

3914044

**Dodatek paszowy o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych, mieszanka paszowa, zastosowanie dodatku paszowego do wytwarzania mieszanki paszowej oraz sposób wytwarzania dodatku paszowego**

Wynalazek dotyczy dodatku paszowego o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych, mieszanki paszowej, zastosowania dodatku paszowego do wytwarzania mieszanki paszowej oraz sposobu wytwarzania dodatku paszowego. Bardziej szczegółowo rozwiązanie dotyczy dodatku paszowego o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych, ograniczającego aktywność endogennej mikroflory przewodu pokarmowego zwłaszcza *Listeria*, *Salmonella* i *Clostridium*. Działanie suplementów według wynalazku polega na poprawie wyników odchowu (przyrosty i wykorzystanie paszy) drobiu poprzez ograniczenie aktywności endogennej mikroflory zwłaszcza *Listeria*, *Salmonella* i *Clostridium*.

Mięso drobiowe jest jednym z najczęściej spożywanych rodzajów mięsa. Kurczęta rzeźne będące jego źródłem są jednak rezerwuarem wielu mikroorganizmów chorobotwórczych, takich jak np. *Salmonella* sp., *Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens* czy *Listeria* sp. Drobnoustroje te stanowią olbrzymie zagrożenie zarówno dla człowieka, jak i zainfekowanego nimi drobiu. Są przyczyną wielu bardzo groźnych schorzeń, między innymi układu pokarmowego, często o wysokiej śmiertelności. Do niedawna głównym czynnikiem wykorzystywanym do ochrony drobiu przed infekcjami bakteryjnymi wywoływanymi drogą pokarmową były antybiotyki. Wprowadzony w 2006 r. zakaz stosowania antybiotyków w żywieniu drobiu (dodawania antybiotyków do pasz dla drobiu) wymusił jednak konieczność poszukiwania skutecznych ich zamienników. Dobrą, a zarazem w pełni bezpieczną dla człowieka i środowiska alternatywą dla antybiotyków mogą być białkowe metabolity wielu bakterii zwane bakteriocynami. Zdolność do ich syntezy posiada wiele szczepów bakterii fermentacji mlekowej wykorzystywanych przemysłowo i zaliczanych do organizmów bezpiecznych (GRAS). Bakteriocyny działają bakteriobójczo lub bakteriostatycznie. Wiele z nich

wykazuje antagonistyczne właściwości w stosunku do drobnoustrojów chorobotwórczych dla człowieka i zwierząt. Zaletą bakteriocyn jest duża specyficzność działania. Większość bakteriocyn działa bowiem jedynie na kilka grup drobnoustrojów. Bakteriocyny aktywne względem patogenów są ponadto najczęściej nieaktywne w stosunku do mikroorganizmów niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania organizmu człowieka i zwierząt (Abee i in., 1995; Cleveland i in., 2001; Montville i in., 1995, Galvez i in., 2007). Takiej wybiórczości działania nie wykazują antybiotyki. Stosowanie bakteriocyn, w odróżnieniu od wykorzystywania antybiotyków, nie inicjuje powstawania form opornych drobnoustrojów i nie zakłóca naturalnej równowagi ekosystemu jelitowego. W związku z tym bakteriocyny wydają się być dobrym substytutem antybiotyków. Niektórzy autorzy sugerują możliwość wykorzystywania bakteriocyn do celów leczniczych – do zwalczania infekcji jelitowych wywołanych zwłaszcza przez antybiotykooporne drobnoustroje. Bakteriocyny najczęściej są jednak wykorzystywane do zabezpieczania żywności przed rozwojem niepożądanych drobnoustrojów. Związki te z uwagi na dużą selektywność działania oraz bardzo wysoką aktywność przeciwdrobnoustrojową budzą także zainteresowanie producentów pasz dla drobiu.

Dotychczas prowadzone prace badawcze nad możliwością stosowania bakteriocyn jako dodatków paszowych potwierdzają celowość takiej aplikacji. Wielu autorów wykazało, że są one dobrym narzędziem do ograniczania rozwoju różnych mikroorganizmów patogennych. Przykładowo, Wooley i in. (1999) w następstwie podawania wraz z paszą microcyny 24, bakteriocyny produkowanej przez *Escherichia coli*, ograniczyli kolonizację przewodu pokarmowego ptaków przez groźny, zarówno dla nich jak i ludzi, szczep *Salmonella typhimurium*. Audisio i in. (2000) wyizolowali z kolei z wola kurcząt endogenny szczep *Enterococcus faecium* J96 i stosując produkowaną przez niego bakteriocynę ograniczyli wzrost innego patogenu jelitowego, tj. *Salmonella pullorum*. Natomiast Gaenzle i in. (1999) po zastosowaniu kurvacyny wytwarzanej przez *Lactobacillus curvatus* stwierdzili obniżenie liczebności *Listeria innocua* i inaktywację *Escherichia coli* w przewodzie pokarmowym drobiu. Szczególnie interesujące wydają się ostatnie doniesienia Stern i in. (2005) oraz Cole i in. (2006) wskazujące na możliwość oddziaływania za pośrednictwem bakteriocyn B602 (NRRL B-30509) oraz OR7 (NRRL33, B3514) na rozwój *Campylobacter jejuni* i *Campylobacter col*, w przewodzie pokarmowym kurcząt i u indyków. Obserwacje w/w autorów zasługują na szczególną uwagę ponieważ na liczebność szczepów

*Campylobacter* występujących w układzie pokarmowym drobiu nie wpływają procesy wykluczania kompetycyjnego (CE), czyli procesy będące jednym z głównych mechanizmów działania probiotyków (Stern i in. 2001; Mead, 2002). W doświadczeniach na indykach Cole i in. (2006) stwierdzili również zmiany w obrazie histologicznym dwunastnicy, tj. redukcję głębokości krypt, co jak tłumaczą autorzy może mieć bezpośredni związek z ograniczeniem liczebności *Campylobacter* sp.

Stosowanie bakteriocyn jako czynników eliminujących lub ograniczających rozwój drobnoustrojów chorobotwórczych dla kurcząt rzeźnych nie jest łatwe ponieważ bakteriocyny jako związki białkowe są trawione (rozkładane) przez enzymy proteolityczne w przewodzie pokarmowym drobiu. W następstwie tego całkowicie lub częściowo tracą aktywność biologiczną, czyli zdolność oddziaływania na patogeny jelitowe. W celu zwiększenia skuteczności działania bakteriocyn niezbędne jest więc opracowanie metody ochrony tych związków przed destrukcyjnym działaniem enzymów proteolitycznych. W literaturze brak jest danych dotyczących badań prowadzonych w tym kierunku. Większość bakteriocyn wykorzystywanych w żywieniu drobiu było jak dotąd wprowadzanych do pasz bez dodatkowych ochronnych nośników. Opracowane przez nas nośniki (na bazie lipidów) mogą być wykorzystywane do oczekowania bakteriocyn, niezależnie od ich postaci (płynnych i suszonych). Są one trawione dopiero w jelicie cienkim. W związku z tym dobrze zabezpieczają bakteriocyny przed działaniem enzymów proteolitycznych (trypsyny i chymotrypsyny) i dzięki temu doprowadzają je w aktywnej formie do docelowych miejsc działania, czyli do dolnego odcinka przewodu pokarmowego (jelito cienkie i jelito ślepe) drobiu. Nośniki według wynalazku pozwalają więc na otrzymywanie najbardziej aktywnej formy bakteriocyn, która w odróżnieniu od bakteriocyn nieotoczkowanych, działa najlepiej w dolnym odcinku układu pokarmowego, czyli miejscu licznie kolonizowanym przez drobnoustroje chorobotwórcze. Wymiernym efektem obniżenia liczebności drobnoustrojów chorobotwórczych w następstwie stosowania bakteriocyn w formie otoczkowanej jest poprawa zdrowotności i dobrostanu kurcząt rzeźnych.

Bakteriocyny nieotoczkowane mogą być natomiast wykorzystywane do regulacji składu mikroflory wola i tworzenia już w tym odcinku układu pokarmowego drobiu swoistej bariery bakteriobójczej. Działanie takie jest bardzo pożądane ponieważ wole jest także silnie kolonizowane przez mikroorganizmy, w gronie których znajduje się szereg groźnych patogenów i dlatego stanowi ono główne wrota infekcji. Ograniczenie występowania mikroorganizmów patogennych w początkowym odcinku przewodu

pokarmowego zmniejsza więc ryzyko infekcji jelitowych drobiu i w konsekwencji tego również zakażeń ludzi. Potwierdzają to badania Rosenquist i in., (2003), którzy stwierdzili, że nawet dwukrotne zmniejszenie liczebności np. *Campylobacter jejuni* u kurcząt rzeźnych zmniejsza aż trzydziestokrotnie ryzyko infekcji ludzi.

W kontekście możliwości wykorzystania bakteriocyn jako suplementów pasz dla drobiu (dodatków paszowych w żywieniu kurcząt rzeźnych) na szczególną uwagę zasługuje bakteriocyna wytwarzana przez bakterie *Carnobacterium divergens* o nazwie diwercyna. Diwercyna jest ciepłoopornym białkiem (wytrzymuje 30 minutowe ogrzewanie w temperaturze 100°C oraz trwającą 10 minut obróbkę w temperaturze 121°C) o masie cząsteczkowej 4227 Da. Związek ten jest stabilny w środowisku o pH od 2 do 8 oraz w roztworach SDS-u, Tween'u 80 i mocznika. Działa on bakteriobójczo na szereg bakterii nie spokrewnionych ze swymi producentami. Szczególnie wysoką aktywność wykazuje względem *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Enterococcus faecalis* oraz niektórych szczepów bakterii *Clostridium*. Diwercyna nie jest aktywna w stosunku do bakterii fermentacji mlekowej stosowanych jako kultury starterowe w wielu branżach przemysłu spożywczego oraz jako suplementy diety (probiotyki) dla kurcząt rzeźnych. Aktywność diwercyny w stosunku do bakterii z rodzaju *Listeria* i *Clostridium* zasługuje na szczególną uwagę zwłaszcza w świetle alarmujących raportów donoszących o licznych zakażeniach żywności tymi bakteriami oraz faktu ich występowania w przewodzie pokarmowym drobiu. Mimo, że diwercyna działa bakteriobójczo na wiele bakterii patogennych występujących u drobiu oraz jest odporna na działanie szeregu czynników fizyko-chemicznych (temperatury 80-85°C i ciśnienia 2-3 bary), którym poddawane są pasze w trakcie produkcji, jak dotąd nie była ona wykorzystywana jako dodatek paszowy w żywieniu tej grupy zwierząt hodowlanych.

W literaturze brak jest również danych dotyczących wpływu diwercyny na endogenną mikroflorę układu pokarmowego kurcząt. Przeprowadzone przez nas badania wykazały natomiast, że związek ten ogranicza liczebność szeregu szczepów zoonotycznych bakterii powodujących groźne i często śmiertelne dla człowieka choroby. Stosowanie diwercyny jako dodatku paszowego w bezpośredni sposób przyczynia się więc do poprawy stanu zdrowotnego kurcząt i w konsekwencji tego również jakości mięsa drobiowego. Fakt ten ma istotne znaczenie także dla zdrowia człowieka, gdyż suplementacja pasz diwercyną w pośredni sposób ogranicza także ryzyko infekcji ludzi bakteriami przenoszonymi za pomocą produktów drobiowych.

Drugą bakteriocyną, która może znaleźć zastosowanie w żywieniu kurcząt i przyczynić się między innymi do poprawy ich zdrowotności, a w konsekwencji także i bezpieczeństwa mikrobiologicznego otrzymywanych z nich produktów jest nizyna. Bakteriocyna ta jest produkowana przez bakterie *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*. Wykazuje aktywność w stosunku do wielu LAB oraz niektórych bakterii z rodzajów: *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Listeria*, *Clostridium* oraz *Bacillus*. Działa bakteriobójczo na wegetatywne formy bakterii, natomiast bakteriostatycznie na ich spory. Nizyna także wyraźnie zwiększa wrażliwość wielu przetrwalnikujących form bakterii na działanie wysokiej temperatury (redukuje D o 50-60%). Silnie ogranicza ciepłooporność wytrzymałych na obróbkę termiczną spor bakterii *Clostridium botulinum*, *Clostridium sporogenes*, *Bacillus coagulans* oraz *Bacillus stearothermophilus*. Bakteriocyna ta nie jest natomiast aktywna w stosunku do bakterii gramujemnych, gdyż zewnętrzna warstwa ich ścian komórkowych jest dla niej nieprzepuszczalna. Gramujemne bakterie posiadające jednak uszkodzoną warstwę lipopolisacharydową ściany komórkowej są wrażliwe na jej działanie. Przyczyną tych uszkodzeń może być: obróbka termiczna, szok osmotyczny, paskalizacja, działanie czynników chelatujących metale, np. EDTA, związków systemu laktoperoksydazy pirarycyny bądź lizozymu. Mutanty *Salmonella typhimurium* pozbawione rdzenia oligosacharydowego w zewnętrznej warstwie ściany komórkowej są również wrażliwe na działanie tej bakteriocyny. Badania toksykologiczne przeprowadzone na zwierzętach doświadczalnych wykazały, iż substancja ta nie wpływa na ich funkcje fizjologiczne. W 1959 r. w Wielkiej Brytanii wydano zgodę na wprowadzanie nizyny do żywności. W 1969 r. bakteriocyna ta uzyskała akceptację WHO/FAO i została wpisana do rejestru bezpiecznych dodatków do żywności (WHO, 1969). Komitety ds. Dodatków do Żywności, działające w ramach Komisji Kodeksu Żywnościowego FAO/WHO, ustaliły jednocześnie, iż dzienne spożycie (ADI) nizyny w przeliczeniu na kilogram masy ciała konsumenta może maksymalnie wynosić 33000 IU. Na podstawie wyników wieloletnich badań toksykologicznych w USA w 1988 r. agencja żywności i leków FDA uznała nizinę za związek bezpieczny dla zdrowia człowieka i zaakceptowała możliwość jej wprowadzania do żywności (FDA, 1988). Obecnie nizyna jest stosowana w ponad 50 krajach do konserwowania różnych produktów żywnościowych. W Polsce zgodnie z Zarządzeniem Ministerstwa Zdrowia i Opieki Społecznej z 31 marca 1993 r. dozwolone jest stosowanie preparatów nizyny (E 234) do konserwowania serów dojrzewających i topionych w ilości 100 mg/kg produktu. W literaturze brak jest danych

dotyczących wykorzystywania nizyny w żywieniu drobiu. Komercyjne preparaty nizyny o nazwie Nisaplin® są jedynie stosowane do niszczenia niepożądanych drobnoustrojów w gotowych już produktach drobinowych. Nasze badania wykazały natomiast, że podawanie nizyny kurczętom rzeźnym ogranicza ryzyko ich zakażeń bakteriami patogennymi (modyfikuje skład mikroflory jelitowej) i w konsekwencji tego pozwala na otrzymywanie produktów drobiowych o wyższej jakości mikrobiologicznej, a więc bardziej bezpiecznych dla człowieka.

W zgłoszeniu patentowym P-369985 (opubl. 20-03-2006) opisano sposób otrzymywania bakteriocyn wytwarzanych przez bakterie z rodzaju *Carnobacterium*. W sposobie według wynalazku bakteriocyny są syntetyzowane przez bakterie z gatunku *Carnobacterium divergens* i/lub *Carnobacterium piscicola* w czasie ich wzrostu w bioreaktorze produkcyjnym z wykorzystaniem znanych metod hodowli z zachowaniem warunków beztlenowych z tym, że pożywka do produkcji bakteriocyn jest sterylizowana termicznie w temp. powyżej 100°C przez okres co najmniej 30 minut, a hodowla jest prowadzona przy zachowaniu następujących parametrów: początkowa gęstość populacji bakterii w pożywce jest nie mniejsza niż 10<sup>5</sup> jtk/ml, temperatura w zakresie 20-37°C, a pH w zakresie 5,5-7,0, najkorzystniej na stałym poziomie. Przy zastosowaniu metody okresowej lub okresowo-dolewowej hodowlę prowadzi się przez czas obejmujący logarytmiczną fazę wzrostu komórek. W przypadku stosowania metody ciągłej utrzymuje się szybkość rozcieńczania pożywki (D) w zakresie od 0,02 h<sup>-1</sup> do 0,08 h<sup>-1</sup>. Przy zastosowaniu metody ciągłej z recyrkulacją komórek utrzymuje się szybkość cyrkulacji pożywki w filtrze membranowym powyżej 0,1 m/s, a pożywkę rozcieńcza się z szybkością (D) w zakresie 0,08-0,25h<sup>-1</sup>. Biomase odbiera się z szybkością powyżej 10% w stosunku do szybkości rozcieńczania pożywki. Po zakończeniu hodowli separuje się bakteriocyny z komórek bakteryjnych przez poddanie komórek szokowemu obniżeniu pH i/lub zredukowaniu aktywności wody, a następnie bakteriocyny zagęszcza się oraz utrwała jedną ze znanych metod.

W zgłoszeniu patentowym P-369986 (opubl. 20-03-2006) przedstawiono sposób otrzymywania listeriobójczej kultury bakterii z rodzaju *Carnobacterium*. Wynalazek dotyczy sposobu otrzymywania listeriobójczej kultury bakterii z rodzaju *Carnobacterium*, zgodnie z którym z czystych kultur bakterii *C. divergens* i *C. piscicola* wytwarza się na pożywce inoculum do uzyskania gęstości komórek na poziomie 10<sup>6</sup>-10<sup>8</sup> jtk/ml, a następnie zaszczepia się nim hodowlę właściwą, którą prowadzi się albo

metodą okresową, albo ciągłą, albo ciągłą z recyrkulacją komórek z zachowaniem ściśle określonych warunków procesu w tym temperatury na poziomie 20-37°C, pH pożywki, w zależności od zastosowanej metody, w zakresie 5,5-7,5 przy początkowej gęstości populacji bakterii w pożywce nie mniejszej niż 10 jtk/ml.

W zgłoszeniu patentowym P-369984 (opubl. 20-03-2006) opisano nowy szczep bakterii *Carnobacterium divergens* S1-KKP 2012 p oraz biopreparaty do zwalczania bakterii, zwłaszcza z rodzaju *Listeria* w produktach żywnościowych i paszach z wykorzystaniem tego szczepu, a także środek dezynfekcyjny z wykorzystaniem metabolitów bakterii tego szczepu. Biopreparat w 1 g suchej masy zawiera powyżej 10<sup>5</sup> zdolnych do wzrostu komórek bakterii nowego szczepu *C. divergens* S1, najkorzystniej 2-5x10<sup>8</sup> i/lub co najmniej 10<sup>6</sup> żywych komórek bakterii mlekowych, powszechnie stosowanych jako startery w przemyśle fermentacyjnym i/lub od 1 do 99% wypełniacza i/lub od 0,1 do 10% substancji starterowych, najkorzystniej 1%. Środek dezynfekcyjny do zwalczania bakterii, zwłaszcza z rodzaju *Listeria* zawiera metabolity nowego szczepu bakterii *C. divergens* S1, korzystnie diwercynę S1 w ilości ponad 4x10<sup>5</sup>JA/ml ewentualnie inne środki dezynfekcyjne i/lub środki myjące. W/w nowy szczep bakterii zdeponowano w Kolekcji Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego pod numerem KKP 2012p.

W zgłoszeniu patentowym WO8912399 (opubl. 1989-12-28) opisuje kompozycje nizyny stosowane jako bakteriocyn. Kompozycje te składają się z lantioniny zawierającej bakteriocyny oraz z innych składników nie będących bakteriocynami. Z chwilą wymieszania takich bakteriocyn z odpowiednim nośnikiem w odpowiednich dawkach kompozycja jest skuteczna przeciw bakteriom gram-ujemnym oraz gram-dodatnim.

W zgłoszeniu patentowym EP1686185 (opubl. 2006-08-02) przedstawiono bakterie fermentacji mlekowej zawierające bakteriocyny odporne na działanie proteaz. W zgłoszeniu opisano także ich dodatek do żywności i wpływ na jej trwałość.

Pomimo opisanego powyżej istniejącego stanu techniki istnieje potrzeba stosowania w żywieniu drobiu naturalnych białkowych metabolitów bakterii fermentacji mlekowej o działaniu bakteriobójczym jakimi są bakteriocyny. Dlatego też zastosowanie diwercyny i nizyny wpisuje się w pełni w strategię poprawy zdrowotności i dobrostanu zwierząt jako elementu łańcucha troficznego. Wymienione bakteriocyny oraz prawdopodobnie także inne bakteriocyny o specyficznych zakresach

aktywności wyraźnie ograniczają bowiem zakażenia drobiu, zwłaszcza w fermach wielkotowarowych oraz pozwalają na otrzymywanie z nich żywności wolnej od bakterii chorobotwórczych. Bakteriocyny proponowane jako suplementy paszowe poprzez niszczenie bakterii patogennych wyraźnie poprawiają także zdrowotność kurcząt rzeźnych, a ich stosowanie przynosi także szereg korzyści natury ekonomicznej – poprawia wyniki ich odchowu (zwiększa przyrosty masy ciała i poprawia wykorzystanie paszy).

Celem niniejszego wynalazku jest dostarczenie środków, które spowodują eliminację w przewodzie pokarmowym kurcząt szeregu bakterii patogennych, będącą bezpośrednim skutkiem działania nizyny i diwercyny, poprzez zwiększenie powierzchni chłonnej jelita drobiu, co w efekcie poprawi także strawność i wchłanianie składników pokarmowych diety. Rozwiązanie według wynalazku polegające na suplementacji pasz opisanymi powyżej bakteriocynami korzystnie wpływa również na gospodarę odpadami (ogranicza śmiertelność drobiu, a co za tym idzie redukuje liczbę zwierząt przeznaczonych do utylizacji) oraz w następstwie ograniczenia konieczności stosowania chemicznych środków dezynfekcyjnych również przyczynia się ochrony środowiska naturalnego.

Nieoczekiwanie okazało się, że wprowadzenie do diety kurcząt wymienionych bakteriocyn może pozwolić ponadto na ograniczenie, lub nawet doprowadzić do całkowitego wyeliminowania, konieczności stosowania antybiotyków leczniczych, których pozostałości często niestety stwierdza się w mięsie drobiowym i jajach. Tym samym wprowadzenie do obrotu handlowego bezpiecznych i bardzo skutecznych zamienników antybiotyków – którymi mogą być preparaty diwercyny i nizyny (oraz innych pozyskanych bakteriocyn) powinno przyczynić się do wzrostu konkurencyjności polskich producentów przetwórców drobiu na rynku wspólnotowym.

Przedmiotem wynalazku jest dodatek paszowy o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych ograniczający aktywność endogennej mikroflory przewodu pokarmowego zwłaszcza *Listeria*, *Salmonella* i *Clostridium*, charakteryzujący się tym, że zawiera w swoim składzie 10-90% wagowych nieoczyszczonych preparatów bakteriocyn, zwłaszcza diwercynę i/lub oczyszczone preparaty bakteriocyn.

Korzystnie, gdy dodatek jako składnik A zawiera bakteriocyny bakterii *C. divergens* AS7 oraz ich bakteriobójcze metabolity, zwłaszcza diwercynę.

Korzystnie, gdy dodatek jest w formie nieutralnej, czyli w postaci płynów pofermentacyjnych lub ich ultrafiltratów i dodawany jest bezpośrednio do mieszanek

paszowych lub wody, lub w formie utrwalonej w postaci preparatów liofilizowanych lub suszonych rozpyłowo, lub w formie utrwalonej z nośnikiem lub w postaci otoczkowanych nieutrwalonych i/lub utrwalonych preparatów bakteriocyn.

Korzystnie, gdy dodatek przeznaczony jest dla drobiu grzebiącego, pływającego i ptaków ozdobnych.

Kolejnym przedmiotem wynalazku jest mieszanka paszowa uzupełniająca na bazie typowych składników paszowych zawierająca dodatek paszowy o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych, ograniczający aktywność endogennej mikroflory przewodu pokarmowego zwłaszcza *Listeria*, *Salmonella* i *Clostridium*, charakteryzująca się tym, że zawiera dodatek określony powyżej w ilości od 0,1-2% wagowych i/lub metabolity antybakteryjne w ilości 0,1-2% wagowych oraz 99,1-98% wagowych składników pochodzenia roślinnego, zawierających 20-30% otrąb pszennych lub kukurydzianych, 10-40% glutenu kukurydzianego; 2-20% kredy pastewnej; 5-15% pszenicy; 5-15% kukurydzy; 1-4% oleju roślinnego.

Korzystnie, gdy składniki pochodzenia roślinnego obejmują ziarno, jak jęczmień, kukurydza, pszenica, otręby, jak pszenne, owsiane w ilości 0-60%, śruta pszenna w ilości 0-30%, mączkę nasion oleistych w ilości 0-30%, melasa w ilości 0-10%, składniki mineralne w ilości 0-10% i olej roślinny w ilości 0-5%.

Korzystnie, gdy mieszanka jako składnik zawiera surowce poekstrakcyjne, podestylacyjne i odsiewy z produkcji zielarskiej.

Korzystnie, gdy mieszanka jest przeznaczona dla drobiu grzebiącego i wodnego oraz ptaków ozdobnych.

Korzystnie, gdy mieszanka ogranicza aktywności endogennej mikroflory, zwłaszcza *Listeria*, *Salmonella* i *Clostridium*.

Kolejnym przedmiotem wynalazku jest zastosowanie dodatku paszowego o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych, ograniczający aktywność endogennej mikroflory przewodu pokarmowego zwłaszcza *Listeria*, *Salmonella* i *Clostridium*, jak określono powyżej do wytwarzania mieszanki paszowej dla drobiu grzebiącego, wodnego i ptaków ozdobnych.

Korzystnie, gdy dodatek jest w formie nieutrwalonej, czyli w postaci płynów pofermentacyjnych lub ich ultrafiltratów i dodawany jest bezpośrednio do mieszanek paszowych lub wody, lub w formie utrwalonej w postaci preparatów liofilizowanych lub suszonych rozpyłowo, lub w formie utrwalonej z nośnikiem lub w postaci otoczkowanych nieutrwalonych i/lub utrwalonych preparatów bakteriocyn.

Kolejnym przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania dodatku paszowego o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych ograniczającego aktywność endogennej mikroflory przewodu pokarmowego, charakteryzujący się tym, że dodatek określony powyżej wytwarza się w formie nieutrwalonej, czyli w postaci płynów pofermentacyjnych lub ich ultrafiltratów i dodawany jest bezpośrednio do mieszanek paszowych lub wody, lub w formie utrwalonej w postaci preparatów liofilizowanych lub suszonych rozpyłowo, lub w formie utrwalanej z nośnikiem lub w postaci otoczkowanych nieutrwalonych i/lub utrwalonych preparatów bakteriocyn.

## **Przykłady**

### **Przykład I**

#### **Zakres aktywności diwercyny – aktywność preparatów diwercyny w warunkach *in-vitro***

#### **Materiały i metody**

##### **Mikroorganizmy**

Jako mikroorganizmy wskaźnikowe do oznaczania aktywności diwercyny stosowano bakterie *Listeria monocytogenes* Scott A, 537, 540, 845, 4A i 50034, *Listeria innocua* F, *Carnobacterium piscicola* V1, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus sake*, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactooccus lactis* subsp. *cremoris*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus thermophilus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium tyrobutyricum*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas fluorescens* pochodzące z Kolekcji Kultur Katedry biotechnologii i Mikrobiologii w Poznaniu. Wymienione bakterie hodowano w bulionie wzbogaconym (BTL, Łódź) w temperaturach optymalnych dla ich wzrostu.

##### **Diwercyna**

Diwercyna została otrzymana według technologii opracowanej przez Sip i Grajek (zgłoszenie patentowe P-369984 z dnia 9.09.2004 r.) z *C. divergens* AS7 (Depozyt w Kolekcji Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych, IBPRS Warszawa, z dnia 07.09.2004, nr depozytu KKP 2012p). W badaniach stosowano jej wodne roztwory o aktywności 819 200 AU/ml oznaczonej względem bakterii *C. piscicola*. Roztwory te przechowywano w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$  i łagodnie rozmrażano w temperaturze pokojowej.

### Oznaczanie aktywności diwercyny

Aktywność preparatów diwercyny w stosunku do poszczególnych bakterii oznaczano metodą punktowo dyfuzyjną. Za wynik dodatni przyjmowano pojawienie się stref przejaśnień o średnicy większej niż 10 mm.

Wrażliwość różnych szczepów *Listeria* na działanie diwercyny określano przy użyciu metody krytycznych rozcieńczeń [Pilet i in. 1995].

### Wyniki

#### Wrażliwość różnych szczepów *Listeria* sp. na działanie diwercyny

Przeprowadzone badania, których wyniki przedstawiono w tabeli 1 wykazały, że wrażliwość różnych szczepów bakterii z rodzaju *Listeria* na działanie diwercyny jest zróżnicowana. Diwercyna jest najbardziej aktywna względem najsilniej patogennych bakterii *Listeria monocytogenes* Scott A (1 638 400 AU/ml). Dwukrotnie niższą aktywność wykazuje ona w stosunku do bakterii *Listeria monocytogenes* 537, *Listeria monocytogenes* 540, *Listeria monocytogenes* 845, *Listeria monocytogenes* 4A oraz *Listeria innocua* F. Najslabiej działa ona natomiast na bakterie *Listeria monocytogenes* 50034. Oznacza to tym samym, że bakterie te są najbardziej odporne na działanie diwercyny.

#### Zakres aktywności diwercyny

Ustalono, że w warunkach *in-vitro* diwercyna działa bakteriobójczo na bakterie *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Enterococcus faecalis* oraz na niektóre szczepy bakterii *Carnobacterium piscicola*, *Carnobacterium divergens*, *Clostridium tyrobutiricum* oraz *Clostridium prefringens*. Nie jest natomiast aktywna w stosunku do bakterii fermentacji mlekowej z rodzajów *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* i *Pediococcus* oraz bakterii gram ujemnych (tabela 2).

**Tabela 1. Aktywność standardowego roztworu diwercyny w stosunku do bakterii z rodzaju *Listeria***

Badane bakterie	Aktywność diwercyny produkowanej przez <i>C. divergens</i> AS7 [AU/ml]
<i>Listeria monocytogenes</i> Scott A	1 638 400
<i>Listeria monocytogenes</i> 537	819 200
<i>Listeria monocytogenes</i> 540	819 200
<i>Listeria monocytogenes</i> 845	819 200
<i>Listeria monocytogenes</i> 50034	409 600
<i>Listeria monocytogenes</i> 4A	819 200
<i>Listeria innocua</i> F	819 200

**Tabela 2. Zakres aktywności diwercyny**

Szczepy wskaźnikowe	aktywność
<i>Carnobacterium divergens</i> V41	-
<i>Carnobacterium piscicola</i> V1	+
<i>Lactobacillus curvatus</i>	-
<i>Lactobacillus sake</i>	-
<i>Lactobacillus plantarum</i>	-
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	-
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	-
<i>Pediococcus acidilactici</i>	-
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	+
<i>Lactococcus thermophilus</i>	-
<i>Listeria innocua</i> F	+
<i>Listeria monocytogenes</i> 537	+
<i>Listeria monocytogenes</i> 540	+
<i>Listeria monocytogenes</i> 545	+
<i>Listeria monocytogenes</i> 50034	+
<i>Listeria monocytogenes</i> 4A	+
<i>Bacillus cereus</i>	-
<i>Clostridium tyrobutyricum</i> ATCC 25755	+
<i>Clostridium perfringens</i>	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	-
<i>Escherichia coli</i>	-

„+” szczepy wrażliwe, „-” szczepy odporne na działanie diwercyny

## Przykład II

### Wpływ diwercyny na wyniki odchowu, liczebności i aktywności endogennej mikroflory przewodu pokarmowego kurcząt rzeźnych

#### Doświadczenie 1

Celem przeprowadzonych badań było określenie wpływu dodatku diwercyny na wyniki odchowu kurcząt rzeźnych, wybrane populacje endogennej mikroflory jelitowej oraz jej aktywność wyrażoną jako koncentracja krótko-łańcuchowych kwasów tłuszczowych w treści pokarmowej kurcząt.

#### Materiał i metody

W celu zbadania wpływu diwercyny przeprowadzono doświadczenie wzrostowe w kojcach na 300 jednodniowych kogutkach ROSS 308 w 15 powtórzeniach po 10 osobników/grupę. Ptaki podzielono losowo na grupę kontrolną z udziałem kokcydiostatyku jonoforowego – salinomycyny w ilości 60 ppm (S); kontrolną C- bez dodatku diwercyny i z grupę doświadczalną D- z dodatkiem diwercyny. Celem zastosowania dodatkowej grupy kontrolnej (S) jest udokumentowane działanie bakteriostatyczne salinomycyny (Bjerrum et al., 2006; Engberg et al., 2000; Johansen et al., 2007). Kurczęta przez cały okres odchowu otrzymywały diety „prowokacyjne” tj. z wysokim udziałem komponentów paszowych stymulujących rozwój niepożądaną mikroflory jelitowej np. *Clostridiaceae* (Tabela 3).

Próby treści pokarmowej (n=21) rozcieńczono w bulionie celobiozowo-glukozowym. Następnie wykonano posiew na podłoża selektywne typu MacConkey (MCC) agar w celu oznaczenia populacji potencjalnie patogennych (*Enterobacteriaceae*), MRS agar użyto dla bakterii fermentacji mlekowej (Jozefiak et al., 2008; Józefiak et al., 2007). Koncentrację krótko-łańcuchowych kwasów tłuszczowych oznaczono przy wykorzystaniu chromatografu gazowego (Józefiak et al., 2007). Różnice pomiędzy dietami były określane za pomocą testu Duncana przy poziomie istotności  $P < 0.05$ .

**Tabela 3. Skład i wartość pokarmowa diet prowokacyjnych użytych w doświadczeniach na kurczętach rzeźnych**

Komponent	Udział [%]
pszenica	32,68
jęczmień	25,00
śruta sojowa 46.8%	21,54
łój wołowy – tłuszcz zwierzęcy	3,00
smalec – tłuszcz zwierzęcy	5,37
śruta rzepakowa	6,00
mączka rybna 70%	3,00
fosforan jedno wapniowy	1,10
bro starter 1% px	1,00
kreda pastewna	0,42
L-lizyna HCl 98	0,28
sól (NaCl)	0,26
DL-metionina 99	0,21
węglan sodu ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )	0,10
L-treonina	0,03

Wartość Pokarmowa Receptury		
białko surowe	%	22,000
tłuszcz surowy	%	9,996
włókno surowe	%	3,453
sucha masa	%	88,631
popiół surowy	%	5,160
sól - NaCl	%	0,448
sód - Na	%	0,1700
wapń – Ca	%	0,850
fosfor ogólny	%	0,703
lizyna	%	1,300
metionina	%	0,550
cystyna	%	0,381
treonina	%	0,815
tryptofan	%	0,273
arginina	%	1,312
fosfor re	g/kg	4,2000
AMEn	Kcal/kg	3105,7634
DEB	(MEq/kg)	205,9223

### Wyniki i dyskusja

Dodatek diwercyny spowodował poprawę wyników odchowu kurcząt porównywalną z grupą, w której zastosowano kokcydiostatyk jonoforowy - salinomycynę (Tabela 3). W całym okresie tuczu (1-35d) przyrosty masy ciała ptaków były istotnie statystycznie wyższe w porównaniu do grupy kontrolnej (C). W porównaniu do grupy kontrolnej dodatek diwercyny do diet spowodował obniżenie wartości pH w treści wola ( $P=0.001$ ) oraz jelit ślepych ( $P=0.043$ ). Bez względu na rodzaj użytych podłoży selektywnych oraz odcinek układu pokarmowego zaobserwowano tendencje w obniżeniu populacji endogennej mikroflory (Tabela 5). Jednakże tylko w wolu i jelitach ślepych, w przypadku bakterii fermentacji mlekowej różnice te potwierdzono statystycznie. W porównaniu do grupy kontrolnej w grupie doświadczalnej stwierdzono obniżenie koncentracji kwasu octowego, mlekowego i bursztynowego w treści wola, jelit cienkich i ślepych. Różnice te potwierdzono statystycznie w przypadku kwasu mlekowego i bursztynowego w wolu i jelicie cienkim (Tabela 6). W jelitach ślepych w grupie doświadczalnej w porównaniu do grupy kontrolnej stwierdzono również obniżenie koncentracji kwasu masłowego, izomasłowego, walerianowego i izowalerianowego. We wszystkich badanych odcinkach

stwierdzono spadek koncentracji krótko-łańcuchowych kwasów tłuszczowych jednakże nie były to różnice potwierdzone statystycznie (Tabela 6).

**Tabela 4. Wyniki odchowu kurcząt rzeźnych żywionych z udziałem kokcydiostatyku jonoforowego (salinomycyna); bez dodatków paszowych (kontrola) i z udziałem diwercyny**

	Dieta		
	Salinomycyna (S)	Kontrola (C)	Diwercyna (D)
Wskaźnik wykorzystania paszy	(g paszy/g przyrostu)		
1 – 14 d	1.48 <sup>b</sup>	1.55 <sup>a</sup>	1.49 <sup>ab</sup>
14 – 35 d	1.60	1.67	1.67
1 – 35 d	1.58 <sup>b</sup>	1.65 <sup>a</sup>	1.61 <sup>ab</sup>
Przyrost masy ciała	(g/ptak)		
1 – 14 d	328.23 <sup>a</sup>	303.59 <sup>b</sup>	319.90 <sup>a</sup>
14 – 35 d	1474.30 <sup>a</sup>	1360.28 <sup>b</sup>	1412.63 <sup>ab</sup>
1 – 35 d	1802.53 <sup>a</sup>	1663.87 <sup>c</sup>	1732.53 <sup>b</sup>
Pobranie paszy	(g/ptak)		
1 – 14 d	484.07	468.86	476.20
1 – 35 d	2837.87 <sup>a</sup>	2736.99 <sup>b</sup>	2790.33 <sup>b</sup>

**Tabela 5. Populacje endogennej mikroflory jelitowej oraz wartość pH w różnych odcinkach przewodu pokarmowego kurcząt rzeźnych**

	Dieta		
	Salinomycyna (S)	Kontrola (C)	Diwercyna (D)
Wole			
MCC	6.978	7.080	6.554
MRS	7.918	7.932	7.406
pH	4.33 <sup>a</sup>	3.94 <sup>b</sup>	4.31 <sup>a</sup>
Jelito cienkie			
MCC	6.486	6.286	6.238
MRS	7.898 <sup>a</sup>	7.722 <sup>a</sup>	7.026 <sup>b</sup>
pH	6.28 <sup>a</sup>	5.14 <sup>b</sup>	5.55 <sup>b</sup>
Jelita ślepe			
MCC	7.882	7.706	7.126
MRS	9.244 <sup>a</sup>	8.532 <sup>b</sup>	8.000 <sup>b</sup>
pH	5.49 <sup>b</sup>	5.78 <sup>a</sup>	5.52 <sup>b</sup>

**Tabela 6. Koncentracja krótko-łańcuchowych kwasów tłuszczowych w różnych odcinkach przewodu pokarmowego kurcząt rzeźnych**

	Dieta		
	Salinomycyna (S)	Kontrola (C)	Diwercyna (D)
<b>Wole</b>			
Mrówkowy	ND	ND	ND
Octowy	11.27	26.83	11.41
Propionowy	0.21	ND	ND
Izomasłowy	ND	ND	ND
Masłowy	0.23	0.65	0.71
Izowalerianowy	ND	ND	ND
Walerianowy	ND	ND	ND
Mlekowy	55.27 <sup>b</sup>	119.12 <sup>a</sup>	52.03 <sup>b</sup>
Bursztynowy	2.76 <sup>b</sup>	8.67 <sup>a</sup>	3.19 <sup>b</sup>
<i>Suma</i>	69.74	155.27	67.34
<b>Jelito cienkie</b>			
Mrówkowy	ND	ND	ND
Octowy	5.77	6.14	4.18
Propionowy	ND	ND	ND
Izomasłowy	ND	ND	ND
Masłowy	0.17	ND	ND
Izowalerianowy	ND	ND	ND
Walerianowy	ND	ND	ND
Mlekowy	34.49 <sup>c</sup>	114.06 <sup>a</sup>	72.37 <sup>b</sup>
Bursztynowy	0.23 <sup>b</sup>	2.04 <sup>a</sup>	0.68 <sup>b</sup>
<i>Suma</i>	40.66	122.24	77.23
<b>Jelita ślepe</b>			
Mrówkowy	ND	ND	ND
Octowy	86.55	92.01	79.65
Propionowy	18.37	16.81	18.43
Izomasłowy	0.88	1.19	0.98
Masłowy	19.80	23.18	19.45
Izowalerianowy	0.50	0.55	0.49
Walerianowy	3.36	2.90	2.72
Mlekowy	ND	ND	ND
Bursztynowy	ND	4,35	1.32
<i>Suma</i>	129.46	140.99	123.04

ND – nie stwierdzono obecności

## **Doświadczenie 2**

Celem przeprowadzonych badań było określenie wpływu dodatku diwercyny na strawność jelitową białka ogólnego i tłuszczu surowego. Dodatkowo oznaczono jelitową i całkowitą wartość pozornej energii metabolicznej (AMEn) retencję azotu oraz całkowitą strawność tłuszczu.

### **Materiał i metody**

W celu zbadania wpływu diwercyny przeprowadzono doświadczenie wzrostowe w kojcach na 300 jednodniowych kogutkach ROSS 308 w 15 powtórzeniach po 10 osobników/grupę. Ptaki podzielono losowo na grupę kontrolną z udziałem kokcydiostatyku jonoforowego – salinomycyny w ilości 60 ppm (S); kontrolną C- bez dodatku diwercyny i z grupę doświadczalną D- z dodatkiem diwercyny.

W tym celu dodano 0.3% dwutlenku tytanu (TiO<sub>2</sub>) jako wskaźnik do wszystkich diet doświadczalnych. W 28 dniu życia były zebrane odchody ok. 50 g z każdego powtórzenia i niezwłocznie zamrożone w celu wykonania dalszych analiz laboratoryjnych. Próby były zliofilizowane (Christ 1825 Medizinische apparatebau §326 Osterode/Harz). Następnie zebrane odchody oraz użyte diety doświadczalne były zmielone przy pomocy młynka laboratoryjnego o wielkości sita 1mm. Tak przygotowany materiał badawczy był poddany analizie na zawartość dwutlenku tytanu zgodnie z metodyką (Short i in., 1996). I tak 100 mg próby były poddane spalaniu w temperaturze 580°C przez 13 godzin a następnie gotowaniu w roztworze kwasu siarkowego. Po przeprowadzeniu filtracji roztworów i dodaniu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intensywność powstałego zabarwienia będzie określana przy pomocy spektrofotometru absorpcyjnego przy długości fali 410 nm w stosunku do próby ślepej. Na podstawie zawartości TiO<sub>2</sub>, składników pokarmowych oraz energii brutto w odchodach i dietach obliczone zostały współczynniki pozornej strawności całkowitej, retencji azotu oraz AME i AMEn użytych diet.

### **Wyniki i dyskusja**

W porównaniu do grupy kontrolnej zastosowanie diwercyny zwiększyło wartość pozornej energii metabolicznej w jelicie cienkim kurcząt rzeźnych (2779 vs 2396 kcal). Pomimo, że nie była to różnica istotna statystycznie to należy się spodziewać istotnego wpływu na wyniki odchowu kurcząt rzeźnych a szczególnie współczynnik wykorzystania (FCR). Dodatkowo wartość AMEn w mieszankach przemysłowych dla drobiu jest jednym z głównych czynników wpływających na ich koszt surowcowy. Na

podstawie uzyskanych wyników można wnioskować, że zastosowanie diwercyny wpływa istotnie na obniżenie kosztów produkcji pasz dla kurcząt rzeźnych.

W omawianym doświadczeniu bilansowym stwierdzono również tendencję w poprawie strawności jelitowej białka ogólnego (Tabela 7), co również należy rozpatrywać jako pozytywny aspekt stosowanie diwercyny.

**Tabela 7. Wyniki testu bilansowego na kurczętach rzeźnych**

	Dieta		
	Salinomycyna (S)	Kontrola (C)	Diwercyna (D)
	(kcal)		
AMEn	3239.40 <sup>a</sup>	2892.60 <sup>b</sup>	2899.20 <sup>b</sup>
AMEn (j. cienkie)	3074.0 <sup>a</sup>	2396.2 <sup>b</sup>	2779.0 <sup>ab</sup>
	(%)		
Strawność białka ogólnego (j. cienkie)	73.596 <sup>a</sup>	62.324 <sup>b</sup>	69.748 <sup>ab</sup>
Retencja azotu	48.580 <sup>a</sup>	36.586 <sup>b</sup>	40.142 <sup>ab</sup>
Strawność tłuszczu surowego (j. cienkie)	91.66	67.11	68.88
Strawność tłuszczu surowego	89.574 <sup>a</sup>	75.716 <sup>b</sup>	71.728 <sup>b</sup>

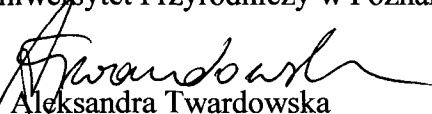
### Podsumowanie

- 1. Obiekt działania bakteriocyn** – patogenna mikroflora układu pokarmowego drobiu. Suplementacja pasz diwercyną w formie wolnej i/lub otoczkowanej zmniejsza liczebność mikroorganizmów chorobotwórczych w układzie pokarmowym drobiu.
- 2. Skutki działania bakteriocyn** czyli wprowadzenia do pasz dla drobiu preparatów diwercyny. Rezultatem regulacji składu mikroflory przewodu pokarmowego drobiu i wykluczenia z niego lub zmieszenia w nim udziału określonych grup drobnoustrojów chorobotwórczych, zwłaszcza bakterii z rodzaju *Salmonella*, *Campylobacter*, *Listeria* i *Clostridium* jest:
  - poprawa zdrowotności i dobrostanu kurcząt rzeźnych (ograniczenie ich śmiertelności oraz zmniejszenie zachorowalności na choroby układu pokarmowego);
  - poprawa efektów produkcyjnych kurcząt rzeźnych (wyników odchowu)-polepszenie retencji składników pokarmowych (zwiększenie przyrostów masy) oraz wykorzystania mieszanek paszowych (zmniejszenie zużycia paszy);

- zmniejszenie ryzyka występowania drobnoustrojów chorobotwórczych w produktach drobiowych – poprawa jakości mikrobiologicznej produktów drobiowych;
- ograniczenie ryzyka zakażenia ludzi bakteriami chorobotwórczymi występującymi w przewodzie pokarmowym drobiu;
- zwiększenie bezpieczeństwa mikrobiologicznego produktów drobiowych dla ich konsumentów;
- ograniczenie stosowania antybiotyków lub całkowite ich wyeliminowanie;
- ograniczenie zanieczyszczeń wprowadzanych do środowiska w następstwie produkcji drobiarskiej;
- w związku z tym, że stosowano nieoczyszczone preparaty zawierają one śladowe ilości również innych synergistycznie działających metabolitów.

Zgłaszający: Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Pełnomocnik:

  
dr Aleksandra Twardowska  
Rzecznik patentowy

## Literatura

Bjerrum, L., R. M. Engberg, T. D. Leser, B. B. Jensen, K. Finster, and K. Pedersen. 2006. Microbial community composition of the ileum and cecum of broiler chickens as revealed by molecular and culture-based techniques. *Poult. Sci.* 85:1151-1164.

Engberg, R. M., M. S. Hedemann, T. D. Leser, and B. B. Jensen. 2000. Effect of zinc bacitracin and salinomycin on intestinal microflora and performance of broilers. *Poult. Sci.* 79:1311-1319.

Johansen, C. H., L. Bjerrum, and K. Pedersen. 2007. Impact of salinomycin on the intestinal microflora of broiler chickens. *Acta Vet. Scand.* 49:30.

Jozefiak, D., S. Kaczmarek, and A. Rutkowski. 2008. The effects of benzoic acid supplementation on the performance of broiler chickens. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*.

Józefiak, D., A. Rutkowski, B. B. Jensen, and R. M. Engberg. 2007. Effects of dietary inclusion of triticale, rye and wheat and xylanase supplementation on growth performance of broiler chickens and fermentation in the gastrointestinal tract. *Anim. Feed Sci. Technol.* 132:79-93.