



(21) Numer zgłoszenia: **416201**

(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)

A61K 35/747 (2015.01)

(54) **Nowe szczepy bakterii probiotycznych do zwalczania Escherichia coli i Clostridium perfringens u zwierząt, zwłaszcza u świń i dzików, 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 probiotycznych bakterii fermentacji mlekowej do ograniczania rozwoju chorobotwórczych szczepów bakterii *Escherichia coli* i *Clostridium perfringens*, występujących w organizmach zwierząt gospodarskich i w środowisku ich bytowania, szczególnie w odniesieniu do młodych osobników trzody chlewnej i dzików. Wynalazek obejmuje także kompozycje nowych szczepów probiotycznych bakterii fermentacji mlekowej oraz zastosowania kompozycji do produkcji preparatu probiotycznego, służącego do ograniczania rozwoju chorobotwórczych szczepów bakterii *Escherichia coli* i *Clostridium perfringens* oraz dezynfekcję powierzchni ciał zwierząt, a także pomieszczeń inwentarskich środkami zawierającymi komórki i/lub metabolity tych kompozycji. Pod pojęciem probiotyku rozumie się produkt zawierający aktywne formy bakterii probiotycznych, który wpływa korzystnie na zdrowie zwierząt. W odniesieniu do wynalazku, pod terminem „korzystny wpływ” rozumie się ograniczenie biegunek i chorób przewodu pokarmowego wywołanych wymienionymi patogennymi mikroorganizmami, redukcję liczebności tych patogennych mikroorganizmów w ciele zwierząt i w miejscu ich bytowania, oraz lepszą ogólną kondycję zwierząt. Termin probiotyk obejmuje preparaty samych komórek bakteryjnych, preparaty komórek bakteryjnych wraz z dodatkami, premiksi i inne dodatki paszowe zawierające probiotyczne bakterie, a także pasze zawierające probiotyczne szczepy.

Wśród najniebezpieczniejszych patogenów wywołujących choroby przewodu pokarmowego trzody chlewnej i dzików wymieniane są chorobotwórcze szczepy bakterii z gatunku *Escherichia coli* oraz *Clostridium perfringens* (Nagy i Fekete 1999, Pejsak i in. 2012). Głównym źródłem zakażenia jest zanieczyszczone miejsce bytowania zwierząt oraz skażona pasza lub woda. Enteropatogenne szczepy *E. coli* wywołują u świń kolibacilozę noworodków, biegunkę u prosiąt po odsadzeniu, kolisepticemię typu coli mastitis, chorobę obrzękową i zakażenia układu moczowego. Z kolei *C. perfringens* typu A wywołuje u prosiąt ssących zapalenie jelit, natomiast *C. perfringens* typu C prowadzi do krwotoczno-martwicowego zapalenia jelit i stanowi dla zwierząt śmiertelne zagrożenie (Songer i Ujzal 2005). Zakażenie zwierząt hodowlanych tymi patogenami jest szczególnie groźne w dużych fermach, w których skoncentrowany jest chów tysięcy zwierząt gospodarskich. Z tego powodu poszukiwane są innowacyjne metody zwalczania patogennych bakterii już na poziomie hodowli zwierząt.

Przez dziesiątki lat ochronę przed patogenami spełniały antybiotyki, pełniące jednocześnie rolę stymulatorów wzrostu zwierząt. Masowe stosowanie antybiotyków spowodowało pojawienie się antybiotykooopornych szczepów patogennych bakterii, co doprowadziło do wydania zakazu stosowania antybiotyków w żywieniu zwierząt na terenie UE.

Alternatywą do stosowania antybiotyków stały się w ostatnich latach probiotyki (Soccol i in. 2010). Pod tym pojęciem rozumie się produkty zawierające bakterie, 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 bakteryjne, zawierające mikroorganizmy antagonistyczne w stosunku do bakterii chorobotwórczych, w tym w stosunku do chorobotwórczych szczepów *Escherichia coli* i *Clostridium perfringens*. Zdecydowana większość z tych preparatów ma w swoim składzie antagonistyczne bakterie fermentacji mlekowej. Należy jednak mocno podkreślić, że nie wszystkie bakterie fermentacji mlekowej wykazują właściwości antagonistyczne w stosunku do bakterii chorobotwórczych. Cecha ta jest szczepozależna. Oznacza to, że większość szczepów należących do danego gatunku nie wykazuje takich właściwości. Aktywność antagonistyczna może być wykryta w wieloetapowej procedurze specjalistycznych badań skринingowych, a następnie potwierdzona doświadczalnie.

Antagonistyczne działanie probiotycznych bakterii fermentacji mlekowej w stosunku do obu patogenów bakteryjnych objawia się hamowaniem wzrostu lub niszczeniem komórek bakterii chorobotwórczych, kolonizacją ścian przewodu pokarmowego zwierząt i tym samym niedopuszczeniem do ich zasiedlenia przez bakterie chorobotwórcze, aglomerowaniem komórek bakterii probiotycznych z komórkami bakterii patogennych i ich usuwaniem z przewodu pokarmowego wraz z kałem oraz konkurencją o substancje pokarmowe. Aktywność hamująca oraz bójcza w stosunku do patogenów wynika z produkowania przez bakterie probiotyczne substancji hamujących lub zabijających bakterie chorobotwórcze, jak bakteriocyny, nadtlenuk wodoru, aldehyd octowy, kwasy organiczne i inne metabolity. Aktywność antagonistyczną wykrywa się w dyfuzyjnych testach laboratoryjnych np. poprzez

naniesienie punktowo bakterii potencjalnie probiotycznych na powierzchnię płytek z pożywką agarową pokrytą komórkami bakterii chorobotwórczych, pełniących rolę mikroorganizmu wskaźnikowego, i inkubacji płytek w temperaturze ok. 30–37°C. Pojawienie się stref przejaśnień, czyli stref zahamowania wzrostu wokół punktu naniesienia testowanych bakterii probiotycznych, wskazuje na aktywność antybakteryjną badanego szczepu-izolatu. Im większa jest średnica strefy przejaśnienia, tym silniejsza aktywność antybakteryjna badanego szczepu w stosunku do stosowanej wskaźnikowej bakterii chorobotwórczej. Test ten ma także wersję, w której stosowane są kultury wgłębne mikroorganizmów hodowanych w pożywkach ciekłych i badana jest wówczas redukcja liczebności komórek bakterii chorobotwórczych w obecności testowanego szczepu bakterii potencjalnie probiotycznej lub jego metabolitów.

W praktyce do zwalczania bakterii chorobotwórczych wykorzystywane są preparaty zawierające pojedyncze gatunki bakterii probiotycznych lub ich kompozycje. Znanych jest szereg rozwiązań opisujących wykorzystanie bakterii probiotycznych do zwalczania *E. coli* i *C. perfringens*. Większość probiotycznych produktów paszowych przeznaczonych dla trzody chlewnej zawiera szczepy z gatunków *Bacillus licheniformis* i *Bacillus subtilis* oraz *Enterococcus faecium*.

Jednym ze znanych rozwiązań jest probiotyczna kompozycja bakterii opisana w zgłoszeniu US2015250833. Obejmuje ona osiem probiotycznych szczepów bakterii mlekowych, zdeponowanych w Hiszpańskiej Kolekcji Kultur Mikroorganizmów pod kodami CECT 8163, CECT 8165, CECT 8164, CECT 8166, CECT 8347, CECT8348, CECT 8348, CECT 8349 i CECT 8350. Bakterie te wykazują antagonistyczną aktywność wobec chorobotwórczych szczepów *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* i *Escherichia coli*. W skład kompozycji podawanej świnom wchodzi co najmniej jeden ze szczepów probiotycznych. Szczepy wchodzące w skład kompozycji wykazują zdolności antagoniistyczne, potwierdzone metodą dyfuzyjną, wykrywającą strefy przejaśnień na powierzchniach pożywek agarowych pokrytych bakteriami wskaźnikowymi. Kompozycje podawane są młodym zwierzętom w formie zliofilizowanej, ciekłej lub wziewnej.

W opisie patentowym KR101335454 do zwalczania patogennych drobnoustrojów u świń zastosowano mieszaninę probiotycznych bakterii obejmujących *Lactobacillus salivarius* KACC91678P, *L. plantarum* KACC91679P, *L. plantarum* KACC91680P i *L. amylovorus* KACC91681P. W kolejnym rozwiązaniu, znanym z opisu KR101047948 zaproponowano podobną mieszaninę bakterii probiotycznych, obejmującą szczepy *Lactobacillus salivarius* JWS58, KACC91357P, *L. plantarum* JWS1354, KACC91358P, *Enterococcus faecium* JWS 833, KACC91359P i *Pediococcus pentosaceus* JWS 939, KACC91360P. W opisie KR101068531 do zwalczania mikroorganizmów chorobotwórczych u świń wykorzystano także bakterie *Enterococcus faecium* KACC91395, *Pediococcus pentosaceus* KACC 91397 i *Lactobacillus* sp. KACC 91396. W rozwiązaniu znanym z opisu CN102373172 do zwalczania bakterii *Salmonella* i *E. coli* u zwierząt gospodarskich użyto szczepu *Enterococcus faecium* CGMCC 5058. W opisie RU2246537 do zwalczania patogennych bakterii *E. coli* zastosowano szczep bakterii *Bacillus subtilis* VKM B-2287, natomiast w rozwiązaniu znanym z opisu EP2836589 do niszczenia chorobotwórczych bakterii *E. coli* i *Clostridium perfringens* 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.

Wśród probiotycznych szczepów wykorzystywanych do zwalczania enteropatogennych i enterotoksycznych bakterii *E. coli* wykorzystywany jest także szczep *L. casei* ATCC PTA-3945, przedstawiony w opisie CA2520178. Z kolei *Lactobacillus johnsonii* D1 15 wykazuje antagonistyczną aktywność wobec wielu gatunków bakterii patogennych, w tym wobec *E. coli* i *Clostridium perfringens*, co przedstawiono w opisie AU2008245685.

Obok wymienionych mikroorganizmów do zwalczania chorobotwórczych szczepów *E. coli* stosuje się także takie szczepy probiotyczne, jak znany z opisu E1S6797266 *Lactobacillus casei* KE01, znane z opisu CN104431560 *Bifidobacterium bifidum* i *Enterococcus faecalis*, oraz znane z opisu US2010047209 *Lactobacillus murinus*, *L. pentosus*, *L. salivarius* i *Pediococcus pentosaceus*. Szczepy te wprowadzane są do przewodu pokarmowego zwierząt z paszą.

Opisy bakterii probiotycznych działających antagonistycznie wobec bakterii *Escherichia coli* można znaleźć także w patentach opublikowanych przez Urząd Patentowy RP. W opisie PL 209 987 przedstawiono charakterystykę probiotycznego szczepu *Lactobacillus casei* ŁOCK 0915, zdeponowanego w Kolekcji Czystych Kultur Przemysłowych ŁOCK pod numerem ŁOCK0915 oraz w Zakładzie Mikrobiologii Molekularnej Narodowego Instytutu Leków pod numerem depozytu 08/01/2012. Szczep

ten wykazuje zdolność do zwalczania patogennych *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis*, *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes* i *C. jejuni*. W opisie PL 209 986 scharakteryzowano inny szczep *L. casei* ŁOCK 0908, który wykazuje aktywność wobec *E. coli* i grupy innych bakterii chorobotwórczych.

Przykłady zwalczania chorobotwórczych *E. coli* przez probiotyczne bakterie opisano także w literaturze naukowej. Vondruskova i in. (2010) przedstawili szerokie badania nad zwalczaniem biegunek u prosiąt z wykorzystaniem bakterii probiotycznych, wskazując na dużą skuteczność probiotyków w zwalczaniu drobnoustrojów chorobotwórczych.

W pracy Hacin in. (2008) pokazano wyniki badań 12 izolatów bakterii fermentacji mlekowej, potwierdzające ich aktywność antybakteryjną wobec patogenów występujących w przewodzie pokarmowym prosiąt. Wykazano, że niektóre z izolatów hamowały wzrost *S. aureus*, *E. coli* i *B. cereus*. Dodatek bakterii probiotycznych do paszy prosiąt odstawionych od mleka matki wpłynął korzystnie na wzrost ich masy, system immunologiczny, głębokość krypt jelitowych oraz w znaczący sposób przyczynił się do spadku śmiertelności w wyniku infekcji *Escherichia coli* (Czarecki-Maulden, 2008).

Najczęściej notowanym efektem stosowania probiotyków jest ograniczenie śmiertelności prosiąt w okresie odsadzeniowym i okołoodsadzeniowym (Modesto i in. 2009, Takahashi i in. 2007). Innym obserwowanym efektem jest zwiększenie liczby korzystnych bakterii i skuteczne łagodzenie biegunek wywołanych przez *E. coli* u odsadzonych prosiąt oraz zwiększenie sił obronnych organizmu poprzez zwiększenie produkcji przeciwciał IgM i IgA przeciwko patogenom jelitowym i regulację produkcji cytokin (Zhang i in. 2010, Scharek i in. 2007). To działanie profilaktyczne w dużej mierze zależy od rodzaju i ilości użytych szczepów bakterii probiotycznych, a także ich dawki, sposobu i okresu podawania prosiątom. Stwierdzono, że podawanie bakterii *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* zaraz po urodzeniu sprzyja kolonizacji korzystnej mikroflory bakterii komensalnych, przez co sztucznie ogranicza zanik błony śluzowej jelit i zaburzenia u wcześniaków noworodków prosiąt, a tym samym zmniejsza częstość i nasilenie martwiczego zapalenia jelit i obniża kolonizację patogennymi łaseczkami *Clostridium perfringens* (Siggers i in. 2008). Preparaty probiotyczne zawierające *Bifidobacterium lactis* i *Lactobacillus rhamnosus* indywidualnie zmniejszają przyczepność bakterii *Salmonella*, *E. coli* i *Clostridium* spp. do błony śluzowej jelit u świń (Lessard i in. 2009). W skład żadnego z opisanych preparatów probiotycznych dla trzody chlewnej nie wchodzi jednocześnie szczepy należące do gatunków *E. faecium*, *L. mesenteroides* oraz *C. divergens*.

Mimo szerokiej oferty probiotyków opisanych w literaturze i dostępnych 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 patogena na toksyczne dla niego metabolity wytwarzane przez bakterie probiotyczne. Wrażliwość ta jest zmienna i po dłuższym stosowaniu probiotyku na danym terenie pojawiają się szczepy patogenów odporne na biobójcze czynniki wytwarzane przez dany probiotyk. Występuje 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 skringingu bakterii probiotycznych wobec patogenów występujących w danym momencie na obszarze, na którym ma być przeprowadzana ochrona zwierząt przed tymi patogenami. Celem wynalazku było opracowanie zestawu nowych szczepów bakterii probiotycznych do kontrolowania i zapobiegania infekcjom zwierząt gospodarskich i dzikich przez chorobotwórcze szczepy *Escherichia coli* i *Clostridium perfringens*.

Nowy szczep bakterii fermentacji mlekowej o właściwościach probiotycznych *Enterococcus faecium* eub1T według wynalazku charakteryzuje się następującą sekwencją nukleotydową regionu DNA kodującego gen 16S rRNA, określającą jego przynależność gatunkową:
sekwencja 1 wykazu sekwencji nukleotydowych

Nowy szczep bakterii fermentacji mlekowej o właściwościach probiotycznych *Leuconostoc mesenteroides* eub2T według wynalazku charakteryzuje się następującą sekwencją nukleotydową regionu DNA kodującego gen 16S rRNA, określającą jego przynależność gatunkową:

Sekwencja 2 wykazu sekwencji nukleotydowych

Nowy szczep bakterii fermentacji mlekowej o właściwościach probiotycznych *Carnobacterium divergens* eub3T według wynalazku charakteryzuje się następującą sekwencją nukleotydową regionu DNA kodującego gen 16S rRNA, określającą jego przynależność gatunkową:

Sekwencja 3 wykazu sekwencji nukleotydowych

Nowy szczep bakterii fermentacji mlekowej o właściwościach probiotycznych *Enterococcus faecium* eub4T według wynalazku charakteryzuje się następującą sekwencją nukleotydową regionu DNA kodującego gen 16S rRNA, określającą jego przynależność gatunkową:

Sekwencja 4 wykazu sekwencji nukleotydowych

Izolacja nowych szczepów bakterii fermentacji mlekowej według wynalazku polegała na wykonaniu wymazów z pysków i skóry prosiąt oraz pobraniu próbek kału i ściółki a następnie na namnożeniu zawartych w nich bakterii w pożywce MRS-agar, selektywnie wspomagającej wzrost bakterii fermentacji mlekowej. Następnie z otrzymanych kolonii wyprowadzono monokultury. W ten sposób uzyskano bank monokultur wyizolowanych ze środowiska zwierząt. Następnie przeprowadzono procedurę skryningową, 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 *C. perfringens*, wobec których testowano izolaty bakterii mlekowych, pozyskano z różnych części od zwierząt zaatakowanych przez enteropatogenne bakterie *E. coli* i *C. perfringens*. Procedura skryningu polegała na wysianiu chorobotwórczych szczepów bakterii *E. coli* i *C. perfringens* na agarowe pożywki umieszczone na płytkach Petriego, następnie nałożeniu punktowo komórek badanego izolatu bakteryjnego, wspólnej inkubacji obu mikroorganizmów (chorobotwórczych i potencjalnie probiotycznych) na płytkach przez okres 18–24 godzin, a następnie obserwacji i pomiarze średnicy przejaśnień wokół punktu, na który nałożono komórki izolatu. Strefa przejaśnienia oznaczała, że komórki badanego izolatu bakterii mlekowych zniszczyły wokół siebie komórki patogenu lub zahamowały jego wzrost, a więc wykazały wobec niego działanie antagonistyczne. 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 przynależności taksonomicznej wyizolowanych szczepów, które wykazały silne właściwości antagonistyczne wobec patogennych *E. coli* i *C. perfringens*. Identyfikację przynależności gatunkowej izolatów oparto głównie na sekwencjonowaniu genu 16S rRNA izolatów. Przynależność gatunkową nowych szczepów bakterii mlekowych *Leuconostoc mesenteroides* eub1T, *Enterococcus faecium* eub2T, *Carnobacterium divergens* eub3T, *Enterococcus faecium* eub4T o właściwościach probiotycznych według wynalazku potwierdzono co najmniej 97% homologią do sekwencji 16S rRNA danego gatunku. Wyizolowane szczepy zostały zdeponowane w depozycie patentowym Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów we Wrocławiu pod numerami akcesyjnymi:

Leuconostoc mesenteroides eub1T = *L. mesenteroides* PKM B/00096

Enterococcus faecium eub2T = *E. faecium* PKM B/00097

Carnobacterium divergens eub3T = *Carnobacterium divergens* PKM B/00099

Enterococcus faecium eub4T = *Enterococcus faecium* PKM B/00098

Pozyskane szczepy bakterii probiotycznych mogą być wykorzystane do ochrony zwierząt gospodarskich i dzikich, jako składniki lub dodatki do pasz stosowanych w żywieniu tych zwierząt, a także do dezynfekcji ich ciał i środowiska bytowania.

Wśród korzystnych cech bakterii probiotycznych wymienia się: oporność na niskie pH, gwarantująca przejście bakterii przez żołądek do dalszych odcinków przewodu pokarmowego; oporność na sole żółciowe, gwarantująca przeżycie bakterii w obecności soków trzustkowych oraz zdolność adhezji do ścian jelit, zwiększająca czas przebywania bakterii probiotycznych w przewodzie pokarmowych zwierząt.

Aby wykazać oporność pozyskanych szczepów na niskie pH zbadano ich przeżywalność w środowisku o pH 2,0. Wykazano, że 2 h inkubację w tych warunkach przeżyły szczepy *Enterococcus faecium* eub1T, *Leuconostoc mesenteroides* eub2T, *Carnobacterium divergens* eub3T, *Enterococcus faecium* eub4T.

Następnie przeprowadzono test oporności na sole żółciowe, polegający na inkubacji pozyskanych szczepów przez 4 h w środowisku zawierającym 3% dodatek soli żółciowych. Korzystnie wykazano, że test ten przeżywały szczepy *Enterococcus faecium* eub1T, *Leuconostoc mesenteroides* eub2T, *Carnobacterium divergens* eub3T i *Enterococcus faecium* eub4T. Wszystkie badane szczepy były zatem odporne na niskie pH i działanie soli kwasów żółciowych (wytrzymały warunki zbliżone do panujących w przewodzie pokarmowym).

Kolejne badania objęły określenie właściwości adhezyjnych bakterii do mucyny świńskiej. Test ten pozytywnie przeszły szczepy *Enterococcus faecium* eub1T, *Leuconostoc mesenteroides* eub2T, *Carnobacterium divergens* eub3T, *Enterococcus faecium* eub4T.

Biomasa komórkowa szczepów bakterii probiotycznych może być otrzymywana w wyniku namnożenia komórek w pożywkach ciekłych lub półstałych o składzie dostosowanym do wymogów 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 z grupy B 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 30–42°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/stałym, w którym aktywność wody wynosi powyżej 0,95, bakterie suszy się lub zamraża z całym podłożem.

Na podstawie wyników testów opracowano preparaty probiotyczne i kompozycje probiotycznych szczepów bakterii fermentacji mlekowej, dobierając grupy drobnoustrojów pod kątem ich pochodzenia odzwierzęcego. Przykładowo, szczepy wyizolowane od świń i dzików mogą stanowić środek do ochrony trzody chlewnej i dzików przed patogennymi szczepami *E. coli* i *C. perfringens*. Korzystnie ochrona tych zwierząt odnosi się szczególnie do patogennych szczepów *E. coli* i *C. perfringens* występujących na terenie Polski.

Preparat probiotyczny do zwalczania patogennych szczepów bakterii *Escherichia coli* u świń i dzików według wynalazku zawiera nowy szczep bakterii *Enterococcus faecium* eub4T.

Preparat probiotyczny do zwalczania patogennych szczepów bakterii *Clostridium perfringens* u świń i dzików według wynalazku zawiera nowe szczepy bakterii *Leuconostoc mesenteroides* eub1T i/lub *Enterococcus faecium* eub2T i/lub *Carnobacterium divergens* eub3T.

Kompozycja probiotyczna do zwalczania patogennych szczepów bakterii *Clostridium perfringens* i *Escherichia coli* u świń i dzików według wynalazku zawiera szczep bakterii lub *Enterococcus faecium* eub4T i *Leuconostoc mesenteroides* eub1T i/lub *Enterococcus faecium* eub2T i/lub *Carnobacterium divergens* eub3T. Szczepy wchodzące w jej skład mogą być stosowane jako szczepy alternatywne, wymienialne w danej kompozycji w razie ataku wirusowego. Korzystnie postać aplikacyjna kompozycji według wynalazku zawiera w jednym gramie co najmniej 10^6 jtk, korzystnie 10^9 – 10^{11} jtk. Kompozycja szczepów probiotycznych według wynalazku, przeznaczona do żywienia zwierząt gospodarskich i dzikich oraz ochrony środowiska bytowania. Opracowane kompozycje bakterii probiotycznych mogą być wykorzystane do produkcji probiotyków stosowanych w żywieniu zwierząt. Wynalazek dotyczy zarówno kompozycji wieloszczepowych, jak i preparatów jednoszczepowych. Korzystnie probiotyk jest podawany zwierzętom w takich ilościach, aby skutecznie zahamować rozwój chorobotwórczych bakterii *E. coli* i/lub *C. perfringens*.

Zastosowanie kompozycji według wynalazku polega na produkcji preparatu probiotycznego, zawierającego szczepy bakterii *Leuconostoc mesenteroides* eub1T i/lub *Enterococcus faecium* eub2T *Carnobacterium divergens* eub3T i/lub *Enterococcus faecium* eub4T w celu ograniczania rozwoju chorobotwórczych szczepów bakterii *Escherichia coli* i *Clostridium perfringens* u świń i dzików. Preparat probiotyczny jest podawany zwierzętom doustnie, wziewnie lub doodbytniczo w ilości co najmniej 10^7 – 10^8 jtk/ kg masy ciała zwierzęcia dziennie, korzystnie 10^8 jtk/kg masy ciała zwierzęcia dziennie. Korzystnie preparat probiotyczny jest podawany zwierzętom doustnie razem z paszą i/lub z prefiksami i/lub z dodatkami paszowymi lub w formie specjalnych preparatów bakteryjnych.

Zastosowanie kompozycji według wynalazku polega dezynfekcji ciał zwierząt i miejsca ich przebywania środkami zawierającymi w swoim składzie kompozycje zawierające szczepy bakterii *Leuconostoc mesenteroides* eub1T i/lub *Enterococcus faecium* eub2T *Carnobacterium divergens* eub3T i/lub *Enterococcus faecium* eub4T i/lub ich metabolity.

Metabolitami bakterii probiotycznych stosowanymi w celach dezynfekcji są bakteriocyny i/lub kwasy organiczne i/lub nadtlenek wodoru i/lub aldehyd octowy i/lub D-aminokwasy i/lub kwasy tłuszczowe i/lub cały płyn pochodzący od bakterii probiotycznych. Korzystnie kompozycje i/lub metabolity są stosowane w formie zawiesiny komórkowej lub w formie utrwalonej.

Przykłady zastosowania wynalazku

Przykład 1. Izolacja i skrining na aktywność antagonistyczną

Z pyska zdrowych prosiąt i młodych dzików, a także ze skóry tych zwierząt wykonano wymazy, natomiast ze ściółki pobrano próbki kału, które w warunkach chłodniczych przywieziono do laboratorium. Po przyjęciu próbek, wykonano zawiesiny w soli fizjologicznej lub zbuforowanej wodzie peptonowej, które następnie rozcieńczono metodą rozcieńczeń dziesiętnych i wysiano na płytki Petriego. Płytki 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. Posiane płytki inkubowano w warunkach beztlenowych lub względnie beztlenowych w temperaturze 35–37°C przez 48–72 godzin. Po inkubacji sterylną eżą pobrano pojedyncze kolonie i wprowadzono je do ciekłej pożywki MRS umieszczonej w probówkach szczelnie zamykanych korkiem. Czystość uzyskanych kultur bakteryjnych oceniano metodą mikroskopową. W ten sposób utworzono bank izolatów w formie monokultur. Izolaty oznaczono numerami, pozwalającymi identyfikować je pod względem źródła izolacji (pochodzenia).

Kolejnym krokiem w postępowaniu był skrining izolatów wobec patogennych bakterii *E. coli*. Patogenne szczepy *E. coli* pozyskano z Państwowego Instytutu Weterynarii z Puław. W testach stosowano 3 szczepy *E. coli* wyizolowane od chorych zwierząt z różnych regionów Polski. Na płytkach Petriego umieszczono podłoże – bulion wzbogacony z dodatkiem 2% glukozy i 1% agaru. Następnie powierzchnie pożywek zasiedlono 3 oddzielnymi chorobotwórczymi szczepami *E. coli*, po czym punktowo wprowadzano na nie kolejno po 20 µl zawiesiny danego izolatu bakteryjnego. W ten sposób każdy izolat testowano wobec 3 różnych szczepów *E. coli*. Po 24 godzinach inkubacji w temperaturze 35–37°C dokonywano pomiaru średnicy stref przejaśnienia wokół miejsc wkroplenia zawiesiny izolatów. Na tej podstawie zestawiano ranking izolatów wg antagoni stycznej aktywności wobec testowanego patogenu. Aktywność przeciw wszystkim *Escherichia coli* stosowanym w testach wykazał izolat *Enterococcus faecium* eub4T. Izolat ten wykorzystano do konstrukcji preparatu probiotycznego. W analogiczny sposób wykonano test na antagoni styczną aktywność izolatów wobec patogennych szczepów *Clostridium perfringens*. Do testu użyto 4 szczepów *C. perfringens*, pozyskanych z różnych regionów Polski. Każdy z izolatów bakterii fermentacji mlekowej był testowany wobec wszystkich 4 chorobotwórczych szczepów *C. perfringens*. Bakterie *C. perfringens* hodowano na płytkach Petriego na pożywce RCM-agar (Reinforced Clostridial Medium).

W wyniku testu wykazano, że największą aktywność antagonistyczną w stosunku do *C. perfringens* wykazywały szczepy: *Leuconostoc mesenteroides* eub1T, *Enterococcus faecium* eub2T, *Carnobacterium divergens* eub3T.

Przykład 2. Identyfikacja izolatów

W wyniku hodowli w głębiej 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 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
eub1T	wymaz z pyska	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	99	B/00096
eub2T	odchody	<i>Enterococcus faecium</i>	99	B/00097
eub3T	ściółka	<i>Carnobacterium divergens</i>	99	B/00099
eub4T	wymaz z pyska	<i>Enterococcus faecium</i>	99	B/00098

Sekwencja nr 1 16S rDNA szczepu *Leuconostoc mesenteroides* eub1T według wykazu sekwencji nukleotydowych

Sekwencja nr 2 16S rDNA szczepu *Enterococcus faecium* eub2T według wykazu sekwencji nukleotydowych

Sekwencja nr 3 16S rDNA szczepu *Carnobacterium divergens* eub3T według wykazu sekwencji nukleotydowych

Sekwencja nr 4 16S rDNA szczepu *Enterococcus faecium* eub4T według wykazu sekwencji nukleotydowych

Przykład 3. Hodowla wyizolowanych potencjalnie probiotycznych bakterii

Izolaty bakterii mlekowych wymienione w przykładzie 2 hodowano w ciekłej pożywce o składzie (g/l): ekstrakt drożdżowy – 5,0, ekstrakt mięsny – 10,0, pepton K – 10,0, glukoza – 5,0, laktoza – 5,0, sacharoza – 5,0, 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. 5 L. Pożywkę wraz z bioreaktorem sterylizowano termicznie w autoklawie i po schłodzeniu do 35°C zaszczipiano 5% v/v inoculum, które stanowiła zawiesina komórek izolatów o gęstości 10^8 jtk/ml. Hodowlę prowadzono w warunkach beztlenowych w temperaturze 37°C, przy pH 6,2, przy mieszaniu pożywki z szybkością 100 obr/min. Po upływie 24 godzin hodowlę przerywano i oznaczano finalną gęstość komórek metodą płytkową. Stwierdzono, że w wyniku hodowli w opisanych warunkach końcowa gęstość populacji komórek każdego z izolatów wynosiła powyżej 10^9 jtk/ml.

Przykład 4. Oporność na niskie pH

Hodowle szczepów otrzymane w przykładzie 3 odwirowywano, przemywano dwukrotnie PBS-em o pH 7,2, a następnie zawieszano w PBS-ie o pH 2,0. Stężenie wyjściowe komórek w zawiesinie doprowadzono do poziomu ok. 10^7 jtk/ml. Tak przygotowaną zawiesinę inkubowano przez 2 godziny w temp. 37°C. Po inkubacji oznaczano liczebność żywych komórek pozostałych w zawiesinie.

Ustalono, że ekspozycję na niskie pH dobrze 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>Leuconostoc mesenteroides</i> eub1T	$3,22 \times 10^7$	$2,02 \times 10^5$
<i>Enterococcus faecium</i> eub2T	$2,08 \times 10^7$	$6,67 \times 10^6$
<i>Carnobacterium divergens</i> eub3T	$1,38 \times 10^7$	$5,89 \times 10^5$
<i>Enterococcus faecium</i> eub4T	$2,02 \times 10^7$	$1,81 \times 10^4$

Przykład 5. Oporność na sole żółciowe

Hodowle szczepów otrzymane w przykładzie 3 odwirowywano, przemywano dwukrotnie jałową solą fizjologiczną, a następnie zawieszano w 3% (w/v) roztworze soli żółciowych, wyjałowionych na zimno za pomocą filtrów membranowych Millex GV (Millipore). Zawiesinę o stężeniu komórek ok. 10^7 jtk/ml inkubowano przez 4 godziny w temp. 37°C. 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>Leuconostoc mesenteroides</i> eub1T	$2,97 \times 10^7$	$2,11 \times 10^5$
<i>Enterococcus faecium</i> eub2T	$1,84 \times 10^7$	$2,39 \times 10^7$
<i>Carnobacterium divergens</i> eub3T	$1,44 \times 10^7$	$7,44 \times 10^5$
<i>Enterococcus faecium</i> eub4T	$1,68 \times 10^7$	$1,79 \times 10^7$

Przykład 6. Właściwości adhezyjne

Na płytce Petriego umieszczano roztwór mucyny bydlęcej i pozostawiano na noc. Następnie na warstwę mucyny nanoszono zawiesinę komórek bakteryjnych otrzymanych w przykładzie 3 i prowadzono inkubację w temperaturze 37°C przez okres 1 godziny. Po tym czasie zawiesinę komórek zlewano i splukiwano powierzchnię mucyny, usuwając komórki które nie przyczepiły się do mucyny. Po oznaczeniu ich liczebności metodą płytkową, obliczano procent komórek, które trwale przyczepiły się do mucyny. Wyniki badań przedstawiono w tabeli 4.

Tabela 4
Zdolności adhezyjne probiotycznych bakterii po godzinnej ekspozycji wobec mucyny

Badany szczep	Stopień adhezji, % populacji wyjściowej
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> eub1T	34,6
<i>Enterococcus faecium</i> eub2T	39,4
<i>Carnobacterium divergens</i> eub3T	35,3
<i>Enterococcus faecium</i> eub4T	33,2

Przykład 7. Probiotyk o aktywności przeciw *E. coli* oraz eksperymenty na zwierzętach potwierdzające jego działanie profilaktyczne

Izolat *Enterococcus faecium* eub4T wykazujący aktywność przeciw patogennym *E. coli* hodowano w bioreaktorze w pożywce MRS o zwiększonej ilości glukozy do 5% s.m. Hodowle prowadzono 18 godzin. Następnie płyn pohodowlany odwirowano w wirówce przy 4000 g przez 10 min. Uzyskaną gęstwę komórkową wymieszano z 10% dodatkiem inuliny i wysuszono w liofilizatorze. W suszu określono zawartość 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 12 godzin celem ożywienia zawartych w nim komórek, a następnie zaszczerpiono nim pożywkę MRS w kolbach Erlemeyera. Hodowle prowadzono przez 20 godzin w temp. 35°C. Uzyskaną kulturę wykorzystano do przeprowadzenia testu na aktywność antagonistyczną wobec *E. coli*, który przeprowadzono jedną ze znanych metod dyfuzyjnych. Testy dyfuzyjne potwierdził zdolność preparatu do antagonistycznego działania na patogeniczne *E. coli*.

Pozostały przygotowany preparat wymieszano z paszą dla prosiąt w ilości 0,2 kg/tonę paszy. Paszą tą skarmiano trzy grupy prosiąt, każda po 12 zwierząt przez okres 28 dni. Dzienna dawka bakterii probiotycznych podana zwierzęciu wynosiła 10^7 – 10^8 jtk/kg masy ciała. Próbę kontrolną stanowiła grupa zwierząt, której podawano paszę bez dodatku probiotyków. Zwierzęta były hodowane w pomieszczeniach o niskich standardach higienicznych. Wykazano, że zwierzęta należące do grupy karmionej paszami z dodatkiem kompozycji probiotycznych nie miały biegunek, podczas gdy biegunki były obserwowane w grupie kontrolnej. Ponadto grupa kontrolna miała luźniejszy kał od grupy chronionej probiotykiem.

Przykład 8. Kompozycje aktywne wobec *Clostridium perfringens* oraz eksperymenty na zwierzętach potwierdzające ich działanie profilaktyczne

Wykonano eksperymenty potwierdzające aktywność antybakteryjną kompozycji i ich działanie antagonistyczne wobec patogennych szczepów *Clostridium perfringens*. Eksperymenty zostały przeprowadzone w identyczny sposób jak w przykładzie 7. W badaniach stosowano następujące kompozycje probiotyków:

Kompozycja A: *Leuconostoc mesenteroides* eub1T i *Enterococcus faecium* eub2T (1:10)

Kompozycja B: *Carnobacterium divergens* eub3T i *Enterococcus faecium* eub2T (1:5)

Kompozycja C: *Leuconostoc mesenteroides* eub1T i *Enterococcus faecium* eub2T, *Carnobacterium divergens* eub3T, (3:3:1)

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

Przykład 9. Testy oceniające aktywność antagonistyczną i profilaktyczną kompozycji przeznaczonych do zwalczania patogennych *E. coli* i *C. perfringens* jednocześnie

Badania wykonano identycznie jak w przykładzie 7, stosując następujące kompozycje probiotyczne:

Kompozycja A: *Enterococcus faecium* eub4T + *Enterococcus faecium* eub2T + *Leuconostoc mesenteroides* eub 1T (2:1:1)

Kompozycja B: *Enterococcus faecium* eub4T + *Carnobacterium divergens* eub3T (10:1)

Kompozycja C: *Enterococcus faecium* eub4T + *Leuconostoc mesenteroides* eub1T + *Carnobacterium divergens* eub3T + *Enterococcus faecium* eub2T (2:1:1:5)

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

Przykład 10. Dezynfekcja

Przeprowadzono hodowle bakterii probiotycznych *Enterococcus faecium* eub4T oraz bakterii *Leuconostoc mesenteroides* eub1T w oddzielnych bioreaktorach. Jako medium hodowlane stosowano pożywkę MRS zawierającą zwiększoną zawartość glukozy do 40 g/l. Hodowle prowadzono w warunkach beztlenowych w temperaturze 32–35°C przez 16 godzin. Po tym czasie płyn pochodzący poddano mikrofiltracji membranowej w celu usunięcia komórek, a następnie przeniesiono go do zbiornika aplikatora aparatu do dezynfekcji i spryskano nim powierzchnie posadzki w chlewni i w oborze. Preparat stosowano w ilości 30 ml/m² i pozostawiano na dezynfekowanych powierzchniach przez 15 minut. Dla porównania część posadzki nie dezynfekowano. Następnie pobrano wymazy z powierzchni dezynfekowanych i kontrolnych i oznaczono na nich liczbę żywych komórek bakterii z rodzaju *Escherichia* oraz *Clostridium*, postępując zgodnie z normą PN-EN 13697. Stwierdzono, że w stosunku do powierzchni niedezynfekowanej liczebności komórek bakterii *Escherichia* na powierzchniach dezynfekowanych zmniejszyła się w chlewni o 6,4 rzędy wielkości, a w oborze 5,8 rzędy wielkości, a w odniesieniu do *Clostridium* w chlewni zmniejszyła się o 7 rzędów wielkości, a w oborze o 6,9 rzędów wielkości.

Literatura

- Songer JG, Uzal FA: Clostridial enteric infections in pigs. *J. Vet. Diagn. Invest.* 17, 528–536, 2005.
- Pejsak Z., Truszczyński M., Porowski M.: Znaczenie beztlenowców z rodzaju *Clostridium* w wywoływaniu chorób świń. Część I. *C. perfringens* typu C i A. *Życie Weterynaryjne* 87(6), 459–463, 2012.
- Nagy B., Fekete P.Z.: Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in farm animals. *Vet. Res.* 30, 259–284, 1999.
- Vondruskova H., Slamova R., Trckova M., Zraly Z., Pavlik I.: Alternatives to antibiotic growth promoters in prevention of diarrhea in weaned piglets: a review. *Vet. Med.* 55, 199–224, 2010.
- Soccol CR, Porto de Souza Vendenbergh L, Spier MR, Medeiros ABP., Yamagushi CT, De Dea Lidner J., Pandey A, Thomaz-Soccol V.: The potential of probiotics: a review. *Food Technol. Biotechnol.* 48, 413–434, 2010.
- Hacin B., Rogelj I., Matijasic B.B.: *Lactobacillus* isolates from weaned piglet mucosa with inhibitory activity against common porcine pathogens. *Folia Microbiol.* 53, 569–576, 2008.
- Czarnecki-Maulden G.L., 2008: Effect of dietary modulation of intestinal microbiota on reproduction and early growth. *Theriogenology* 70, 286–290, 2008. Modesto M., D'Aimmo M.R., Stefanini I., Trevisi P., De Filippi S., Casini L., Mazzoni M., Bosi P., Biavati B.: A novel strategy to select *Bifidobacterium* strains and probiotics as natural growth promoters in newly weaned pigs. *Livest Sci.* 2009, 122, 248–258.
- Takahashi S., Egawa Y., Simojo N., Tsukahara T., Ushida K.: Oral administration of *Lactobacillus plantarum* strain Lq80 to weaning piglets stimulates the growth of indigenous lactobacilli to modify the lactobacillal population. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 2007, 53, 325–332.
- Zhang L., Xu J.Q., Liu H-L., Lai T., Ma J-L., Wang J-F., Zhu Y-H.: Evaluation of *Lactobacillus rhamnosus* GG using an *Escherichia coli* K88 model of piglet diarrhoea: effects on diarrhoea incidence, faecal microflora and immune responses. *Vet. Microbiol.* 2010, 141, 142–148. 36.
- Scharek L., Altherr B.J., Tolke C., Schmidt M.F.: Influence of the probiotic *Bacillus cereus* var. *toyoi* on the intestinal immunity of piglets. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2007, 120, 136–147.
- Siggers R.H., Siggers J., Boye M., Thyman T., Mølbak L., Leser T., Jensen B.B., Sangild P.T.: Early administration of probiotics alters bacterial colonization and limits diet-induced gut dysfunction and severity of necrotizing enterocolitis in preterm pigs. *J. Nutr.* 2008, 138, 1437–1444.
- Lessard M., Dupuis M., Gagnon N., Nadeau É., Matte J.J., Goulet J., Fairbrother J.M.: Administration of *Pediococcus acidilactici* or *Saccharomyces cerevisiae* boulardii modulates development of porcine mucosal immunity and reduces intestinal bacterial translocation after *Escherichia coli* challenge. *J. Anim. Sci.* 2009, 87, 922–934.

Wykaz sekwencji nukleotydowych

<110> w Poznaniu, Uniwersytet Przyrodniczy

<120> Nowe szczepy bakterii probiotycznych do zwalczania *Escherichia coli* i *Clostridium perfringens* u zwierząt, zwłaszcza u świń i dzików, kompozycje szczepów bakterii probiotycznych i ich zastosowania.

<130> P.416201

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1421

<212> DNA

<213> *Enterococcus faecium*

<220>

<221> misc_feature

<222> (1318)..(1318)

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

<220>

<221> misc_feature

<222> (1416)..(1416)

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

<400> sekwencja 1

ggctcctcc taaaggtag gccaccggt ttggcatta caaactcca tgggtgacg 60

ggcgggtgt acaagaccg ggaacgtatt caccgaggc tgctgatccg cgattactag 120

cgattccgac ttcatgtagt cgagttgag actacaatcc gaactgagac gtactttaag 180

agattagctc accctcggg gttggcaact cgttgatac gccatttag cacgtgtgta 240

gcccaggta taaggggcat gatgatctga cgtcgtccc gccttcctcc ggtttgtcac 300

cggcagtctc gctagagtgc ccatctgaat gctggcaact acaataagg gttgcgctcg 360

ttgcgggact taaccaaca tctcacgaca cgagctgacg acgaccatgc accacgtgc 420

actttgtctc cgaagagaac acttctatct ctaaagctt caaaggatgt caagacctgg 480

taaggttctt cgcgttgctt cgaattaaac cacatgctcc accgcttggt cgggtccccg 540

tcaattcctt tgagttcaa ccttgcggtc gtactccca ggcggaacac ttaatgcgtt 600

agcttcggca ctaagaggcg gaaacctct aacacctagt gttcatcgtt tacggtgtgg 660

actaccaggg tatctaattc tgtttgctac ccacacttc gagcctcaac gtcagttgca 720

gtccagtaag cgccttcgc cactgggtt cttccatata tctacgatt ccaccgctac 780

acatggagtt ccacttacct ctactgcact caagttaacc agtttccaat gccattccgg 840

agttgagctc cgggcttca catcagactt aataaacctg ctgctgctgc ttacgcca 900

ataaatccgg ataacgctg ggacatacgt attaccgcg ctgctggcac gtatttagcc 960

gtcccttct ggtatggtac cgtcaaaacta aaatcattc ctattctagc tgttctccc 1020

atacaacagt gctttacgac ccgaaagcct tcatcacaca cgcggcgttg ctccatcagg 1080

cttcgcca ttgtggaaga ttcctactg cagcctccg taggagttg ggccgtgtct 1140

cagtccaat gtggccgatc agtctctcaa ctcggctatg catcattgtc ttgtaggcc 1200

ttacccac caactaacta atgcaccgag gatccatctc taggtgacgc cgaagcct 1260

tttaacttg tgtcatgca cactaagttt tattcggtat tagcatctgt ttcaaangt 1320

tatcccagc cttgaggcag gttgtccag tgttactcac ccgttcgcca ctacttgaa 1380

aggtgcaagc accttcgct gtgcgttca ctgcantata g 1421

<210> 2

<211> 1431

<212> DNA

<213> Leuconostoc mesenteroides

<220>

<221> misc_feature

<222> (1382)..(1382)

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

<400> sekwencja 2

tagggcgctg gctcaaaagg ttacctcacc gacttcgggt gttacaaact ctcgtggtgt 60

gacgggcggt gtgtacaagg cccgggaacg tattcaccgc ggcgtgctga tccgcgatta 120

ctagcgattc cggcttcag caggcgagtt gcagcctgca atccgaactg agagaagctt 180

taagagatta gcttagcctc gcgacttcgc aactcgttgt acttccatt gtagcacgtg 240

tgtagcccag gtcataagg gcatgatgat ttgacgtcat cccaccttc ctccggtttg 300

tcaccggcag tcttgctaga gtgcccaact gaatgatggc aactaacaat aagggttgcg 360

ctcgttgccg gacttaacc aacatctcac gacacgaggc tgacgacaac catgcaccac 420

ctgtcacttt gccccgaag gggaaagctc tatctctaga gtgatcaaag gatgttcaag 480

acctggtaag gttcttcgcg ttgcttcgaa ttaaaccaca tgctccaccg cttgtgcggg 540

ccccgtcaa ttctttgag ttcaacctt gcggtcgtac tcccaggcg gagtgcttaa 600

tgcgtagct gcagcactga agggcggaaa ccctccaaca cttagcactc atcgtttacg 660

gcgtggacta ccagggtatc taatcctgtt tgctccccac gctttcgagc ctcagcgta 720

gttacagacc agagagccgc cttcgccact ggtgttcctc catatatcta cgcatctcac 780

cgctacacat ggaattccac tctcctctc tgactcaag tctcccagtt tccaatgacc 840

ctccccggtt gagccggggg cttcacatc agacttaaga aaccgcctgc gctcgcttta 900

cgccaataa atccggacaa cgcttgccac ctacgtatta ccgcggtgc tggcacgtag 960

ttagccgtgg ctttctggtt agataccgtc aagggatgaa cagtactct catcctgtt 1020

cttctctaac aacagagttt tacgatccga aaaccttctt cactcacgcg gcgttgctcg 1080

gtcagacttt cgtccattgc cgaagattcc ctactgctgc ctcccgtagg agtttgggcc 1140

gtgtctcagt cccaatgtgg ccgatcacc tctcaggtcg gctatgcatc gtgccttgg 1200

tgagccgta cctcaccaac tagctaagc accgagggtc catccatcag cgacaccga 1260

aagcgcttt caaatcaaaa ccatgcggtt ttgattgta tacgtatta gcacctgtt 1320

ccaagtgtta tccccttctg atgggcaggt taccacgtg ttactcacc gttcgccact 1380

cntcttttc cggaggagca agctccgtg gaaaaagaag cgtcgactgc a 1431

<210> 3

<211> 1116

<212> DNA

<213> Carnobacterium divergens

<400> sekwencja 3

agacggctgg ctctaaaag gttacctcac cggcttcggg tgttacaac tctcgtggtg 60

tgacgggcgg tgtgtacaag acccggaac gtattcacc cggcgttctg atccgcgatt 120

actagcgatt ccgcttcat gtaggcgagt tgcagcctac aatccgaact gagaatggct 180

ttaagagatt agcttggcct cacgacttcg cgactcgtt taccatccat ttagcacgt 240

gttagccca ggtcataagg ggcacgatga ttgacgtca tccccacctt cctccggtt 300

gtcaccggca gtctcactag agtgcccaac tgaatgctgg caactagtaa taagggttgc 360

gctcgttgcg ggacttaacc caacatctca cgacagagc tgacgacaac catgaccac 420

ctgtcacttt gtccccgaag ggaaagctcg atctctcgag tggtaaagg atgtcaagac 480

ctggtaaggt tcttcgctt gcttcgaatt aaaccacatg ctccaccgct tgtcgggctc 540

cccgtaatt cctttgagtt tcaaccttgc ggtcgtactc cccaggcggga gtgcttaatg 600

cgtagctgc agcactgaag ggcggaaacc ctccaacact tagcactcat cgtttacagc 660

gtggactacc agggatatcta atcctgtttg ctccccacgc tttcgagcct cagcgtcagt 720

tacagaccag agagtcgctc tcgccactgg tgttctcca tatactacg catttcaccg 780

ctacacatgg aattccactc tcctcttctg cactcaagtt ctccagtttc caatgaccct 840

ccccggttga gccgggggct ttcacatcag acttaaagaa ccgctgcgc tcgctttacg 900

cccaataaat cggacaacg cttgccacct acgtattacc gcggctgctg gcacgtagtt 960

agccgtggct tcttggttag ataccgtcag gggatgagca gttacttca tccttgttct 1020

tctctaaca cagagtttta cgatccgaaa accttctca ctcacgaggc attgctccgt 1080

cagactttcg tccattgagg aagattccct actgct 1116

<210> 4

<211> 1405

<212> DNA

<213> Enterococcus faecium

<220>

<221> misc_feature

<222> (1343)..(1343)

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

<400> sekwencja 4

cggagcttgc tccaccggaa aaagaggagt ggcgaacggg ggagtaacac gtgggtaacc 60

tgcccatcag aaggggataa cacttgaaa caggtgctaa taccgtataa caatcaaac 120

cgcatggttt tgattgaaa ggcgcttcg ggtgtcctg atggatggac ccgcggtgca 180

ttagctagtt ggtgaggtaa cggctacca aggccacgat gcatagccga cctgagaggg 240

tgatcggcca cattgggact gagacacggc ccaaactcct acgggaggca gcagtaggga 300

atcttcggca atggacgaaa gtctgaccga gcaacgccg gtgagtgaag aaggttttcg 360

gatcgtaaaa ctctgttgtt agagaagaac aaggatgaga gtaactgttc atcccttgac 420

ggtatctaac cagaaagcca cggctaacta cgtgccagca gcccggttaa tacgtaggtg 480

gcaagcgttg tccgattta ttggcgtaa agcgagcgca ggcggttct taagtctgat 540

gtgaaagccc ccggctcaac cggggagggt cattggaac tgggagactt gtagtcagaa 600

gaggagagtg gaattccatg tntagcgggt aatgcgtag atatatggag gaacaccagt 660

ggcgaaggcg gctctctggt ctgtaactga cgctgaggct cgaaagcgtg gggagcaaac 720

aggattagat accctggtag tccacgccgt aaacgatgag tgctaagtgt tggagggttt 780

ccgcccttca gtgctgcagc taacgcatta agcactccgc ctggggagta cgaccgcaag 840

gttgaaactc aaaggaattg acgggggccc gcacaagcgg tggagcatgt ggtttaattc 900

gaagcaacgc gaagaacctt accaggtctt gacatcctt gatcactcta gagatagagc 960

ttcccctcg ggggcaaagt gacaggtggt gcatggttgt cgtcagctcg tgcgtgaga 1020

tgttgggtta agtccgcaa cgagcgaac ccttattgtt agttgccatc attcagttg 1080

gcactctagc aagactgccg gtgacaaacc ggaggaaggt ggggatgacg tcaaatcatc 1140

atgccctta tgacctgggc tacacagtg ctacaatggg aagtacaacg agttcgaag 1200

tcgcgaggct aagctaact cttaaagctt ctctcagttc ggattgcagg ctgcaactcg 1260

cctgcatgaa gccggaatcg ctagtaatcg cggatcagca cgccgcggtg aatacgttcc 1320

gggccttgt acacaccgcc cgnacacca cgagagttt taacaccga agtcggtgag 1380

gtaaccttg gagccagccg cctaa 1405

Zastrzeżenia patentowe

1. Nowy szczep bakterii fermentacji mlekowej o właściwościach probiotycznych *Leuconostoc mesenteroides* eub1T, zdeponowany pod numerem PKM B/00096, o sekwencji nukleotydowej regionu DNA kodującego gen 16S rRNA wskazanej w wykazie sekwencji pod numerem 1.
2. Nowy szczep bakterii fermentacji mlekowej o właściwościach probiotycznych *Enterococcus faecium* eub2T, zdeponowany pod numerem PKM B/00097, o sekwencji nukleotydowej regionu DNA kodującego gen 16S rRNA wskazanej w wykazie sekwencji pod numerem 2.
3. Nowy szczep bakterii fermentacji mlekowej o właściwościach probiotycznych *Carnobacterium divergens* eub3T, zdeponowany pod numerem PKM B/00099 o sekwencji nukleotydowej regionu DNA kodującego gen 16S rRNA kodującego gen 16S rRNA wskazanej w wykazie sekwencji pod numerem 3.
4. Nowy szczep bakterii fermentacji mlekowej o właściwościach probiotycznych *Enterococcus faecium* eub4T, zdeponowany pod numerem PKM B/00098, o sekwencji nukleotydowej regionu DNA kodującego gen 16S rRNA kodującego gen 16S rRNA wskazanej w wykazie sekwencji pod numerem 4.
5. Kompozycja probiotyczna do zwalczania patogennych szczepów bakterii *Clostridium perfringens* i *Escherichia coli* u świń i dzików, **znamienna tym**, że zawiera szczepy bakterii *Enterococcus faecium* eub4T jak określono w zastrz. 4 i *Leuconostoc mesenteroides* eub1T, jak określono w zastrz. 1 i/lub *Enterococcus faecium* eub2T, jak określono w zastrz. 2 i/lub *Carnobacterium divergens* eub3T jak określono w zastrz. 3.
6. Kompozycja według zastrz. 5, **znamienna tym**, że szczepy wchodzące w jej skład mogą być stosowane jako szczepy alternatywne, wymienne w danej kompozycji w razie ataku wirusowego.
7. Kompozycja według zastrz. 5 albo 6, **znamienna tym**, że jej postać aplikacyjna zawiera w jednym gramie co najmniej 10^6 jtk, korzystnie 10^9 – 10^{11} jtk.
8. Zastosowanie kompozycji jak określono w zastrz. 5 albo 6 albo 7 do produkcji preparatu probiotycznego w celu ograniczania rozwoju chorobotwórczych szczepów bakterii *Escherichia coli* i *Clostridium perfringens* u świń i dzików.
9. Zastosowanie według zastrz. 8, **znamiennie tym**, że kompozycja probiotyczna według zastrz. 7 albo 8, albo 9 jest podawana zwierzętom doustnie, wziewnie lub doodbytniczo w ilości co najmniej 10^7 – 10^8 jtk/kg masy ciała zwierzęcia dziennie, korzystnie 10^8 jtk/kg masy ciała zwierzęcia dziennie.
10. Zastosowanie według zastrz. 9, **znamiennie tym**, że kompozycja probiotyczna według zastrz. 5 albo 6, albo 7 jest podawana zwierzętom doustnie razem z paszą i/lub z prefiksami i/lub z dodatkami paszowymi lub w formie specjalnych preparatów bakteryjnych.
11. Zastosowanie kompozycji według zastrz. 9 albo 10 do produkcji preparatu do dezynfekcji ciał zwierząt i miejsca ich przebywania, **znamiennie tym**, że ciała zwierząt i miejsca ich przebywania dezynfekuje się środkami zawierającymi w swoim składzie kompozycje według zastrz. 5 albo 6 albo 7 i/lub ich metabolity.
12. Zastosowanie według zastrz. 11, **znamiennie tym**, że metabolitami bakterii probiotycznych stosowanymi w celach dezynfekcji są bakteriocyny i/lub kwasy organiczne i/lub nadtlenek wodoru i/lub aldehyd octowy i/lub D-aminokwasy i/lub kwasy tłuszczowe i/lub cały płyn pochodzący z bakterii probiotycznych.
13. Zastosowanie według zastrz. 11, **znamiennie tym**, że kompozycje i/lub metabolity są stosowane w formie zawiesiny komórkowej lub w formie utrwalonej.

