



(21) Numer zgłoszenia: **416206**

(22) Data zgłoszenia: **19.02.2016**

(51) Int.Cl.

A61K 35/747 (2015.01)

A61K 36/53 (2006.01)

A23K 10/16 (2016.01)

A23K 10/30 (2016.01)

A23K 50/10 (2016.01)

(54) **Eubiotyk dla młodych zwierząt przeżuujących, zwłaszcza dla cieląt
i sposób żywienia zwierząt**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

28.08.2017 BUP 18/17

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

11.01.2021 WUP 01/21

(73) Uprawniony z patentu:

**SANPROBI SPÓŁKA Z OGRANICZONĄ
ODPOWIEDZIALNOŚCIĄ
SPÓŁKA KOMANDYTOWA, Szczecin, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**ANDRZEJ FRANKIEWICZ, Poznań, PL
MAŁGORZATA KASPROWICZ-POTOCKA,
Poznań, PL**

**WŁODZIMIERZ NOWAK, Bolechówko, PL
ANITA ZAWORSKA, Solec, PL
BARBARA STEFAŃSKA, Mikoszki, PL
ANNA SIP, Poznań, PL**

**WŁODZIMIERZ GRAJEK, Poznań, PL
KATARZYNA GRAJEK, Poznań, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Bartłomiej Fijałkowski

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest eubiotyk, którego aktywnymi składnikami są nowe szczepy bakterii fermentacji mlekowej oraz ekstrakty wodne tymianku pospolitego *Thymus vulgaris* L. i lebiodki pospolitej *Origanum vulgare* i jego zastosowania. Eubiotyk jest przeznaczony dla młodych zwierząt przeżuwiających, w szczególności dla cieląt. Podawanie eubiotyku według wynalazku zwierzętom przeżuującym powoduje polepszenie wyników produkcyjnych odchowu przez poprawę przyrostów masy ciała, parametrów zoometrycznych oraz wskaźników biochemicznych krwi i płynu żwacza. Eubiotyk o składzie i w dawce według wynalazku może być wprowadzany bezpośrednio do wody, mleka lub preparatu mlekozastępczego przeznaczonego dla młodych zwierząt przeżuwiających, zwłaszcza dla cieląt.

W ostatnim czasie obserwuje się intensyfikację działań zmierzających do poprawy wskaźników produkcyjnych oraz zdrowotności zwierząt. Z ekonomicznego i hodowlanego punktu widzenia interesującym celem dla hodowców byłoby zwiększenie przyszłej wydajności mlecznej i produktywności odchowanych cieląt, co pośrednio można osiągnąć przez odpowiednie żywienie i zapewnienie właściwych warunków środowiskowych. Jednakże wraz ze wzrostem produktywności obserwuje się pogorszenie zdrowotności zwierząt, co bezpośrednio wpływa na ich długowieczność.

Już od pierwszych tygodni życia cieląt następuje intensywny wzrost i rozwój układu pokarmowego. W tym okresie następuje również kształtowanie odporności organizmu, która decyduje o tempie adaptacji w środowisku, wpływającej na późniejszą produktywność zwierząt. Wyniki badań potwierdzają, że cielęta częściej chorujące w pierwszych tygodniach życia osiągnęły niższą produktywność (LeBlanck i in., 2006). Nasilenie występowania biegunek obserwuje się w pierwszych dwóch tygodniach życia. Czynniki etiologicznymi biegunek u cieląt są nie tylko różnorodne czynniki zakaźne, ale również złe warunki zoohigieniczne, a w szczególności niewłaściwe zabezpieczenie immunologiczne cieląt w pierwszych dniach życia. Ponadto należy pamiętać, że jeśli cielę zachorowało na biegunkę, znacznie wzrasta ryzyko innych zachorowań, w szczególności chorób układu oddechowego, co zwiększa koszty leczenia i ryzyko śmierci czy ewentualnych komplikacji po przechorowaniu (Gulliksen i in., 2009). Poziom presji infekcyjnej jest wprost proporcjonalny do koncentracji patogenów w środowisku.

Biegunki u cieląt najczęściej wywoływane są przez enterotoksyczne szczepy *Escherichia coli* (ETEC) i *Clostridium perfringens* oraz wirusy. Najgroźniejszy dla nowo narodzonych cieląt jest szczep ETEC produkujący enterotoksynę STa, której działanie powoduje zwiększoną sekrecję enterocytów w jelicie cienkim. Wskutek jej działania dochodzi do biegunki sekrecyjnej. Prawidłowe odpojenie siarą zapobiega adhezji i kolonizacji jelit przez patogenne szczepy *E. coli*, dlatego jakość siary jest bardzo ważna na tym etapie. Mechanizm działania enterotoksyn polega na wnikaniu ich do wnętrza enterocytów i stymulowaniu wydalania przez komórki nabłonkowe jonów chloru i potasu oraz hamowaniu absorpcji jonów sodu z przewodu pokarmowego. W efekcie prowadzi to do gromadzenia się wody w świetle jelita i wystąpienia biegunki.

Bezpośrednimi konsekwencjami występowania biegunek są pogorszenie pobrania mieszanki paszowej typu starter oraz związane z nim niższe przyrosty masy ciała. Priorytetami aktualnych strategii odchowu młodzieży hodowlanej są przede wszystkim ograniczenie upadków, maksymalizacja przyrostów masy ciała w okresie żywienia paszami płynnymi oraz właściwe przygotowanie przewodu pokarmowego do wykorzystywania pasz stałych. W Wielkiej Brytanii upadki cieląt w pierwszych 6 miesiącach odchowu wynoszą ok. 6%, co generuje straty około 60 milionów funtów. Kluczowe zatem w tym okresie życia cieląt jest dostarczenie odpowiedniej ilości składników pokarmowych, a formą wspomagającą działania profilaktyczne może być stosowanie dodatków paszowych.

Doświadczenia *in vivo* prowadzone w wielu ośrodkach naukowych wskazują jednoznacznie na dużą efektywność stosowania probiotyków, zwłaszcza u młodych przeżuwaczy (Frizzo i in., 2011; Bayatkouhsar i in., 2013; Soto i in., 2014; Yohe i in., 2015). Dodatek probiotyków oraz synbiotyków do preparatu mlekozastępczego lub mieszanki treściwej typu starter wpływa pozytywnie na wskaźniki produkcyjne, co może być spowodowane działaniem kolonizującym bakterii probiotycznych w przewodzie pokarmowym, chroniąc go przed działalnością mikroflory patogennej i tym samym warunkując optymalne trawienie, wchłanianie i przyrosty dobowe. Soto i in. (2014) wykazali pozytywną tendencję do poprawy tygodniowych przyrostów masy ciała i współczynnika wykorzystania paszy po wprowadzeniu do niej bakterii *Lactobacillus plantarum*. Bayatkouhsar i in., (2013) zaobserwowali wyższą końcową masę ciała, wysokość w kłębie i krzyżu cieląt oraz wskazali tendencję do poprawy spożycia mieszanki treściwej typu starter, jako efektu podawania bakterii kwasu mlekowego (LAB). Stosowanie probiotyków

i fitobiotyków zmniejsza zachorowalność na biegunki. Durmic i Blache (2012) wskazują na silne właściwości przeciwbakteryjne i przeciwwirusowe ziół. Bakterie kolonizują jelita i pozostają w symbiozie z organizmem chroniąc go przed patogenami. Zbliżone wyniki otrzymali Timmerman i in. (2005), którzy wykazali obniżenie śmiertelności spowodowanej biegunkami. Autorzy ci obserwowali także efektywniejsze wykorzystanie paszy i wyższe przyrosty masy ciała na zakończenie pierwszego okresu odchowu. Badania Frizzo i in. (2010) wykazały wyższe przyrosty masy ciała, pobranie mieszanki treściwej typu starter oraz trend wzrostu masy ciała i wysokości w kłębie, jako efekt dodatku LAB+200 g/d suszonej serwatki.

Poprawa efektów produkcyjnych może nastąpić także w wyniku stosowania fitobiotyków. Wśród nich bardzo ciekawą grupą są wodne ekstrakty ziołowe. Ich działanie jest uzależnione od dawkowania, zawartości związków biologicznie czynnych, składu jakościowego i ilościowego (Utiyama i in. 2006). Zawartość substancji aktywnych może być bardzo zróżnicowana w zależności od części rośliny, okresu zbioru czy też pochodzenia geograficznego (Windisch i in. 2008; Hashemi i Davoodi 2011). Szeroka gama związków biologicznie czynnych zawartych w roślinach warunkuje ich zakres działania m.in. poprawę smakowitości pasz, pobudzanie apetytu, stymulację trawienia, wzmacnianie układu immunologicznego, właściwości przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe, przeciwpasożytnicze oraz działanie antyoksydacyjne. W praktyce zwraca się uwagę na poprawę przyrostów, wykorzystanie paszy i ogólny stan zdrowia zwierząt. Zioła stosowane w niewłaściwie dobranych dawkach mogą jednak działać toksycznie (Durmic i Blache, 2012).

W praktyce można spotęgować korzystne działanie pojedynczych dodatków paszowych poprzez ich łączenie i tworzenie kompozycji składających się z różnych szczepów bakterii probiotycznych, dodatków fitobiotycznych, prebiotyków, kwasów organicznych i innych składników aktywnych. Stosowanie kompozycji wieloskładnikowych wymaga jednak standaryzacji preparatów probiotycznych i fitobiotycznych, co najmniej w taki sposób, aby zapewnić obecność w preparacie probiotycznym wszystkich szczepów o działaniu prozdrowotnym, a w dodatku fitobiotycznym optymalny udział substancji biologicznie aktywnych. Na świecie jest wiele rozwiązań, które przewidują wykorzystanie wieloskładnikowych preparatów dla zwierząt, zwłaszcza dla cieląt. Jednym ze znanych rozwiązań jest, znany z opisu IN1000DE2014, sposób wytwarzania i skład dodatku do paszy zawierającego zioła. Dodatek ten składał się (w/w) z: 5–12,5% rokitnika pospolitego, 0,01–0,05% korzenia różańca górskiego, 4–16% liści moreli pospolitej, 1,5–6% liści topoli czarnej oraz pozostałych składników. Rozwiązanie to zaproponowane zostało w celu zwiększenia produktywności i wydajności oraz poprawy zdrowotności krów mlecznych. W rozwiązaniu znanym z opisu WO2014182813 wykorzystano kompozycję ekstraktów zawierających tymol i karwakol. Ujawniono, że mieszanina ekstraktów roślinnych zawierających łącznie tymol i karwakol, jest bardziej skuteczna, jako środek przeciwdrobnoustrojowy, niż w równoważnej ilości stosowany sam karwakol lub sam tymol. Inny dodatek fitobiotyczny, opisany w patencie RU2392825, zawiera w swoim składzie ziele lebidki pospolitej, dziurawca, babki, glistnika i rumianku w stosunku 1:1 każdego ze składników. Rozwiązanie to wpływa na poprawę apetytu oraz zwiększa odporność zwierząt i poprawia funkcjonowanie organizmu zwierzęcego. W opisie CN104840869 przedstawiono kompozycję, która składa się z wiciokrzewu, mniszka lekarskiego, opuncji położonej, fioletu japońskiego, forsycji zwistej, miłorzębu japońskiego, patrini, bulbul, maranty trzcinowej, trawy Ploughshare, soczewicy, Shichangpu, magnolii, porii, *Amomum villosum* i Chencang. Mieszanka ta wykazuje właściwości detoksykacyjne, przeciwożarczkowe, przeciwbiegunkowe, przeciwbakteryjne prowadząc do ograniczenia liczby biegunek, wzmacniając odporność oraz zmniejszając śmiertelność zwierząt i obniżając koszty żywienia. Z kolei dodatek paszowy, który zaproponowano w patencie RU2294648 zawiera olejek z oregano stanowiący 3–7% masy dodatku, który zwiększa odporność i wpływa na wydajność zwierząt gospodarskich. W opisie US2014134144 autorzy ujawnili preparat probiotyczny zawierający od 10^8 do 10^9 komórek *Lactobacillus casei* SBP i *Lactobacillus pseudoplantarum* w 1 g odtłuszczonego mleka w proszku, zapobiegający występowaniu chorób biegunkowych u przeżuwaczy. W rozwiązaniu znanym z opisu EP1088483 przedstawiono kompozycję, która składa się z ekstraktu z palmy *Yucca* oraz aktywnych i nieaktywnych drożdży *Saccharomyces cerevisiae* IP 1.077 w stężeniu 5×10^9 KBE/kg całkowitej masy ciała. Kompozycja zawiera także pierwiastki śladowe: miedź (68 mg/kg), selen (100 mg/kg) albo kobalt (80 mg/kg). Dodatek paszowy zwiększa odporność i poprawia wskaźniki produkcyjne. W kolejnym zgłoszeniu patentowym CN103907767 przedstawiono kompozycję składającą się z mieszaniny drożdży, które wpływają na stabilizację fermentacji w żwaczu, poprawę spożycia paszy i zdrowotności. Rozwiązanie znane z opisu JPH04370066 dotyczy dodatku paszowego, składającego się z liści *Eukommia wia-zowatej* (*Eucommia ulmoides* Oliver), która powoduje polepszenie smaku, zwiększenie spożycia paszy

i poprawia zdrowotność i produkcyjność u przeżuwaczy. Z kolei w opisie CN104642813 autorzy przedstawili kompleks składający się z 4 szczepów mikroorganizmów oraz dodatku ziół mniszka lekarskiego, korzeni grzybów i ostu dla przeżuwaczy. Zadaniem tego dodatku paszowego jest ułatwienie fermentacji paszy, poprawa strawności i wykorzystania paszy, wzrost odporności a zmniejszenie śmiertelności zwierząt i obniżenie kosztów żywienia.

Mimo istniejących, tradycyjnych środków do zwalczania mikroorganizmów chorobotwórczych, jak antybiotyki, poszukiwane są ciągle nowe, naturalne substancje, pozbawione wad antybiotyków. Do takich substancji mogą być zaliczane probiotyki oraz biologicznie czynne substancje roślinne. Jednakże antagonistyczne działanie probiotyków jest cechą szczepozależną. Ponadto bakterie chorobotwórcze cechują się dużą zmiennością, a więc zdarza się, że bakterie probiotyczne, które skutecznie zwalczały patogeny, stają się nieskuteczne wskutek mutacji zachodzących u patogenów. Wynika stąd konieczność nieustannego poszukiwania i doboru bakterii probiotycznych do patogenów występujących aktualnie u danego gatunku zwierząt w danym regionie. Szczegółe zagrożenie w warunkach fermowych stanowią bakterie *E. coli* i *C. perfringens*, przyczyniające się do wystąpienia wielu schorzeń oraz do pogorszenia wskaźników produkcyjnych zwierząt. Pozytywne działanie bakterii może być wzmocnione przez obecność innych substancji ochronnych lub stymulujących wzrost zwierząt jak wyciągi ziołowe. Jednakże sposób połączenia i ochrony tych substancji jest na tyle istotny, że w sprzyjających okolicznościach, wynikających zarówno z ich charakterystyki, mechanizmu działania, jak i koncentracji związków biologicznie czynnych, wzajemne ich oddziaływanie może być pozytywne lub negatywne. Jest to spowodowane zróżnicowaniem osobniczym w dużej mierze uzależnionym od środowiska hodowli młodych zwierząt przeżuwających, w tym cieląt. Ze względu na ciągłe zmiany w populacji mikroorganizmów część preparatów, które posiadają działanie przeciwbakteryjne może też być mało efektywna, lub przeciwnie, aktywność przeciwbakteryjna może być skierowana przeciwko bakteriom probiotycznym. Oznacza to, że dla ochrony zwierząt konieczne jest nieustanne poszukiwanie nowych kompozycji wieloskładnikowych, oddziałujących na zdrowotność i wzrost zwierząt. W praktyce żywieniowej, każdy ze składników jest często stosowany niezależnie, przez co nie uzyskuje się efektu synergii. Także mieszaniny wieloskładnikowe różnych dodatków nie zawsze są skuteczne. Efekt synergii występuje, bowiem jedynie wtedy, gdy obecne w dodatku składniki nie wpływają wzajemnie na siebie bójkowo lub konkurencyjnie, a działają na różnych płaszczyznach i w różnych kluczowych miejscach przewodu pokarmowego.

Celem wynalazku jest dostarczenie nowego dodatku do pasz – eubiotyku, zawierającego bakterie probiotyczne oraz ekstrakty z ziół do zapobiegania infekcji u młodych zwierząt przeżuwających, zwłaszcza cieląt, przy jednoczesnej poprawie efektów hodowlanych. Według wynalazku zastosowanie tego eubiotyku może wspomóc leczenie przez skrócenie jego czasu oraz profilaktykę, a także poprawić efekty ekonomiczne przez uzyskanie wyższych przyrostów masy ciała oraz rozwoju przewodu pokarmowego.

Eubiotyk dla zwierząt przeżuwających, zwłaszcza cieląt według wynalazku zawiera nowe szczepy bakterii probiotycznych *Lactobacillus rhamnosus* eub1B i/lub *Lactobacillus salivarius* eub2B i/lub *Lactobacillus sakei* eub3B oraz wodny ekstrakt z tymianku pospolitego *Thymus vulgaris* L i/lub wodny ekstrakt z lebidki pospolitej *Origanum vulgare*.

Wymienione szczepy zostały zdeponowane w depozycie patentowym Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów we Wrocławiu pod numerami akcesyjnymi:

Lactobacillus casei eub1B = *Lactobacillus casei* PKM B/00103

Lactobacillus salivarius eub2B = *Lactobacillus salivarius* PKM B/00102

Lactobacillus sakei eub3B = *Lactobacillus sakei* PKM B/00101.

W skład eubiotyku według wynalazku wchodzi od 10 do 30% w/w, korzystnie 20% w/w biomasy komórkowej bakterii probiotycznych w suchej masie eubiotyku, utrwalonych metodą suszenia. Korzystnie, bakterie probiotyczne wprowadzone są do eubiotyku w postaci suchej, sypkiej. Wodne ekstrakty ziołowe stanowią od 30 do 90% w/w suchej masy eubiotyku, korzystnie 80% w/w, i wprowadzone są do eubiotyku w postaci suchej, sypkiej, korzystnie w proporcjach 1:1. Korzystnie, składniki ziołowe i bakteryjne eubiotyku są mieszane razem, a całość ma postać sypką. Eubiotyk może być podawany zwierzętom w formie sypkiej lub płynnej. Eubiotyk może być samoistnym produktem, lub może być dodany do preparatu mlekozastępczego, mleka, lub wody, a także do funkcjonalnych dodatków paszowych. Korzystnie eubiotyk jest rozpuszczalny w wodzie, mleku i w preparacie mlekozastępczym.

Przeprowadzono doświadczenia, w których eubiotyk wprowadzano do preparatu mlekozastępczego i/lub mleka dla cieląt w pierwszym okresie odchowu.

Zwierzęta utrzymywane były w kojcach indywidualnych i podzielone na grupę kontrolną otrzymującą dietę bez dodatku eubiotyku i doświadczalną, z dodatkiem wytworzonego eubiotyku. Doświadczenia były prowadzone podczas pierwszego okresu odchowu cieląt (0–56 dni). Nieoczekiwanie stwierdzono, że zwierzęta otrzymujące eubiotyk osiągnęły znacznie wyższą końcową masę ciała, lepsze przyrosty masy ciała, wyższe spożycie paszy oraz lepsze wskaźniki zoometryczne i biochemiczne krwi.

Sposób zwiększenia efektywności żywienia zwierząt przeżuwiających, zwłaszcza cieląt według wynalazku polega na podawaniu zwierzętom eubiotyku w ilości od 0,5 do 5,0 g, korzystnie 1,25 g na dzień na zwierzę. Korzystnie, eubiotyk podaje się zwierzętom młodym, szczególnie w okresie od 0 do 56 dnia życia.

Sposób poprawy rozwoju przewodu pokarmowego, szczególnie żwacza u zwierząt przeżuwiających, zwłaszcza cieląt, według wynalazku polega na podawaniu zwierzętom eubiotyku w ilości od 0,5 do 5,0 g, korzystnie 1,25 g na dzień na zwierzę.

Eubiotyk według wynalazku ze względu na kompleksowość działania i wysoką skuteczność wynikającą ze specyficznego i niepowtarzalnego składu, jak również wzajemnych proporcji pomiędzy składnikami, działa pozytywnie zarówno na wskaźniki produkcyjne, jak również na wskaźniki biochemiczne krwi oraz płynu żwacza. Ponadto, w odróżnieniu od innych dodatków, jest łatwy w aplikacji.

Dzięki właściwemu połączeniu składników uzyskano nowy efekt synergii, który umożliwił poprawę wielu istotnych obszarów produktywności zwierząt. Prawidłowy dobór poszczególnych dodatków ograniczył możliwość wzajemnego efektu antagonistycznego składników dodatku, przez co poszczególne komponenty mogły spełnić wyznaczone im zadanie.

Wynalazek przedstawiono w przykładach wykonania.

P r z y k ł a d 1. *Doświadczenie produkcyjne na cielętach* z zastosowaniem eubiotyku 1.

Przygotowano eubiotyk 1 o składzie (% suchej masy): utrwalona biomasa bakterii probiotycznych *Lactobacillus casei* eub1B, *Lactobacillus salivarius* eub2B, *Lactobacillus sake* eub3B (w proporcji 1:1:1) 20%, susz ekstraktu wodnego lebiodki 40% i susz ekstraktu wodnego tymianku 40%. Suchy, sypek eubiotyk wprowadzono do rozpuszczonego preparatu mlekozastępczego w ilości 0,15% w/w i przeprowadzono doświadczenie produkcyjne na cielętach rasy Polskiej Holsztyno-Fryzyjskiej w pierwszym okresie odchowu (0–56 dni). Zwierzęta przyporządkowano według analogów (pochodzenie, płeć, urodzeniowa masa ciała) do dwóch grup doświadczalnych: kontrolnej (bez eubiotyku) oraz doświadczalnej (z eubiotykiem 1), po 12 osobników w każdej. W okresie doświadczenia zwierzęta przebywały w kojcach indywidualnych i były żywione preparatem mlekozastępczym i mieszanką paszową typu starter ad libitum. Zwierzęta grupy doświadczalnej otrzymywały dziennie 1,25 g eubiotyku na zwierzę. Wyniki doświadczenia produkcyjnego przedstawiono w Tabeli 1.

T a b e l a 1. Doświadczenie produkcyjne na cielętach w pierwszym okresie odchowu, karmionych paszą z eubiotykiem 2 i bez eubiotyku.

Parametry	Grupa kontrolna	Grupa doświadczalna
Początkowa masa ciała (kg)	41,6	41,3
Końcowa masa ciała (kg)	68,8	72,2
Przyrosty całkowite (kg)	3402	3863
Przyrosty dobowe (g)	353	404
Całkowite spożycie mieszanki (kg)	311	360
Dobowe spożycie mieszanki typu starter (g)	555	631
Zmiana wysokości w krzyżu 0-56 dni (cm)	8,6	11,3
Liczba przypadków biegunek	12	3

W grupie otrzymującej eubiotyk wykazano istotnie lepsze przyrosty masy ciała. Ponadto w grupie tej odnotowano lepsze spożycie paszy i korzystniejsze wskaźniki zoometryczne (wysokość w krzyżu), a także stwierdzono mniej biegunek.

P r z y k ł a d 2. *Doświadczenie produkcyjne na cielętach* z zastosowaniem eubiotyku 2.

Przygotowano eubiotyk 2 o składzie (% suchej masy): biomasa bakterii probiotycznych *Lactobacillus casei* eub1B, *Lactobacillus salivarius* eub2B, *Lactobacillus sake* eub 3B (w proporcji 1:1:1) 30%,

susz ekstraktu wodnego lebiodki 30% i susz ekstraktu wodnego tymianku 40%. Eubiotyk 2 wprowadzono do pełnego mleka lub preparatu mlekozastępczego w ilości 0,20% w/w i przeprowadzono doświadczenie produkcyjne na cielętach rasy Polskiej Holsztyno-Fryzyjskiej w pierwszym okresie odchowu (0–56 dni). Zwierzęta przyporządkowano według analogów (pochodzenie, płeć, urodzeniowa masa ciała) do dwóch grup: kontrolnej (bez eubiotyku) oraz doświadczalnej (z eubiotykiem 2), po 10 osobników w każdej. W okresie doświadczenia zwierzęta przebywały w kojcach indywidualnych, żywione w grupie kontrolnej mlekiem i mieszanką paszową typu starter, a w grupie doświadczalnej mlekiem z eubiotykiem i taką samą mieszanką paszową typu starter. Do osiągnięcia wieku 4 tygodni eubiotyk był podawany zwierzętom w mleku, a następnie do wieku 8 tygodni z taką samą ilością do preparatu mlekozastępczego. W obu przypadkach mieszanka paszowa typu starter była podawana ad libitum. Zwierzęta grupy doświadczalnej otrzymywały 1,60 g eubiotyku na dzień na zwierzę. Wyniki doświadczenia produkcyjnego przedstawiono w Tabeli 2.

T a b e l a 2. Doświadczenie produkcyjne na cielętach w pierwszym okresie odchowu, karmionych paszą z eubiotykiem 2 i bez eubiotyku.

Parametry	Grupa kontrolna	Grupa doświadczalna
Początkowa masa ciała (kg)	42,1	41,9
Końcowa masa ciała (kg)	68,4	70,2
Przyrosty całkowite (kg)	26,3	28,3
Przyrosty dobowe (g)	515,7	554,9
Całkowite spożycie mieszanki (kg)	298	346
Dobowe spożycie mieszanki typu starter (g)	532	618
Zmiana wysokości w krzyżu 0-56 dni (cm)	8,4	10,9
Liczba przypadków biegunek	14	2

W grupie otrzymującej eubiotyk stwierdzono wyższe dobowe i całkowite przyrosty masy ciała, co wpłynęło na wyższą końcową masę ciała zwierząt. Ponadto w grupie tej stwierdzono lepsze spożycie paszy i korzystniejsze wskaźniki zoometryczne, a także zanotowano mniej przypadków wystąpienia biegunek.

P r z y k ł a d 3. Wpływ stosowania eubiotyku na wskaźniki mikrobiologiczne i biochemiczne płynu żwacza.

W oparciu o eksperyment opisany w przykładzie 1, sondą pobierano płyn żwaczowy w ciągu 3–6 godz. po porannym odpoju w 28 i 42 dniu życia. Bezpośrednio po pobraniu płynu żwacza dokonywano pomiaru pH przy użyciu pH-metru CP-104. Próby wirowano przez 10 min z prędkością 11200 obr./min w celu separacji supernatantu, który zamrażano do temp. -20°C i przechowywano do dalszych analiz.

Koncentrację azotu amoniakalnego (N-NH₃) oznaczono kolorymetrycznie metodą Nesslera zmodyfikowaną przez Szumacher-Strabel i in. (2002). Analizę stężenia lotnych kwasów tłuszczowych (LKT) wykonano zgodnie z metodyką Zioteckiego i Kwiatkowskiej (1973) techniką chromatografii gazowej. Analizę mikroskopową pierwotniaków (Entodiniomorph i Holotrich) wykonano w kropli płynu żwacza według metodyki opisanej przez Michałowski i in. (1986), natomiast bakterii w komorze Thoma (Blau Brand®, Wertheim, Germany) według metody opisanej przez Ericsson i in. (2000). Wyniki doświadczenia przedstawiono w Tabeli 3.

T a b e l a 3. Wpływ stosowania eubiotyku na wskaźniki mikrobiologiczne i biochemiczne płynu żwacza.

Cecha	Czas (d)	Grupa kontrolna	Grupa doświadczalna
pH	28	5,77	6,16
	42	6,06	6,22
Suma LKT (mmol/L)	28	3,23	3,09
	42	3,33	3,68
N-NH ₃ (mmol/L)	28	14,86	19,29
	42	17,53	18,36
Ogólna liczba bakterii (log ₁₀ /ml)	28	18,80	18,85
	42	18,79	18,92
Holotricha (log ₁₀ /ml)	28	3,20	3,08
	42	5,61	5,68
Entodiniomorpha (log ₁₀ /ml)	28	8,79	9,07
	42	9,59	9,46

P r z y k ł a d 4. Wpływ stosowania eubiotyku na wskaźniki biochemiczne krwi.

Próby krwi pobierano z żyły szyjnej zewnętrznej od zwierząt z doświadczenia opisanego w przykładzie 1 w czasie od 3 do 6 godz. po porannym odpoju, czterokrotnie w okresie odchowu: 1, 14, 28, 42 dobie. Próby krwi wirowano 3000 obr/min przez 15 min w celu oddzielenia surowicy, którą po przepipetowaniu przechowywano w temp. -20°C do czasu wykonania dalszych analiz. Analizy wskaźników biochemicznych krwi wykonano za pomocą zestawu odczynników Pointe Scientific oraz Diagnostic System Lab.

T a b e l a 4. Charakterystyka zestawu odczynników zastosowanych do analizy wskaźników biochemicznych krwi cieląt.

Wskaźnik	Numer testu	Producent
Azot mocznikowy (BUN)	B7552	Pointe Scientific
β-hydroksymaślan (BHBA)	H7587-58	
IGF-I	DSL-2800	Diagnostic System Lab

Koncentrację wolnych kwasów tłuszczowych (WKT), azotu mocznikowego (BUN) i kwasu β-hydroksymaślowego (BHBA) oznaczono kolorymetrycznie. Analizę zawartości WKT przeprowadzono zgodnie z metodyką Duncombe (1964). Pomiar absorpcji wykonano z wykorzystaniem spektrofotometru Marcel Media. Analizę stężenia insulinopodobnego czynnika wzrostu (IGF-I) wykonano metodą radioimmunologiczną (RIA) z wykorzystaniem czytnika promieniowania Gamma Automatic Gamma Counter 1470.

Tabela 5. Wpływ stosowania eubiotyku na wskaźniki biochemiczne krwi.

Cecha	Czas (d)	Grupa kontrolna	Grupa doświadczalna
BUN (mg/dl)	1	11,16	18,33
	14	11,64	14,01
	28	11,64	13,87
	42	9,25	11,84
BHBA (mmol/L)	1	0,34	0,40
	14	0,33	0,20
	28	0,35	0,21
	42	0,34	0,26
WKT (mmol/L)	1	0,22	0,39
	14	0,16	0,22
	28	0,13	0,21
	42	0,12	0,23
IGF-I (ng/mL)	1	113	131
	14	50	125
	28	146	175
	42	67	72

W grupie otrzymującej eubiotyk stwierdzono lepsze wskaźniki biochemiczne krwi cieląt.

Literatura

1. Bayatkouhsara J., Tahmasebib A.M., Naserianb A.A., Mokarramc R.R., Valizadehb R. (2013) Effects of supplementation of lactic acid bacteria on growth performance, blood metabolites and fecal coliform and lactobacilli of young dairy calves. *Anim Feed Sci and Tech* 186, 1–11.
2. Durmic Z., Blache D. (2012) Bioactive plants and plant products: Effects on animal function, health and welfare. *Anim Feed Sci and Tech* 176, 150–162.
3. Frizzo L.S., Soto L.P., Zbrun M.V., Bertozzi E., Sequeira G., Rodriguez Armesto R., Rosmini M.R. (2010) Lactic acid bacteria to improve growth performance in young calves fed milk replacer and spray-dried whey powder. *Anim Feed Sci and Tech* 157, 159–167.
4. Frizzo L.S., Soto L.P., Zbrun M.V., Signorini M.L., Bertozzi E., Sequeira G., Rodriguez Armesto R., Rosmini M.R. (2011) Effect of lactic acid bacteria and lactose on growth performance and intestinal microbial balance of artificially reared calves. *Livestock Science* 140, 246–252.
5. Gulliksen S.M., Lie K.I., Røsterås O. (2009). Calf health monitoring in Norwegian dairy herds. *J Dairy Sci* 92: 1660–1669.
6. Hashemi S.R., Davoodi H. (2011) Herbal plants and their derivatives as growth and health promoters in animal nutrition, *Vet Res Commun* 35: 169–180.
7. Klein-Jöbstl D., Iwersen M., Drillich M. (2014) Farm characteristics and calf management practices on dairy farms with and without diarrhea: A case-control study to investigate risk factors for calf diarrhea. *J Dairy Sci* 97, 5110–5119.
8. LeBlanc S. J., Lissemore K.D., Kelton D.F., Duffield T.F., Leslie K.E. (2006). Major advances in disease prevention in dairy cattle. *J Dairy Sci* 89: 1267–1279.
9. Soto L.P., Zbrun M.V., Frizzo L.S., Signorini M.L., Sequeira G.J., Rosmini M.R. (2014) Effects of bacterial inoculants in milk on the performance of intensively reared calves. *Anim Feed Sci Tech* 189, 117–122.

10. Timmerman H.M., Mulder L., Everts H., D.C. van Espen, E. van der Wal, Klaassen G., Rouwers S. M.G., Hartemink R., Rombouts F.M., Beynen A.C. (2005) Health and Growth of Veal Calves Fed Milk Replacers With or Without Probiotics. *J Dairy Sci* 88, 2154–2165.
11. Utiyama C.E., Oetting L.L., Giani P.A., Ruiz U.D.S., Miyada V.S. (2006) Effects of antimicrobials, prebiotics, probiotics and herbal extracts on intestinal microbiology, diarrhea incidence and performance of weanling pigs. *Braz J Anim Sci* 35, 2359–2367.
12. Windisch W.M., Schedle K., Plitzner C., Kroismayr A. (2008). Use of phytogetic products as feed additives for swine and poultry. *J Anim Sci* 86:140–148.
13. Yohe T.T., O'Diam K.M., Daniels K.M. (2015) Growth, ruminal measurements, and health characteristics of Holstein bull calves fed an *Aspergillus oryzae* fermentation extract. *J. Dairy Sci.* 98, 6163–6175.

Zastrzeżenia patentowe

1. Eubiotyk dla zwierząt przeżuwających, zwłaszcza cieląt, **znamienny tym**, że zawiera nowe szczepy bakterii probiotycznych *Lactobacillus casei* eub1B, zdeponowany pod numerem PKM B/00103, i/lub *Lactobacillus salivarius* eub2B, zdeponowany pod numerem PKM B/00102 i/lub *Lactobacillus sake* eub3B, zdeponowany pod numerem PKM B/00101, oraz wodny ekstrakt z tymianku pospolitego *Thymus vulgaris* L i/lub wodny ekstrakt z lebiodki pospolitej *Origanum vulgare*, przy czym w skład probiotyku wchodzi od 10 do 30% w/w, korzystnie 20% w/w biomasy komórkowej bakterii probiotycznych w suchej masie eubiotyku, utrwalonych metodą suszenia oraz wodne ekstrakty ziołowe stanowią od 30 do 90% w/w w jego suchej masie, korzystnie 80% w/w.
2. Eubiotyk według zastrz. 1, **znamienny tym**, że bakterie probiotyczne wprowadzone są do niego w postaci suchej, sypkiej.
3. Eubiotyk według zastrz. 1 albo 2, **znamienny tym**, że wodne ekstrakty ziołowe, wprowadzone są do eubiotyku w postaci suchej, sypkiej, korzystnie w proporcjach 1:1.
4. Eubiotyk według zastrz. 1 albo 2 albo 3, **znamienny tym**, że składniki ziołowe i bakteryjne preparatu są mieszane razem, a całość ma postać sypką.
5. Eubiotyk według zastrz. 1 albo 2 albo 3 albo 4, **znamienny tym**, że jest podawany zwierzętom w formie sypkiej lub płynnej.
6. Eubiotyk według zastrz. 1 albo 2 albo 3 albo 4 albo 5 albo 6 albo 7, **znamienny tym**, że jest samoistnym produktem lub jest dodany do preparatu mlekozastępczego lub mleka lub wody lub do funkcjonalnych dodatków paszowych.
7. Eubiotyk według zastrz. 1 albo 2 albo 3 albo 4 albo 5 albo 6, **znamienny tym**, że jest rozpuszczalny w wodzie, mleku i w preparacie mlekozastępczym.
8. Sposób żywienia zwierząt przeżuwających, zwłaszcza cieląt, **znamienny tym**, że zwierzętom podaje się eubiotyk ujawniony w zastrz. od 1 do 7 w ilości od 0,5 do 5,0 g, korzystnie 1,25 g na dzień na zwierzę.
9. Sposób żywienia według zastrz. 8, **znamienny tym**, że eubiotyk według zastrz. 1 podaje się zwierzętom młodym, szczególnie w okresie od 0 do 56 dnia życia.