere competitivă (concurența vitală și antagonism bacterian) prin producerea de bacitracină. Siguranța manipulării acestor bacterii se datorează caracteristicilor fizice și



biologice ale sporilor, preparatele microbiale fiind rezistente la condițiile de mediu (temperatură, pH, presiune osmotică, oxigen etc.) și cu o perioadă mai lungă de viață.

În literatura de specialitate au fost întâlnite doua studii restrânse de aplicabilitate a acestui produs în acvacultură: la larve de păstrăv (Naseri, S și al., 2008) și tilapia (Shelby R.A. și al., 2006).

Procedeul nostru urmărește aplicația acestui produs la o altă specie - crapul considerat o specie importantă din punct de vedere al acvaculturii din România în condițiile utilizării lui în cadrul unui sistem recirculant în scopul asigurării unor măsuri de prevenire și control al îmbolnăvirilor prin stimularea sistemului imunitar al peștilor.

Procedeul tehnologic conform invenției constă în aditivarea tulpinilor de bacterii *Bacillus licheniformis* DSM 5749 și *Bacillus subtilis* DSM 5750 într-o concentrație de $3,2 \pm 3,84 \cdot 10^9$ UFC per kg furaj administrat la creșterea crapului de 1 an pentru obținerea unui spor mediu zilnic cuprins între 5-19 % fata de materialul biologic netratat, în condiții de stres termic (valori suboptimale de 13,5-17 °C), respectiv între 26-40 % în condiții de optim de temperatură (22-27 °C)

Procedeul tehnologic presupune parcurgerea următorilor pași:

- Analiza și caracterizarea microbiotei indigene a crapului sănătos de cultură
- Selecția tulpinilor bacteriene cu potențial probiotic (comerciale și/sau indigene)
- Testarea *in vitro* a modului de acțiune a bacteriilor selecționate, cu potențial rol probiotic, împotriva bacteriilor patogene din sistem
- Testarea *in vivo* a modului de acțiune a bacteriilor selecționate, cu potențial rol probiotic
- Expunerea experimentală a unor loturi de pești la îmbolnăviri după tratarea *in vivo* cu bacteriile selectionate, cu potențial rol probiotic
- Testarea la scară a soluției tehnologice de asigurare a biosecurității sistemului recirculant de acvacultură pentru o perioadă de timp semnificativa

Se dau în continuare, 2 exemple concrete de realizare a invenției și care sunt în corelație cu etapele descrise anterior și figurile:

- Fig. 1 *Aeromonas hydrophila*, placa cu Agar nutritiv și galerie API 20NE
- Fig. 2 Dinamica ritmului de creștere a biomasei de cultură
- Fig.3. Variația coeficientului de conversie a hranei (FCR) și a ratei creșterii specifice (SGR)
- Fig. 4. Evoluția hemoglobinei
- Fig. 5. Evoluția hematocritului
- Fig. 6. Evoluția numărului de eritrocite
- Fig.7 Leucograma în varianta de control
- Fig. 8. Leucograma în varianta cu BioPlus

Exemplul 1. Experiment *in vitro* privind evaluarea calitativă a sensibilității bacteriei patogene/condiționat patogene *Aeromonas hydrophila* la acțiunea tulpinilor probiotice din bioaditivul cu uz zootehnic BioPlus® 2B. Chiar dacă *Aeromonadele* sunt bacterii frecvente în mediul înconjurător, specia *Aeromonas hydrophila* din familia Vibrionaceae este considerată factorul primar determinant al septicemiei hemoragice bacteriene la pești, boală cu extensivitate mare în fermele piscicole. Este o bacterie Gram-negativă, sub formă de bastonaș, drept cu dimensiuni de $0,3 - 1,0 \times 1,0 - 3,5 \mu\text{m}$, mobilă. Este un microorganism puțin pretențios fiind izolat din rinichiul sau sângele peștelui afectat și crescut pe un mediu nutritiv uzual, cum este agarul nutritiv, pe care dezvoltă după 24 h, la 22 – 28 °C , colonii rotunde, cremoase, albe, netede, convexe, cu diametru până la 5 mm. Tulbură bulionul cu sau fără



producere de pigment, este oxidazo-pozitivă și fermentează glucoza, maltoza, lactoza fiind ulterior confirmată cu testul API 20 NE.

Testarea s-a realizat prin metoda difuziei pe agar nutritiv (Pidcock, 1990) în plăci Petri, cu o adâncime de 4 mm, suprafața mediului fiind inoculată cu câte 100 μ l suspensie bacteriană pură de *Aeromonas hydrophila* izolată de la un exemplar bolnav de crap. Au fost testate 3 concentrații succesive din inoulul bacterian: 0,5; 1; 2; Mc Farland ce corespunde următoarelor concentrații:

0,5 Mc Farland echivalent cu $1,5 \times 10^7$ germeni / ml;

1 Mc Farland echivalent cu 3×10^8 germeni / ml,

2 Mc Farland echivalent cu 6×10^8 germeni / ml

Pe plăci au fost testate 4 concentrații succesive din produsul probiotic: $1,28 \times 10^9$ UFC/g, $1,28 \times 10^8$ /g, $1,28 \times 10^7$ UFC/g și $1,28 \times 10^6$ UFC/g pregătite în prealabil prin dispunerea, în condiții aseptice, a 20 μ l suspensie probiotic pe discuri de hârtie de filtru sterile (d=6 mm). Discurile au fost ulterior repartizate pe suprafața mediului de cultură. În continuare plăcile Petri au fost incubate în condiții optime pentru creșterea bacteriei testate pentru o perioadă de 24 de ore. După incubare, plăcile Petri au fost examinate în vederea determinării zonelor de inhibiție în care bacteria nu a crescut, zone care se prezintă sub formă de halouri în jurul discurilor de hârtie. Exprimarea rezultatelor privind rezistența microorganismului testat s-a făcut în funcție de zona de inhibiție măsurată în milimetri. În general, microorganismul testat este considerat foarte sensibil dacă zona de inhibiție este > 30 – 35 mm în diametru, sensibil dacă zona de inhibiție este între 20 și 30 mm în diametru sau rezistent dacă zona de inhibiție este <15-20 mm.

Rezultatele experimentale sunt prezentate în tabelul 1 și au demonstrat faptul că tulpinile de *Bacillus licheniformis* (DSM 5749) și *Bacillus subtilis* (DSM 5750) prezintă activitate antimicrobiană față de tulpina de *A. hydrophila*, fapt evidențiat prin haloul dezvoltat în jurul discurilor de hârtie.

Comparațiile testate conform exemplului 1 și rezultatele obținute:

Tulpina <i>Aeromonas hydrophila</i> (AH) utilizată	Concentrația produsului probiotic $1,28 \times 10^9$ UFC/ml	Concentrația produsului probiotic $1,28 \times 10^8$ UFC/ml	Concentrația produsului probiotic $1,28 \times 10^7$ UFC/ml	Concentrația produsului probiotic $1,28 \times 10^6$ UFC/ml
Inundare placă Agar cu 100 μ l AH, concentrația de 0,5 Mc Farland	Sensibil	Sensibil	Sensibil	Rezistent
Inundare placă Agar cu 100 μ l AH, concentrația de 1 Mc Farland	Sensibil	Sensibil	Sensibil	Rezistent
Inundare placă Agar cu 100 μ l AH, concentrația de 2Mc Farland	Rezistent	Rezistent	Rezistent	Rezistent

Exemplul 2. Experiment in vivo privind efectul de stimulare a răspunsului imun al gazdei.



Experimentul a urmărit testarea efectului acestui probiotic asupra puietului de crap sub aspectul performanței de creștere și stării fiziologice. Alături de probioticul BioPlus® 2B au mai fost testate încă alte 2 probiotice, fiecare variantă experimentală fiind organizată pe trei replici iar probioticul comercial fiind adăugat în furajul granulat în aceeași concentrație, astfel:

I variantă experimentală - V1 - lot martor, hrănit cu furaj granulat tratat doar cu liantul de fixare a probioticului (însă fără probiotic)

A II-a variantă experimentală - V2 - lot tratat cu probioticul BioPlus® 2B (uz veterinar), adăugat într-o concentrație de $3,2 \times 10^9$ CFU/kg furaj;

A III-a variantă experimentală - V3 - lot tratat cu probioticul P1 (uz veterinar), adăugat într-o concentrație de $3,2 \times 10^9$ CFU/kg furaj;

A IV-a variantă experimentală - V4 - lot tratat cu probioticul P2 (uz uman), adăugat într-o concentrație de $3,2 \times 10^9$ CFU/kg furaj;

Experimentul s-a derulat pe o perioadă de 35 de zile, rația zilnică de furaj administrată a fost 3,5 % din greutatea totală a biomasei piscicole.

Rezultatele au arătat faptul că în cele trei tratamente experimentale cu probiotice s-au obținut sporuri de creștere semnificative (fig. 1), în condițiile unei supraviețuirii de 100% în toate subvariantele.

Sporul de creștere al biomasei de cultură a înregistrat valori mai mari la variantele tratate cu aditivi probiotici, sporul de creștere cel mai mic a fost în varianta martor (subvarianta sv2), iar cel mai mare spor de creștere a fost obținut în varianta cu probiotic BioPlus® 2B. De asemenea, cei doi indicatori tehnologici - rata creșterii specifice (SGR) și coeficientul de conversie a hranei (FCR) – arată cele mai mari valori pentru varianta tratamentului cu probioticul BioPlus® 2B (fig. 3)

Pentru evidențierea stimulării răspunsului imun, a fost analizat tabloul sanguin deoarece deoarece prin caracterizarea profilurilor eritocitar și leucocitar, mai precis prin stabilirea formulei leucocitare, putem obține rapid o serie de date privind modificările cantitative ale unor elemente celulare cu rol în apărarea nespecifică a organismului: granulocitele, fagocitele mononucleare și mastocitele. Aceste celule au un rol imunitar însemnat datorită activității fagocitare și a colaborării cu celule limfocitare care execută recunoașterea specifică a antigenului reprezentat de substanțele străine (virusuri, bacterii, toxine, ecto și endoparaziți etc.). Activitatea lor este deosebit de importantă deoarece sunt răspândite, practic, în tot organismul și sunt ușor de mobilizat, iar foarte multe dintre ele au acțiune fagocitară și elaborează enzime digestive puternice.

Astfel, în fig 4, 5 și 6 sunt indicate variațiile parametrilor hematologici: hemoglobină, hematocrit și număr de eritrocite.

În ceea ce privește evoluția tabloului leucocitar, putem aprecia ca stimularea răspunsului imun s-a realizat prin stimularea numărului de limfocite (limfocitoză), însoțită de o ușoară scădere a granulocitelor neutrofile (neutropenie), conform fig. 7 și 8.

Procedeele conform invenției conduc la următoarele avantaje:

- permite obținerea unor sporuri de creștere superioare a biomasei de cultură
- stimulează sistemul imunitar al peștilor
- are avizul utilizării la animalele terestre în Comunitatea Europeană, speciile de Bacillus fiind apreciate ca specii probiotice rezistente la diferite condiții de mediu
- simplitate tehnologică și preț de cost scăzut



BIBLIOGRAFIE

- 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.
- Bengmark, S., 1998. Ecological control of the gastrointestinal tract. The role of probiotic flora. *Gut* 42, 2–7.
- Fuller, R., 1989. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* 66, 365–378.
- Gatesoupe, F.J., 1999. The use of probiotics in aquaculture, *Aquaculture* 180, 147-165.
- Naseri Samira*,Nezami Balouchi Shaaban Ali,Khara Hossein,Farzanfar A., Lashtou Aghaei Gh.R.,Shakouri Matin. 2008. The study of growth performance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) larvae with different levels of probiotic and iron in use of supplemented in diet . *Journal of Fisheries* Fall 2008; 2(3):15-20.
- Piddock, L.J.V., 1990. A review. Techniques used for the determination of antibacterial resistance and sensitive in bacteria. *J. Appl. Bacteriol.*, 68: 307–18
- Shelby RA, Lim CE, Aksoy M, Klesius PH. 2006. Effect of probiotic diet supplements on disease resistance and immune response of young Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *J Appl Aquac* 18: 23-34.
- Welker T.L., C. Lim. 2011. Use of Probiotics in Diets of Tilapia. *Aquac Res Development* 2011, S1, <http://dx.doi.org/10.4172/2155-9546.S1-014>



REVENDICARE

Procedeu tehnologic de tratarea a biomasei de cultură ciprinicole cu un produs probiotic de uz zootehnic aditivat furajului administrat într-o concentrație de $3,2-3,84 \cdot 10^9$ UFC/kg furaj probiotice și care permite obținerea unei producții superioare (creșterea sporului mediu zilnic cu 5-40 % față de martor) și biosecurizarea sistemului recirculant de creștere prin stimularea sistemului imun al peștilor.



DESENE EXPLICATIVE

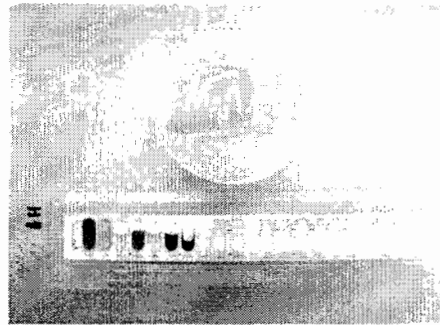


Fig. 1 Aeromonas hydrophila, placa cu Agar nutritiv și galerie API 20NE

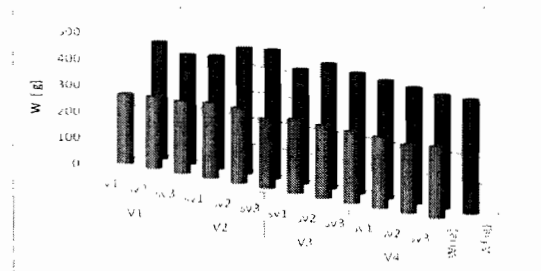


Fig. 2 Dinamica ritmului de creștere în cele patru variante experimentale (12 subvariante).

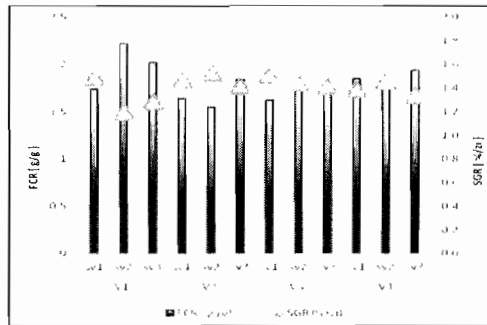


Fig.3. Variația coeficientului de conversie a hranei (FCR) și a ratei creșterii specifice (SGR)

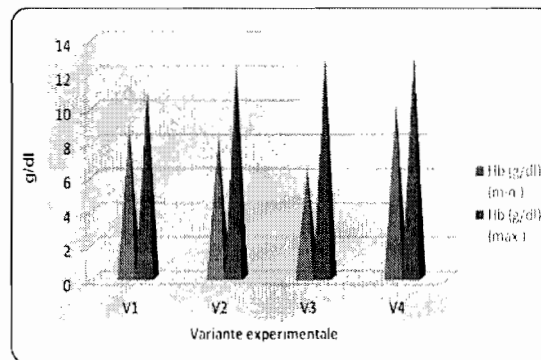


Fig. 4. Evoluția hemoglobinei



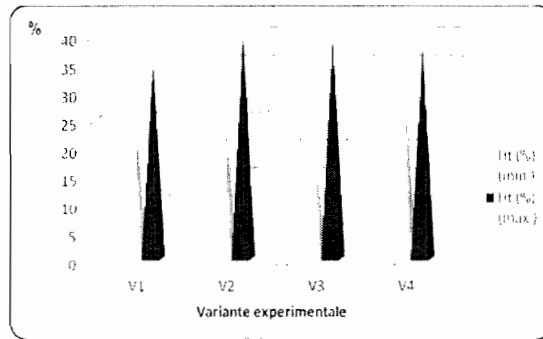


Fig. 5. Evoluția hematocritului

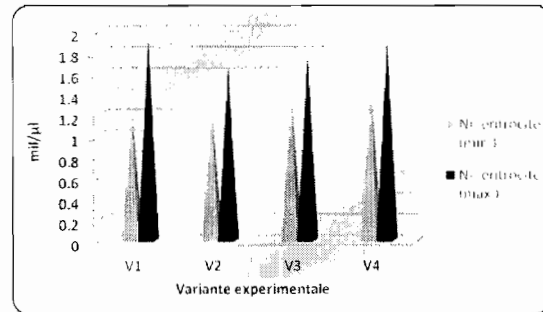


Fig. 6. Evoluția numărului de eritrocite

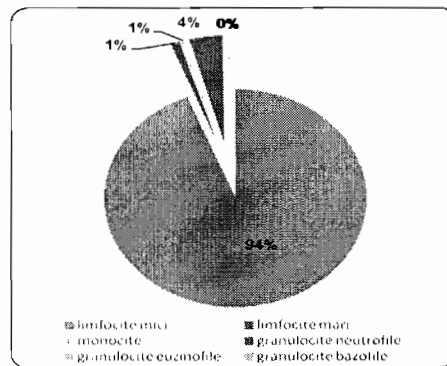


Fig.7 Leucograma în varianta de control

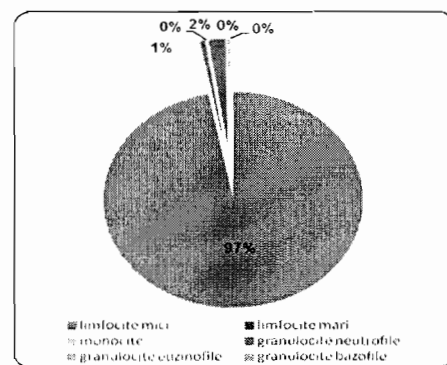


Fig. 8. Leucograma în varianta cu BioPlus

