



Urząd Patentowy  
Rzeczypospolitej Polskiej

(21) Numer zgłoszenia: **416205**

(22) Data zgłoszenia: **19.02.2016**

(51) Int.Cl.

**C12N 1/20 (2006.01)**

**C12R 1/01 (2006.01)**

**A61K 35/741 (2015.01)**

**A61K 35/744 (2015.01)**

**A23K 10/18 (2016.01)**

(54) **Nowe szczepy bakterii probiotycznych do zwalczania Escherichia coli  
i Clostridium perfringens u ptaków hodowlanych, zwłaszcza u drobiu,  
kompozycje szczepów bakterii probiotycznych i ich zastosowania**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

**28.08.2017 BUP 18/17**

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

**31.12.2019 WUP 12/19**

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIWERSYTET PRZYRODNICZY  
W POZNANIU, Poznań, PL  
INSTYTUT WŁÓKIEN NATURALNYCH  
I ROŚLIN ZIELARSKICH, Poznań, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**ANNA SIP, Poznań, PL  
WŁODZIMIERZ GRAJEK, Poznań, PL  
KATARZYNA GRAJEK, Poznań, PL  
JOANNA FOKSOWICZ-FLACZYK, Chyby, PL**

(74) Pełnomocnik:

**rzecz. pat. Bartłomiej Fijałkowski**

## Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku są nowe szczepy bakterii fermentacji mlekowej do ograniczania rozwoju chorobotwórczych szczepów bakterii *Escherichia coli* i *Clostridium perfringens*, występujących w organizmach ptaków hodowlanych, szczególnie kurcząt rzeźnych, indyków, kaczek, gęsi, perliczek, bażantów, strusiów i ptaków ozdobnych oraz w środowisku ich bytowania. Wynalazek obejmuje także probiotyk i kompozycje szczepów probiotycznych oraz ich zastosowania polegające na podawaniu ptakom opracowanych kompozycji bakterii probiotycznych w celu zabezpieczenia ich organizmu przed chorobotwórczymi bakteriami *E. coli* i *C. perfringens* oraz dezynfekcję powierzchni ich ciał, a także pomieszczeń hodowlanych środkami zawierającymi komórki i/lub metabolity drobnoustrojów nowych szczepów bakterii probiotycznych.

Pod pojęciem probiotyku rozumie się produkt zawierający aktywne formy bakterii probiotycznych, który wpływa korzystnie na zdrowie zwierząt. Pod terminem „korzystny wpływ” rozumie się ograniczenie biegunek i chorób przewodu pokarmowego wywołanych patogennymi mikroorganizmami z gatunków *E. coli* i *C. perfringens*, lepszą ogólną kondycję zwierząt i inne korzystne efekty spożywania probiotyku.

W ostatnich latach obserwuje się wyraźne zainteresowanie biologicznymi metodami zwiększania bezpieczeństwa żywności. Większość chorób bakteryjnych przenoszonych drogą pokarmową ma pochodzenie odzwierzęce. Jednymi z bardziej niebezpieczniejszych patogenów przenoszonych w ten sposób są enterotoksyczne bakterie *Escherichia coli* i *Clostridium perfringens*. Wymienione bakterie stanowią także bezpośrednie zagrożenie w hodowli zwierząt gospodarskich. Zagrożenie to jest szczególnie duże w fermach, w których skoncentrowany jest chów tysięcy zwierząt gospodarskich. Z tego powodu są poszukiwane nowe, skuteczne metody zwalczania patogennych bakterii zarówno na poziomie produkcji pierwotnej, jak i przetwórstwa produktów zwierzęcych.

Przez dziesiątki lat ochronę przed chorobotwórczymi bakteriami spełniały antybiotyki. Dodatkowo były one czynnikiem stymulującym wzrost zwierząt. Masowe stosownie antybiotyków spowodowało jednak pojawienie się antybiotykoopornych szczepów patogennych bakterii, co znacznie osłabiło antybiotykową ochronę zwierząt i ludzi. Doprowadziło to także do wydania zakazu stosowania antybiotyków w żywieniu zwierząt na terenie UE.

Alternatywą do stosowania antybiotyków paszowych stały się w ostatnich latach probiotyki. Pod tym pojęciem rozumie się produkty zawierające mikroorganizmy, które podane w odpowiedniej ilości, wywierają korzystny wpływ na dobrostan zwierząt, którym zostały podane. Pojęcie dobrostanu zwierząt obejmuje wiele zjawisk, jak brak zachorowań, szybszy wzrost zwierzęcia, lepsze wykorzystanie paszy i lepszą ogólną kondycję zwierząt.

W literaturze przedmiotu pojawiło się wiele rozwiązań oferujących preparaty probiotyczne zawierające mikroorganizmy antagonistyczne w stosunku do bakterii chorobotwórczych, w tym chorobotwórczych szczepów *Escherichia coli* i *C. perfringens*. Zdecydowana większość z tych preparatów ma w swoim składzie bakterie fermentacji mlekowej. Należy jednak mocno podkreślić, że nie wszystkie szczepy bakterii fermentacji mlekowej wykazują właściwości antagonistyczne w stosunku do bakterii chorobotwórczych. Cecha ma bowiem charakter szczepozależny. Oznacza to, że tylko nieliczne szczepy należące do danego gatunku wykazują takie właściwości. Aktywność antagonistyczną może być wykryta w wieloetapowej procedurze specjalistycznych badań skринingowych, a następnie musi być potwierdzona w testach żywieniowych na zwierzętach.

Bakterie fermentacji mlekowej występują naturalnie w przewodzie pokarmowym ludzi i zwierząt. Są one uważane za całkowicie bezpieczne i zaliczane do klasy GRAS (ang. generally recognized as safe). Spotkać je także można w paszach dla zwierząt, szczególnie w kiszonkach. Ponadto są one składnikami mikroflory skóry zwierząt oraz występują w środowisku hodowlanym.

Antagonistyczne działanie probiotycznych bakterii fermentacji mlekowej jest najczęściej następstwem konkurencji o substancje pokarmowe oraz hamowania wzrostu lub niszczenia komórek bakterii chorobotwórczych. Może być ono także rezultatem blokowania receptorów dla bakterii chorobotwórczych, a co za tym idzie ograniczania przez nie kolonizacji przewodu pokarmowego. Dodatkowo może być ono skutkiem aglomerowania komórek bakterii probiotycznych z komórkami bakterii patogennych i ich usuwania z przewodu pokarmowego wraz z kałem. Aktywność bakterii fermentacji mlekowej w stosunku do patogenów wynika z produkowania przez nie substancji hamujących lub zabijających bakterie chorobotwórcze, takich jak bakteriocyny, nadtlenuk wodoru, aldehyd octowy, kwasy organiczne i inne metabolity. Aktywność antagonistyczną wykrywa się w testach laboratoryjnych, np. po-

przez naniesienie punktowo bakterii potencjalnie probiotycznych na powierzchnię płytek z pożywką agarową pokrytą komórkami bakterii chorobotwórczych, pełniących rolę mikroorganizmu wskaźnikowego. Pojawienie się po inkubacji, stref przejaśnienia wokół punktu naniesienia testowanych bakterii fermentacji mlekowej świadczy ich aktywności w stosunku do bakterii chorobotwórczych. Im większa jest średnica strefy przejaśnienia, tym silniejsza aktywność antybakteryjna badanego szczepu w stosunku do stosowanej wskaźnikowej bakterii chorobotwórczej.

W praktyce do zwalczania bakterii chorobotwórczych wykorzystywane są preparaty zawierające pojedyncze szczepy bakterii probiotycznych lub ich kompozycje. Stosowanie kompozycji wieloszczepowych lub wielogatunkowych wymaga jednak standaryzacji preparatów probiotycznych.

W ostatnich latach pojawiły się komercyjnie wytwarzane preparaty probiotyczne przeznaczone do ochrony drobiu przed szkodliwym działaniem *E. coli* i *C. perfringens*. W opisie patentowym CN102373172 do zwalczania chorobotwórczych szczepów bakterii *E. coli* u drobiu i świń użyto szczepu *Enterococcus faecium* CGMCC 5058. Mikroorganizm ten stosowano jako dodatek paszowy lub jako samodzielny produkt. Podanie probiotycznych bakterii powodowało ochronę przed patogenami i promocję wzrostu zwierząt. Inny szczep tego samego rodzaju, *Enterococcus faecalis* CCTCC M2014488, wykorzystywany do zwalczania patogennych bakterii *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Pasteurella multocida*, *Listeria monocytogenes* i *Staphylococcus aureus*, opisano w CN104774782. Szczep ten wyizolowano z 20-tygodniowych kurcząt. Wykazano, że cechuje się on opornością na kwasy i sole żółciowe. Może być przy tym wykorzystany jako system ekspresyjny do produkcji heterologicznych białek.

W opisie RU2246537 do zwalczania patogennych bakterii *E. coli*, *Enterobacteria*, *Staphylococcus*, *Citrobacter* i *Aeromonas* zastosowano szczep bakterii *Bacillus subtilis* VKM B-2287. Szczep ten wyizolowano z gleby i wykorzystano do konstrukcji komercyjnego preparatu o nazwie „Subtilis +”. Preparat ten reguluje skład mikroflory jelitowej drobiu i ryb i może być stosowany zarówno w celach leczniczych, jak i w profilaktyce.

W znanym rozwiązaniu MX2014012098 do niszczenia chorobotwórczych bakterii *E. coli* i *Clostridium perfringens* u drobiu, przeżuwaczy, cieląt, świń, koni i ryb wykorzystano probiotyczne szczepy z rodzaju *Bacillus*, a mianowicie *B. majovensis* DSM 25839, *B. amyloliquefaciens* DSM 25840, DSM 27032 i *B. subtilis* DSM 25841, a także ich mutanty. Bakterie te wprowadzano do paszy lub premiksów i podawano zwierzętom.

Inny preparat o podobnym antagonistycznym działaniu wobec enteropatogennych i enterotoksycznych *E. coli* zawierający szczep *Lactobacillus casei* ATCC PTA-3945, opisano w CA2520178. Podano, że może być on stosowany w żywieniu kurcząt, indyków, bażantów, przepiórek i papug, a także dla ssaków i ryb.

W rozwiązaniu znanym z opisu MX2014005754 opisano z kolei preparat probiotyczny dla kurcząt, indyków i kur niosek, zawierający szczep *Lactobacillus* LA51. Preparat ten hamuje rozwój *C. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni* i *Salmonella typhimurium* o 30%. Podawanie go ptakom w ilości  $10^3$ – $10^{10}$  jtk/ptaka dziennie zwiększa przyrosty masy ciała.

Kompozycję szczepów *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium longum*, *Bacillus subtilis* i *B. licheniformis* przedstawioną w opisie CN101368165 zastosowano natomiast do przyspieszenia wzrostu, redukcji zawartości ołowiu w tuszach drobiowych i wołowych oraz polepszenia strawności pasz.

W opisie WO2015160960 (A1) przedstawiono następny probiotyk dla drobiu. Jako aktywnym składnikiem były endospory 17 szczepów *Bacillus* o numerach akcesyjnych z kolekcji NRRL. Probiotyk ten podawano łącznie z enzymami z klasy hydrolaz i z nośnikiem.

Inny probiotyk, znany z opisu CN103636923, zawierający *Bacillus coagulans* dodawano do paszy w ilości 0,15% w celu polepszenia efektów żywieniowych kur niosek. Biomasa komórkową będącą podstawą tego probiotyku pozyskiwano przez hodowlę w podłożu stałym, w skład którego wchodziły otręby ryżowe, mąka sojowa i ekstrakt słodowy.

Do polepszenia efektów żywieniowych zwierząt hodowlanych zaproponowano też kompozycję bakterii *Lactobacillus murinus* DPC6002, *L. pentosus* DPC6004, *L. salivarius* DPC6005 i *Pediococcus pentosaceus* DPC6006. Jak podaje US8603461 kompozycja ta wprowadzana do paszy i podawana zwierzętom w ilości  $3 \times 10^9$  jtk/dobę ma działanie profilaktyczno-lecznicze.

Kolejny bioaktywny szczep *Lactobacillus salivarius* L2 (CCTCC M2014614) odkryty przez chińskich badaczy, został zastosowany do ochrony drobiu przed patogennym szczepem *Escherichia coli* (CN104789497). Ten probiotyczny szczep został wyizolowany z treści jelitowej zdrowej kury. Cecho-

wał się on opornością na ekspozycję 3% soli żółciowych. W opisie KR20090057154 przedstawiono natomiast nowy szczep *Lactobacillus salivarius* CPM-7 (KACC 91332P), wyizolowany z kału kurcząt, wykazujący właściwości antagonistyczne w stosunku do *Escherichia coli*.

W rozwiązaniu ujawnionym w opisie CN104363769 (A) przeciwko biegunkom u drobiu, bydła, trzody i owiec zastosowano probiotyczny szczep *Faecalibacterium prausnitzii*.

Opisy bakterii probiotycznych działających antagonistycznie wobec bakterii *Escherichia coli* można znaleźć także w zgłoszeniach i patentach opublikowanych przez Urząd Patentowy RP. W opisie PL 209987 przedstawiono charakterystykę probiotycznego szczepu *Lactobacillus casei* ŁOCK 0915, zdeponowanego w Kolekcji Czystych Kultur Przemysłowych ŁOCK pod numerem ŁOCK 0915 oraz w Zakładzie Mikrobiologii Molekularnej Narodowego Instytutu Leków pod numerem depozytu 08/01/2012. Szczep ten wykazuje zdolność zwalczania patogennych *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis*, *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes* i *C. jejuni*. Z kolei w opisie PL 209986 (B1) scharakteryzowano inny szczep *L. casei* ŁOCK 0908, który wykazuje aktywność wobec *E. coli* i innych bakterii chorobotwórczych.

W opisie PL 207930 przedstawiono kompozycję szczepów bakterii probiotycznych z rodzaju *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* i *Enterococcus* stosowanych w celu poprawy zdrowia psów i kotów, których jedną z podstawowych cech był antagonizm wobec patogennych bakterii *E. coli*.

Przykłady zwalczania chorobotwórczych *E. coli* i *C. perfringens* przez probiotyczne bakterie opisano także w literaturze naukowej.

Wśród bakterii patogennych największe zagrożenie dla drobiu i zdrowia ludzkiego stanowią *Salmonella*, *Campylobacter jejuni* i *Clostridium perfringens* (Humphrey i in. 2007, Van Immersed i in. 2004). Probiotyki mogą być używane do kontroli rozwoju w/w patogenów i tym samym do normalizacji składu mikroflory jelitowej. Wyniki wielu badań dowiodły, że probiotyczne szczepy *Lactobacillus* redukują liczbę chorobotwórczych bakterii, takich jak: *Salmonella enteritidis*, *C. jejuni*, *Listeria monocytogenes*, enteropatogenne *E. coli*, *Yersinia enterocolitica* i *C. perfringens*. W konsekwencji tego zmniejszają śmiertelność kilkudniowych brojlerów z powodu martwicy jelit (Schneitz i in. 2003). Ważnym czynnikiem wpływającym na skuteczność działania preparatów probiotycznych u drobiu jest sposób i czas ich podania. Wykazano, że probiotyki podawane za pośrednictwem paszy, w porównaniu do aplikowanych wraz wodą, działają lepiej i powodują większe przyrosty masy ciała (Timmerman i in. 2006).

W obszernej pracy Dahiya i in. (2006) omówiono współczesne strategie stosowane w kontroli enteritis wywołanych u brojlerów przez *C. perfringens*. Wśród zalecanych środków wymieniono probiotyki, prebiotyki, kwasy organiczne, enzymy, ekstrakty roślinne przeciwciała z jaj kurzych i bakteriofagi. Pod względem skuteczności działania na czoło wysuwają się probiotyczne bakterie z rodzaju *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus* i drożdże z rodzaju *Saccharomyces*. Pozytywną rolę probiotyków w żywieniu brojlerów podkreślają też Huyghebaert i in. (2011). Najważniejsze aspekty stosowania probiotyków w przemyśle drobiarskim omówił Kabir (2009). Autor ten przedstawił szeroki przegląd literaturowy na temat probiotyków, kryteriów ich selekcji, mechanizmów działania i wykorzystania w żywieniu drobiu, a także omówił korzystny wpływ podawania probiotyków złożonych z bakterii fermentacji mlekowej na redukcję chorobotwórczych bakterii *E. coli* i *C. perfringens*.

W skład żadnego z opisanych w literaturze preparatów probiotycznych nie wchodzi jednak szczepy będące podstawą niniejszego zgłoszenia. Żaden z opisanych w literaturze probiotyków dla drobiu, nie wykazuje też takiej samej aktywności przeciwdrobnoustrojowej i właściwości fizykochemicznych jak opracowana przez nas kompozycja. W związku z tym żaden z dostępnych dotąd probiotyków nie działa w taki sam sposób.

Probiotyczne szczepy są pozyskane na drodze izolacji i wielokierunkowego skriningu w stosunku do wybranych gatunków/szczepów bakterii chorobotwórczych, w tym przypadku wobec chorobotwórczych szczepów *Escherichia coli* i *Clostridium perfringens*. Mimo oferty tego typu probiotyków na rynku ich skuteczność jest dyskusyjna. Przyczyną tego jest duża naturalna zmienność genetyczna bakterii chorobotwórczych i bakterii probiotycznych. Efekt antagonizmu między mikroorganizmami jest zależny od oporności bakterii patogennych na toksyczne dla niego metabolity wytwarzane przez bakterie probiotyczne. Wrażliwość ta jest zmienna. Ponadto po dłuższym stosowaniu probiotyków na danym terenie pojawiają się szczepy odporne na biobójcze czynniki wytwarzane przez dany probiotyk. Istnieje tu pełna analogia do uodparniania się bakterii chorobotwórczych na antybiotyki. Występuje swego rodzaju wyścig biologiczny między patogenami a probiotykami. Oznacza to, że dla ochrony

zwierząt konieczne jest nieustanne poszukiwanie nowych szczepów bakterii probiotycznych wykazujących antagonistyczną aktywność wobec patogenów występujących aktualnie na danym terenie.

Dla pozyskania skutecznych szczepów bakterii probiotycznych konieczne jest prowadzenie skriningu bakterii probiotycznych wobec patogenów występujących w danym momencie na obszarze, na którym ma być przeprowadzana ochrona zwierząt przed tymi patogenami. Idąc za tym tokiem rozumowania przeprowadzono skrining bakterii fermentacji mlekowej wyizolowanych z ferm drobiu w kierunku ich zdolności do zwalczania chorobotwórczych szczepów bakterii *Escherichia coli* i *Clostridium perfringens* występujących na terenie Polski i nieoczekiwanie odkryto nowe szczepy bakterii fermentacji mlekowej zdolne do hamowania wzrostu i niszczenia tych patogenów.

Nowy szczep bakterii fermentacji mlekowej *Enterococcus faecium* eub1D o właściwościach probiotycznych według wynalazku, zdeponowany pod numerem PKM B/00094, charakteryzuje się sekwencją nukleotydową regionu DNA kodującego gen 16S rRNA wskazaną pod pozycją 1 wykazu sekwencji.

Nowy szczep bakterii fermentacji mlekowej *Weissella paramesenteroides* eub2D o właściwościach probiotycznych według wynalazku, zdeponowany pod numerem PKM B/00100, charakteryzuje się sekwencją nukleotydową regionu DNA kodującego gen 16S rRNA wskazaną pod pozycją 2 wykazu sekwencji nukleotydowych.

Nowy szczep bakterii fermentacji mlekowej *Pediococcus acidilactici* eub3D o właściwościach probiotycznych, zdeponowany pod numerem PKM B/00095, charakteryzuje się sekwencją nukleotydową regionu DNA kodującego gen 16S rRNA wskazaną pod pozycją 3 załączonego wykazu sekwencji.

Wymienione szczepy zostały zdeponowane w depozycie patentowym Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów we Wrocławiu.

Korzystnie izolacja bakterii polegała na pobraniu wymazów z dziobów kurcząt oraz próbek kału i ściółki, a następnie namnożeniu zawartych w nich bakterii w pożywce MRS, selektywnie wspomagającej wzrost bakterii fermentacji 30 mlekowej. Z otrzymanych hodowli izolowano następnie pojedyncze komórki, które dały początek kolekcji monokultur izolatów. Następnie przeprowadzono procedurę skringową mającą na celu wyłonienie spośród pozyskanych izolatów tych, które wykazują zdolność niszczenia chorobotwórczych szczepów bakterii *Escherichia coli* i *Clostridium perfringens*.

Korzystnie szczepy chorobotwórczych *E. coli* i *Clostridium perfringens* wyizolowano z kału drobiu hodowanego na terenie Polski.

Procedura skriningu polegała na wysianiu chorobotwórczych szczepów bakterii *E. coli* i *C. perfringens* na odpowiednie dla nich pożywki umieszczone na płytkach Petriego, nałożeniu na nie komórek badanego izolatu bakteryjnego, wspólnej inkubacji a następnie pomiarze średnicy stref zahamowania wzrostu wokół punktu, na który nałożono komórki izolatu. Strefa przejaśnienia oznacza, że komórki badanego izolatu bakterii mlekowych wykazują działanie antagonistyczne wobec patogenu. Izolaty te traktowano jako bakterie potencjalnie probiotyczne, czyli takie, które mogą być zastosowane w ochronie zwierząt przed patogenami, wpływając korzystnie na dobrostan zwierząt. Kolejnym krokiem w badaniach była identyfikacja szczepów, które wykazały silne właściwości antagonistyczne wobec patogennych *E. coli* i *C. perfringens*. Korzystnie identyfikację przynależności gatunkowej izolatów oparto głównie na sekwencjonowaniu genu kodującego 16S rRNA izolatów.

Prebiotyki do zwalczania patogennych szczepów bakterii *Escherichia coli* u ptaków hodowlanych, zwłaszcza drobiu według wynalazku zawiera nowy szczep bakterii *Weissella paramesenteroides* eub2D. Jego postać aplikacyjna zawiera w jednym gramie co najmniej  $10^6$  jtk, korzystnie  $10^9$ – $10^{11}$  jtk.

Kompozycja probiotyczna do zwalczania patogennych szczepów bakterii *Clostridium perfringens* u ptaków hodowlanych, zwłaszcza drobiu według wynalazku zawiera nowy szczep bakterii *Enterococcus faecium* eub1D i/lub nowy szczep bakterii *Weissella paramesenteroides* eub2D i/lub nowy szczep bakterii *Pediococcus acidilactici* eub3D. Postać aplikacyjna kompozycji zawiera w jednym gramie co najmniej  $10^6$  jtk, korzystnie  $10^9$ – $10^{11}$  jtk.

Kompozycja probiotyczna do zwalczania patogennych szczepów bakterii *Escherichia coli* i *Clostridium perfringens* u ptaków hodowlanych, zwłaszcza drobiu według wynalazku zawiera szczepy bakterii *Weissella paramesenteroides* eub2D i *Enterococcus faecium* eub1D i/lub *Pediococcus acidilactici* eub3D. Szczepy wchodzące w jej skład mogą być stosowane jako szczepy alternatywne, wymienne w danej kompozycji w razie ataku wirusowego. Postać aplikacyjna kompozycji zawiera w jednym gramie co najmniej  $10^6$  jtk, korzystnie  $10^9$ – $10^{11}$  jtk.

Zastosowanie kompozycji probiotycznej według wynalazku polega na produkcji preparatu probiotycznego, zawierającego nowe szczepy *Weissella paramesenteroides* eub2D i/lub *Enterococcus*

faecium eub1D i/lub *Pediococcus acidilactici* eub3D i podawaniu go ptakom w celu ograniczania rozwoju chorobotwórczych szczepów bakterii *Escherichia coli* i *Clostridium perfringens* u ptaków hodowlanych, zwłaszcza drobiu. Kompozycja probiotyczna jest podawana ptakom doustnie lub doodbytniczo w ilości co najmniej  $10^8$ – $10^9$  jtk/kg masy ciała zwierzęcia dziennie, korzystnie  $10^8$  jtk/kg masy ciała zwierzęcia dziennie. Korzystnie, kompozycja probiotyczna jest podawana ptakom doustnie razem z paszą i/lub z prefiksami i/lub z dodatkami paszowymi lub w formie specjalnych preparatów bakterierynych.

Zastosowanie kompozycji do produkcji preparatu do dezynfekcji ciał ptaków i miejsca ich przebywania według wynalazku polega na dezynfekcji ciał ptaków i miejsca ich przebywania środkami zawierającymi w swoim składzie kompozycje i/lub ich metabolity. Metabolitami bakterii probiotycznych stosowanymi w celach dezynfekcji są bakteriocyiny i/lub kwasy organiczne i/lub nadtlenuk wodoru i/lub aldehyd octowy i/lub D-aminokwasy i/lub kwasy tłuszczowe i/lub cały płyn pochodzący z bakterii probiotycznych. Korzystnie, kompozycje i/lub metabolity są stosowane w formie zawiesiny komórkowej lub w formie utrwalonej.

Wśród korzystnych cech bakterii probiotycznych wymienia się:

- a) oporność na niskie pH, gwarantująca przejście bakterii przez żołądek do dalszych odcinków przewodu pokarmowego,
- b) oporność na sole żółciowe, gwarantująca przeżycie bakterii w obecności soków trzustkowych,
- c) zdolność adhezji do ścian jelit, zwiększająca czas przebywania bakterii probiotycznych w przewodzie pokarmowych zwierząt.

Aby wykazać oporność na niskie pH zbadano ich przeżywalność w środowisku o pH 2,0. Wykazano, że 2 h inkubację w tych warunkach przeżyły szczepy *Enterococcus faecium* eub1D, *Weissella paramesenteroides* eub2D i *Pediococcus acidilactici* eub3D.

Następnie przeprowadzono test oporności na sole żółciowe, polegający na 4 h inkubacji pozytywnych szczepów w pożywce zawierającej 3% dodatek soli żółciowych. Korzystnie wykazano, że test ten pozytywnie przeszły szczepy *Enterococcus faecium* eub1D, *Weissella paramesenteroides* eub2D i *Pediococcus acidilactici* eub3D.

Zgodnie z wynalazkiem szczepy bakterii probiotycznych, wchodzące w skład kompozycji, mogą być namnażane w pożywkach ciekłych lub półstałych o składzie dostosowanym do wymogów pokarmowych kultur bakterii fermentacji mlekowej. Korzystnie w skład podłoża hodowlanego powinien wejść jeden z mono- lub disacharydów, organiczne źródło azotu zawierające aminokwasy i krótkie peptydy, witaminy i potrzebne sole mineralne. Przykładowo, odpowiednim podłożem do hodowli probiotycznych bakterii fermentacji mlekowej jest handlowa pożywka MRS (bulion DeMan-Rogosa-Sharpe), serwatka podpuszczkowa lub kwasowa, podłoże melasowe. W trakcie hodowli bakterii korzystne jest stabilizowanie pH pożywki do poziomu powyżej 5,0. Hodowlę bakterii wchodzących w skład kompozycji prowadzi się w warunkach beztlenowych lub względnie beztlenowych w temperaturze 30–37°C, korzystnie 35–37°C. Po zakończeniu hodowli korzystnie jest wydzielić komórki z ciekłego podłoża przez wirowanie lub mikrofiltrację i uzyskać w ten sposób koncentrat komórkowy, który następnie może być utrwalany przez zamrożenie lub wysuszenie. W przypadku hodowli bakterii w podłożu półstałym bakterie suszy się lub zamraża z całym podłożem.

Zgodnie z wynalazkiem, na podstawie wyników testów opracowano kompozycje probiotycznych szczepów bakterii fermentacji mlekowej, dobierając grupy drobnoustrojów pod kątem ich pochodzenia. Przykładowo, szczepy wyizolowane z odchodów kurcząt rzeźnych mogą stanowić środek do ochrony drobiu przed patogennymi szczepami *E. coli* i/lub *C. perfringens*. Korzystnie ochrona tych ptaków odnosi się szczególnie do patogennych szczepów *E. coli* i/lub *C. perfringens* występujących na terenie Polski.

Pozyskane szczepy bakterii probiotycznych mogą być wykorzystane jako samodzielne preparaty lub dodatki do pasz stosowanych w żywieniu kurcząt rzeźnych, indyków, bażantów, perliczek, strusi oraz innych ptaków hodowlanych, w tym ozdobnych, a także do dezynfekcji ich ciał i środowiska bytowania.

### Przykłady zastosowania wynalazku

#### Przykład 1. Izolacja i skryning na aktywność antagonistyczną

Z dziobów i skóry zdrowych kurcząt-brojlerów pobrano wymazy, natomiast ze ściółki próbki ich kału. Pobrany materiał zhomogenizowano, a następnie rozcieńczono metodą rozcieńczeń dziesiętnych i posiano na płytki Petriego, które zalano pożywką MRS-agar o składzie (g/l): agar 20,0 ekstrakt drożdżowy – 5,0, ekstrakt mięsny – 10,0, pepton K – 10,0, glukoza – 20,0 cytrynian amonu – 2,0, fosforan dwupotasowy – 2,0, octan sodu – 5,0, siarczan magnezu 0,1, siarczan manganu – 0,05. Płytki

inkubowano w warunkach względnie beztlenowych w temperaturze 35–37°C przez co najmniej 48 godzin. Po inkubacji sterylną eżą pobrano pojedyncze kolonie i wprowadzono do ciekłej pożywki MRS umieszczonej w probówkach szczelnie zamykanych korkiem. Hodowle izolatów prowadzono w temperaturze 35–37°C przez 24h, a następnie wykonano z nich preparaty barwione metodą Grama. Monokultury oznaczono numerami pozwalającymi identyfikować je pod względem pochodzenia i zabezpieczano w ciekłym azocie. Utworzono w ten sposób bank izolatów bakterii fermentacji mlekowej naturalnie bytujących w przewodzie pokarmowym brojlerów.

Izolaty badano dalej w kierunku zdolności oddziaływania na patogenne szczepy bakterii *E. coli* i *C. perfringens*, które wyizolowano samodzielnie z ferm drobiu.

W testach stosowano pięć szczepów *E. coli* wyizolowanych z różnych regionów Polski. Na płytkach Petriego umieszczono podłoże – bulion wzbogacony z dodatkiem 2% glukozy i 1% agaru uprzednio zaszczerpione chorobotwórczymi szczepami *E. coli*. Po jego zestaleniu wprowadzano na nie kolejno po 20pl zawiesiny badanych izolatów bakteryjnych. Aktywność każdego izolatu testowano wobec pięciu różnych szczepów *E. coli*.

Po 24 godzinach inkubacji w temperaturze 35–37°C dokonywano pomiaru średnicy stref przejaśnień wokół miejsc naniesienia zawiesiny izolatów. Na tej podstawie sporządzono ranking izolatów o antagonistycznej aktywności wobec testowanych szczepów. Aktywność w stosunku do wszystkich badanych szczepów *Escherichia coli* wykazał izolat *Weissella paramesenteroides* eub2D. Izolat ten wykorzystano do konstrukcji preparatu probiotycznego.

W analogiczny sposób wykonano test na antagonistyczną aktywność wyizolowanych szczepów wobec patogennych *Clostridium perfringens*. Do testu użyto siedmiu szczepów *C. perfringens*, pozyskanych z różnych regionów Polski. Każdy z izolatów bakterii fermentacji mlekowej testowano wobec wszystkich chorobotwórczych szczepów *C. perfringens*. Bakterie *C. perfringens* hodowano na płytkach Petriego w pożywce RCM-agar (Reinforced Clostridial Medium). W wyniku testu wykazano, że najsilniejszą aktywnością antagonistyczną w stosunku do wszystkich testowanych szczepów *C. perfringens* charakteryzowały się izolaty *Enterococcus faecium* eub1D, *Weissella paramesenteroides* eub2D i *Pediococcus acidilactici* eub3D.

#### **Przykład 2.** Identyfikacja izolatów

W wyniku hodowli wglębnej izolatów wybranych w przykładzie 1, pozyskano biomasę komórkową, z której izolowano bakteryjne DNA. Następnie przeprowadzono sekwencjonowanie regionu DNA kodującego gen 16S rRNA. Otrzymaną sekwencję nukleotydową genu 16S rRNA porównano za pomocą programu BLASTN 2.2.27+ z sekwencjami dostępnymi w bazie National Center of Biotechnology Information (NCBI). Na podstawie analizy porównawczej sekwencji genów 16S rRNA izolatu określono przynależność gatunkową poszczególnych izolatów. Wyniki badań zamieszczono w tabeli 1

Tabela 1. Bakterie probiotyczne wykazujące aktywność przeciw 5 chorobotwórczym szczepom *Escherichia coli* i *Clostridium perfringens*

| Numer izolatu | Pochodzenie izolatu | Przynależność gatunkowa na podstawie sekwencjonowania 16S rRNA | Homologia do wzorca gatunku, % | Numer akcesyjny w depozycie Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów we Wrocławiu |
|---------------|---------------------|----------------------------------------------------------------|--------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| eub1D         | kał                 | <i>Enterococcus faecium</i>                                    | 99                             | B/00094                                                                    |
| eub2D         | kał                 | <i>Weissella paramesenteroides</i>                             | 99                             | B/00100                                                                    |
| eub3D         | kał                 | <i>Pediococcus acidilactici</i>                                | 98                             | B/00095                                                                    |

**Sekwencja 16S rDNA szczepu *Enterococcus faecium* eub1D** wskazana pod pozycją 1 wykazu sekwencji

**Sekwencja 16S rDNA szczepu *Weissella paramesenteroides* eub2D** wskazana pod pozycją 2 wykazu sekwencji

**Sekwencja 16S rDNA szczepu *Pediococcus acidilactici* eub3D** wskazana pod pozycją 3 wykazu sekwencji



**Przykład 3.** Hodowla bakterii

Izolaty bakterii mlekowych wymienione w przykładzie 2 hodowano w ciekłej pożywce o składzie (g/l): ekstrakt drożdżowy – 5,0, ekstrakt mięsny – 8,0, pepton K – 5,0, glukoza – 10,0, cytrynian amonu – 2,0, fosforan dwupotasowy – 2,0, octan sodu – 5,0, siarczan magnezu 0,1, siarczan manganu – 0,05. Hodowle prowadzono metodą okresową w bioreaktorze laboratoryjnym o poj. 30 L. Pożywkę sterylizowano metodą mikrofiltracji membranowej, a następnie zaszczipiano 2% v/v inoculum o stężeniu komórek ok.  $10^9$  jtk/ml. Hodowlę prowadzono w warunkach względnie beztlenowych w temperaturze 37°C, przy pH 6,0, z mieszaniem 100 obr/min. Po upływie 18 godzin hodowlę przerywano i oznaczano liczebność żywych komórek metodą klasycznych posiewów ilościowych. W opisanych warunkach uzyskiwano stężenie komórek powyżej  $2 \times 10^9$  jtk/ml.

**Przykład 4.** Oporność na niskie pH 5

Hodowle szczepów otrzymane w przykładzie 3 odwirowywano, przemywano dwu-krotnie solą fizjologiczną, a następnie zawieszano w 0,01 M buforze fosforanowym o pH 2,0. Stężenie wyjściowe komórek w zawiesinie doprowadzano do poziomu ok.  $10^7$  jtk/ml. Tak przygotowaną zawiesinę inkubowano przez 2 godziny w temp. 37°C. Po inkubacji oznaczano liczebność żywych komórek w zawiesinie. Oznaczenia te wykonywano metodą posiewów ilościowych. Ustalono, że ekspozycję na niskie pH przeżywały wszystkie badane szczepy, na co wskazują wyniki badań zamieszczone w tabeli 2.

Tabela 2. Przeżywalność bakterii probiotycznych w środowisku o niskim pH

| Badany szczep                            | Początkowa liczebność komórek w zawiesinie jtk/ml | Końcowa liczebność komórek w zawiesinie jtk/ml |
|------------------------------------------|---------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| <i>Enterococcus faecium</i> eub1D        | $1,32 \times 10^7$                                | $1,02 \times 10^5$                             |
| <i>Weissella paramesenteroides</i> eub2D | $1,13 \times 10^7$                                | $8,67 \times 10^4$                             |
| <i>Pediococcus acidilactici</i> eub3D    | $1,08 \times 10^7$                                | $1,10 \times 10^5$                             |

**Przykład 5.** Odporność na sole żółciowe

Zawiesiny komórek bakteryjnych otrzymanych w przykładzie 3 umieszczano w podłożu zawierającym 3% soli żółci i inkubowano przez 4 godziny. Jako kryterium oceny wytrzymałości na działanie soli żółciowych przyjęto wyniki oznaczenia liczebności komórek po ekspozycji. Wyniki te przedstawiono w tabeli 3.

Tabela 3. Przeżywalność bakterii probiotycznych w obecności soli żółciowych

| Badany szczep                            | Początkowa liczebność komórek w zawiesinie jtk/ml | Końcowa liczebność komórek w zawiesinie jtk/ml |
|------------------------------------------|---------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| <i>Enterococcus faecium</i> eub1D        | $2,51 \times 10^7$                                | $1,99 \times 10^7$                             |
| <i>Weissella paramesenteroides</i> eub2D | $3,71 \times 10^7$                                | $2,00 \times 10^7$                             |
| <i>Pediococcus acidilactici</i> eub3D    | $2,52 \times 10^7$                                | $1,05 \times 10^6$                             |

**Przykład 6.** Probiotyk o aktywności przeciw *E. coli* oraz eksperymenty na zwierzętach potwierdzające jego działanie profilaktyczne

Szczep *Weissella paramesenteroides* eub2D wykazujący aktywność przeciw patogennym *E. coli* hodowano w bioreaktorze w pożywce MRS, pozbawionej ekstraktu mięsnego. Hodowle prowadzono przez 22 godziny. Następnie płyn pohodowlany odwirowano w wirówce przy 5000 g przez 5 min. Uzyskaną gęstwę komórkową wymieszano z 5% dodatkiem odtłuszczonego mleka w proszku i 8% dodatkiem trehalozy, a następnie wysuszono w suszarni rozpyłowej. W suszu określono liczebność komórek metodą płytkową. Niewielką próbkę wytworzonego preparatu przeznaczono na testy mające potwierdzić jego aktywność antagonistyczną wobec patogennych *E. coli*. W tym celu susz bakteryjny wprowadzono do pożywki MRS na 20 godzin celem ożywienia zawartych w nim komórek,



a następnie zaszczerpiono nim pożywkę MRS w kolbach o poj. 300 ml. Hodowle prowadzono przez 18 godzin w temp. 37°C. Uzyskaną kulturę wykorzystano do przeprowadzenia testu na aktywność antagonistyczną wobec *E. coli*, który przeprowadzono jedną ze znanych metod dyfuzyjnych. Testy dyfuzyjne potwierdziły zdolność badanego szczepu do antagonistycznego działania na patogenne *E. coli*.

Pozostały przygotowany preparat wymieszano z paszą w ilości 100 g/tonę. Paszą tą skarmiano 3 grupy kurcząt rzeźnych rasy Ross 500, każda po 80 ptaków. Doświadczenie prowadzono przez okres 42 dni. Dzienna dawka bakterii probiotycznych podana kurczętom wynosiła  $10^9$  jtk/kg paszy. Próbę kontrolną stanowiła grupa kurcząt, której podawano paszę bez dodatku probiotyków. Zwierzęta były hodowane w pomieszczeniach o niskich standardach higienicznych. Wykazano, że kurczęta należące do grupy skarmianej paszą z dodatkiem kompozycji probiotycznych nie miały biegunk, podczas gdy biegunki były obserwowane w grupie kontrolnej. Ponadto grupa kontrolna miała luźniejszy kał od grupy chronionej probiotykiem, a także obserwowano odparzenia łap u niektórych osobników.

Analogiczny test przeprowadzono z grupami indyków, strusi i gęsi, uzyskując podobne obserwacje, jak u kurcząt.

**Przykład 7.** Kompozycje aktywne wobec *Clostridium perfringens* oraz eksperymenty na zwierzętach potwierdzające ich działanie profilaktyczne

Wykonano eksperymenty potwierdzające aktywność antibakteryjną kompozycji i ich działanie antagonistyczne wobec patogennych szczepów *Clostridium perfringens*. Eksperymenty zostały przeprowadzone w identyczny sposób jak w przykładzie 6. W badaniach stosowano następujące kompozycje probiotyków:

Kompozycja A: *Enterococcus faecium* eub1D + *Weissella paramesenteroides* eub2D (1:1)

Kompozycja B: *Weissella paramesenteroides* eub2D + *Pediococcus acidilactici* eub3D (3:1)

Kompozycja C: *Enterococcus faecium* eub1D + *Weissella paramesenteroides* eub2D + *Pediococcus acidilactici* eub3D (1:2:2)

Wyniki badań potwierdziły aktywność antagonistyczną kompozycji w stosunku do *Clostridium perfringens*, niezależnie od składu tych kompozycji, oraz ich aktywność ochronną w badanych grupach kurcząt.

Analogiczne eksperymenty przeprowadzono na grupach bażantów i perliczek hodowlanych, uzyskując potwierdzenie aktywności przeciwbakteryjnej kompozycji u tych grup ptaków.

**Przykład 8.** Testy oceniające aktywność antagonistyczną i profilaktyczną kompozycji przeznaczonych do zwalczania patogennych *E. coli* i *C. perfringens* jednocześnie

Badania wykonano identycznie jak w przykładzie 6, stosując następujące kompozycje probiotyczne:

Kompozycja A: *Enterococcus faecium* eub1D + *Weissella paramesenteroides* 10 eub2D (1:2)

Kompozycja B: *Pediococcus acidilactici* eub3D + *Weissella paramesenteroides* eub2D (1:5)

Kompozycja C: *Enterococcus faecium* eub1D + *Weissella paramesenteroides* eub2D + *Pediococcus acidilactici* eub3D (1:5:2)

Wyniki badań potwierdziły aktywność antagonistyczną wszystkich kompozycji względem *E. coli* i *C. perfringens* oraz ich działanie ochronne w testach ze zwierzętami.

**Przykład 9.** Dezynfekcja

Przeprowadzono hodowle bakterii probiotycznych *Weissella paramesenteroides* eub2D i *Pediococcus acidilactici* eub3D w oddzielnych bioreaktorach. Jako medium hodowlane stosowano pożywkę MRS zawierającą zwiększoną zawartość glukozy do 25 g/l. Hodowle prowadzono w warunkach bez-tlenowych w temperaturze 30°C przez 20 godzin. Po tym czasie płyn pohodowlany odwirowano w celu usunięcia komórek i zatężano metodą ultrafiltracji membranowej, a następnie przeniesiono go do zbiornika aplikatora aparatu do dezynfekcji i spryskano nim powierzchnie posadzki w kurniku. Preparat stosowano w ilości 20 ml/m<sup>2</sup> i pozostawiano na dezynfekowanych powierzchniach przez 5 minut. Dla porównania część posadzki nie dezynfekowano. Następnie pobrano wymazy z powierzchni dezynfekowanych i kontrolnych i oznaczono na nich pozostałą liczbę żywych komórek *Escherichia* oraz *Clostridium*, postępując zgodnie z normą PN-EN 13697. Stwierdzono, że w stosunku do powierzchni niedezynfekowanej liczebności żywych komórek bakterii *Escherichia* zmniejszyła się o co najmniej  $10^5$ , a *Clostridium* o ponad  $10^6$ .

**Literatura**

- Humphrey T., O'Brien S., Madsen M.: *Campylobacters as zoonotic pathogens: a food production perspective*. *Int. J. Food Microbiol.* 2007, 117, 237–257.
- Van Immerseel F., De Buck J., Pasmans F., Huyghebaert G., Haesebrouck F., Ducatelle R.: *Clostridium perfringens* in poultry: an emerging threat for animal and public health. *Avian Pathol.* 2004, 33, 537–549.
- Schneitz C.: *Competitive exclusion in poultry – 30 years of research*. *Food Control.* 2005, 16, 657–667.
- Timmerman H.M., Veldman A., van den Elsen E., Rombouts F.M., Beynen A.C.: *Mortality and growth performance of broilers given drinking water supplemented with chicken-specific probiotics*. *Poultry Sci.* 2006, 85, 1383–1388.
- Dahiya JP, Wilkie DC, van Kessel AG, Drew MD.: *Potential strategies for controlling necrotic enteritis in broiler chicken in post-antibiotic era*. *Animal Feed Sci. Technol.* 129, 60-88, 2006.
- Huyghebaert G., Ducatelle R., van Immerseel F.: *An update on alternatives to antimicrobial growth promoters for broilers*. *The Veterinary J.*, 187, 182–188, 2011.
- Kabir SML: *The role of probiotics in the poultry industry*. *Int. J. Mol. Sci.* 10, 3531–3546, 2009.

## Wykaz sekwencji nukleotydowych

<110> Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Przyrodniczy, Uniwersytet

<120> Nowe szczepy bakterii probiotycznych do zwalczania *Escherichia coli* i *Clostridium perfringens* u ptaków hodowlanych, zwłaszcza u drobiu, kompozycje szczepów bakterii probiotycznych i ich zastosowania.

<130> P.416205

<160> 3

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1414

<212> DNA

<213> *Enterococcus faecium*

<220>

<221> misc\_feature

<222> (21)..(21)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (33)..(33)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (37)..(37)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (42)..(42)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (60)..(60)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (67)..(67)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (70)..(70)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (72)..(72)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (74)..(74)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (77)..(77)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (96)..(96)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (100)..(100)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (114)..(114)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (122)..(122)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature  
<222> (124)..(124)  
<223> n is a, c, g, or t

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (134)..(134)  
<223> n is a, c, g, or t

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (138)..(138)  
<223> n is a, c, g, or t

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (143)..(143)  
<223> n is a, c, g, or t

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (145)..(145)  
<223> n is a, c, g, or t

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (152)..(152)  
<223> n is a, c, g, or t

<220>  
<221> misc\_feature

<222> (154)..(154)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (165)..(165)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (172)..(172)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (174)..(174)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (177)..(177)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (184)..(184)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (191)..(191)



<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (196)..(196)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (201)..(201)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (209)..(209)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (211)..(211)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (220)..(220)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1287)..(1287)

<223> n is a, c, g, or t

<400> sekwencja 1

tagcggtg gctccaaagg ntacccacc ganttcnggt gntacaaact ctcgtggtgn 60

gacgggnggn gngnacnagg gccgggaacg tattcccgn ggcgtggtga tcncgatta 120

cnancgattc cggnttcntg gangngaatt gnancctgga atccnaactg ananaanctt 180

taanaaatta ncttancctc ncgacttcnc nactcgttgn acttccatt ggagcacgtg 240

ggtagcccag gtcataaggg gatgatgatt tgacgtcatc cccaccttcc tccggttgc 300

accggcagtc ttgctagagt gccaactgaa tgatggcaac taaaataagg gttgcgctcg 360

ttgctggact taaccaaca tctcacgaca cgagctgacg acaacctgc accacctgc 420

actttgeccc cgaaggggaa gctctatctc tagagtggc aaaggatgc aagacctgt 480

aaggttcttc gcgttcttc gaattaaacc acatgtcca ccgcttgtgc gggccccgt 540

caattccttt gagtttcaac cttgcggtcg tactcccca ggccgagtc ttaatgcgtt 600

agctgcagca ctgaaggcg gaaacctcc aacacttagc actcatcgtt tacggcgtgg 660

actaccaggg tatctaatec tgtttgctcc ccacgttcc gagctcagc gtcagttaca 720

gaccagagag ccgccttcgc cactggtgtt cctccatata tctacgcatt tcaccgtac 780

acatggaaat tccactctcc tcttctgcac tcaagtctcc cagtttcaa tgacctccc 840

cggttgagcc gggggcttcc acatcagact taagaaaccg cctgcgctcg ctttacgcc 900

aataaatccg gacaacgctt gccacctacg tattaccgcg gctgctggca cgtagttagc 960

cgtggctttc tggtagata ccgtcaaggg atgaacagtt actctcatcc ttgtttctt 1020

ctaacaacag agttttacga tccgaaaacc ttcttcactc acgcggcggt gctcggtcag 1080

actttcgcc attgccgaag attccctact gctgcctccc gtaggagttt gggccgtgtc 1140

tcagtcccaa tgtggccgat caccctctca ggtcggctat gcatcgtggc cttggtgagc 1200

cgttacctca ccaactagct aatgcaccgc gggccatcc atcagcgaca cccgaaagcg 1260

ccittcaaat caaaaccatg cggtttngat tgttatacgg tattagcacc tgtttccaag 1320

tgttatcccc ttctgatggg caggttaccc acgtgttact caccggttcg ccactectct 1380

tttccggtg gagcaagctc cgggtgaaaa agaa 1414

<210> 2

<211> 1438

<212> DNA

<213> Weissella paramesenteroides

<220>

<221> misc\_feature

<222> (50)..(50)

<223> n is a, c, g, or t

<400> sekwencja 2

|                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------|-----|
| tgacgtcgaa cgctttagtc ttaattgat ctgacgagct tgctctgatn tgattttatc   | 60  |
| tgacaaagag tggcgaacgg gtgagtaaca cgtgggtaac ctacctctta gcaggggata  | 120 |
| acatttgga acaagtgcta ataccgtata ataccaacaa ccgcatgggt gttggttgaa   | 180 |
| agatgggtct gctatcacta agagatggac ccgcggtgca ttagctagtt ggtaaggtaa  | 240 |
| cggcttacca aggcaatgat gcatagccga gttgagagac tgatcggcca caatgggact  | 300 |
| gagacacggc ccatactcct acgggaggca gcagtaggga atcttcaca atgggcgcaa   | 360 |
| gcctgatgga gcaacgccgc gtgtgtgatg aagggttcg gctcgtaaaa cactgttata   | 420 |
| agagaagaac ggcaactgaga gtaactgttc agtgtgtgac ggtatcttac cagaaaggaa | 480 |
| cggctaaata cgtgccagca gccgcggtaa tacgtatgtt ccaagcgta tccggattta   | 540 |
| ttgggcgtaa agcgagcgca gacgggtatt taagtctgaa gtgaaagccc tcagctcaac  | 600 |
| tgaggaatgg ctttggaac tggatgactt gagtgcagta gaggaaagtg gaactccatg   | 660 |
| tgtagcggtg aaatgcgtag atatatggaa gaacaccagt ggcgaaggcg gctttctgga  | 720 |
| ctgtaactga cgtgaggct cgaaagtgtg ggtagcaaac aggattagat accctggtag   | 780 |
| tccacaccgt aaacgatgag tgctagatgt tcgagggttt ccgcccttga gtgtcgcagc  | 840 |
| taacgcatta agcactccgc ctggggagta cgaccgcaag gttgaaactc aaaggaattg  | 900 |

acgggggaccc gcacaagcgg tggagcatgt ggtttaattc gaagcaacgc gaagaacctt 960

accaggtctt gacatccctt gctaactcta gaaataggac gttcccttcg gggacaaggt 1020

gacaggtggt gcatggttgt cgtcagctcg tgcgtgaga tgttgggtta agtcccgcaa 1080

cgagcgcaac ccttattatt agttgccagc attcagttgg gcactctagt gagactgccg 1140

gtgacaaacc ggaggaaggt ggggatgacg tcaaatac atgcccccta tgacctgggc 1200

tacacacgtg ctacaatggc atatacaacg agtcgccaac ccgcgagggt gcgctaattc 1260

cttaaagtat gtctcagttc ggattgtagg ctgcaactcg cctacatgaa gtcggaatcg 1320

ctagtaatcg cggatcagca cgccgcggtg aatacgttc cgggtcttgt acacaccgcc 1380

cgtcacacca tgagagtttg taacacccaa agccggtggg gtaaccttgt aggagcca 1438

<210> 3

<211> 1446

<212> DNA

<213> *Pediococcus acidilactici*

<220>

<221> misc\_feature

<222> (212)..(212)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1413)..(1413)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1416)..(1416)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1418)..(1418)

<223> n is a, c, g, or t

<400> sekwencja 3

tagacggcta gctcctaaag gttacccac cggtttggg tgttacaac tctcatggtg 60

tgacggggcg tgtgtacaag gcccggaac gtattaccg cggcatgctg atccgcgatt 120

actagcgatt ccgactcgt gtaggcgagt tgcagcctac agtcgaact gagaatggtt 180

ttaagagatt agctaaacct cgcggttgc cnaactcgtg taccatccat ttagcacgt 240

gtgtagccca ggtcataagg ggcattgatg ttgacgtcg tccccacctt cctccggtt 300

gtcaccggca gtctcactag agtgcccaac tgaatgctgg caactagtaa taagggttgc 360

gctcgttgcg ggacttaacc caacatctca cgacacgagc tgacgacaac catgcaccac 420

ctgtcattct gtccccgaag ggaacgccta atctcttagg ttggcagaag atgtcaagac 480

ctggttaaggt tcttcgcgta gcttcgaatt aaaccacatg ctccaccgct tgtgcgggcc 540  
 cccgtcaatt cttttgagtt tcaacctgc ggtcgtactc cccagggcg attacttaatt 600  
 gcgttagctg cagcactgaa gggcggaaac cctccaacac ttagtaatca tcgtttacgg 660  
 catggactac cagggtatct aatcctgttc gctacccatg ctttcgagcc tcagcgtcag 720  
 ttacagacca gacagccgcc ttcgccactg gtgttcttc atatatctac gcatttcacc 780  
 gctacacatg gagttccact gtcctcttct gactcaagt ctcccagttt ccaatgcact 840  
 tcttcggttg agccgaaggc ttacacatta gacttaaaag accgcctgcg ctgcgtttac 900  
 gccaataaa tccggataac gcttgcacc tacgtattac cgcggctgct ggcacgtagt 960  
 tagccgtggc ttctgggta aataccgtca ctgggtgaac agttactctc acccagttc 1020  
 ttcttaaca acagagcttt acgagccgaa acccttctc actcacgcgg cgttgctcca 1080  
 tcagactgc gtccattgtg gaagattccc tactgctgcc tcccgtagga gtctgggccg 1140  
 tgtctcagtc ccaatgtggc cgattaccct ctccagtcgg ctacgcatca tcgccttgg 1200  
 gagccgttac ctaccaact agetaatgcg ccgcgggtcc atccagaagt gatagcagag 1260  
 ccatctttta aaagaaaacc aggcgggttt ctctgtata cggatttagc atctgtttcc 1320  
 aggtgttatc ccctgcttct gggcaggtta cccacgtgtt actcacctc cgcacctca 1380  
 ctctgtgta aaatctcatt cagtgaagc acntcnat caattaacgg aagttcgtcg 1440  
 actgca 1446

## Zastrzeżenia patentowe

1. Nowy szczep bakterii fermentacji mlekowej *Enterococcus faecium* eub1D o właściwościach probiotycznych, zdeponowany pod numerem PKM B/00094, o sekwencji nukleotydowej regionu DNA kodującego gen 16S rRNA wskazanej pod pozycją 1 wykazu sekwencji.
2. Nowy szczep bakterii fermentacji mlekowej o właściwościach probiotycznych *Weissella paramesenteroides* eub2D, zdeponowany pod numerem PKM B/00100, o sekwencji nukleotydowej regionu DNA kodującego gen 16S rRNA wskazanej pod pozycją 2 wykazu sekwencji.
3. Nowy szczep bakterii fermentacji mlekowej o właściwościach probiotycznych *Pediococcus acidilactici* eub3D, zdeponowany pod numerem PKM B/00095, o sekwencji nukleotydowej regionu DNA kodującego gen 16S rRNA wskazanej pod pozycją 3 wykazu sekwencji.
4. Prebiotyki do zwalczania patogennych szczepów bakterii *Escherichia coli* u ptaków hodowlanych, zwłaszcza drobiu, znamienny tym, że w jego skład wchodzi nowy szczep bakterii *Weissella paramesenteroides* eub2D jak określono w zastrz. 2.
5. Prebiotyk według zastrz. 4, **znamienny tym**, że jego postać aplikacyjna zawiera w jednym gramie co najmniej  $10^6$  jtk, korzystnie  $10^9$ – $10^{11}$  jtk.
6. Kompozycja probiotyczna do zwalczania patogennych szczepów bakterii *Clostridium perfringens* u ptaków hodowlanych, zwłaszcza drobiu, **znamienna tym**, że zawiera nowy szczep bakterii *Enterococcus faecium* eub1D jak określono w zastrz. 1 i/lub nowy szczep bakterii *Weissella paramesenteroides* eub2D jak określono w zastrz. 2 i/lub nowy szczep bakterii *Pediococcus acidilactici* eub3 D jak określono w zastrz. 3.
7. Kompozycja probiotyczna do zwalczania patogennych szczepów bakterii *Escherichia coli* i *Clostridium perfringens* u ptaków hodowlanych, zwłaszcza drobiu, **znamienna tym**, że zawiera szczepy bakterii *Weissella paramesenteroides* eub2D jak określono w zastrz. 2 i *Enterococcus faecium* eub1D jak określono w zastrz. 1 i/lub *Pediococcus acidilactici* eub3D jak określono w zastrz. 3.
8. Kompozycja według zastrz. 7, **znamienna tym**, że szczepy wchodzące w jej skład mogą być stosowane jako szczepy alternatywne, wymienialne w danej kompozycji w razie ataku wirusowego.
9. Kompozycja według zastrz. 7 albo 8, **znamienna tym**, że jej postać aplikacyjna zawiera w jednym gramie co najmniej  $10^6$  jtk, korzystnie  $10^9$ – $10^{11}$  jtk.
10. Zastosowanie kompozycji jak określono w zastrz. 6 albo 7 albo 8 albo 9 do produkcji preparatu probiotycznego w celu ograniczania rozwoju chorobotwórczych szczepów bakterii *Escherichia coli* i *Clostridium perfringens* u ptaków hodowlanych, zwłaszcza drobiu.
11. Zastosowanie według zastrz. 10, **znamiennie tym**, że kompozycja probiotyczna według zastrz. 6 albo 7 albo 8 albo 9 jest podawana ptakom doustnie lub doodbytniczo w ilości co najmniej  $10^8$ – $10^9$  jtk/kg masy ciała zwierzęcia dziennie, korzystnie  $10^8$  jtk/kg masy ciała zwierzęcia dziennie.
12. Zastosowanie według zastrz. 11, **znamiennie tym**, że kompozycja probiotyczna według zastrz. 7 albo 8 albo 9 jest podawana ptakom doustnie razem z paszą i/lub z prefiksami i/lub z dodatkami paszowymi lub w formie specjalnych preparatów bakteryjnych.
13. Zastosowanie kompozycji jak określono w zastrz. 7 albo 8 albo 9 do produkcji preparatu do dezynfekcji ciał ptaków i miejsca ich przebywania, **znamiennie tym**, że ciała ptaków i miejsca ich przebywania dezynfekuje się środkami zawierającymi w swoim składzie kompozycje według zastrz. 6 albo 7 albo 8 albo 9 i/lub ich metabolity.
14. Zastosowanie według zastrz. 13, **znamiennie tym**, że metabolitami bakterii probiotycznych stosowanymi w celach dezynfekcji są bakteriocyny i/lub kwasy organiczne i/lub nadtlenuk wodoru i/lub aldehyd octowy i/lub D-aminokwasy i/lub kwasy tłuszczowe i/lub cały płyn po hodowaniu bakterii probiotycznych.
15. Zastosowanie według zastrz. 13, **znamiennie tym**, że kompozycje i/lub metabolity są stosowane w formie zawiesiny komórkowej lub w formie utrwalonej.



