



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2017 00997

(22) Data de depozit: 28/11/2017

(41) Data publicării cererii:
28/06/2019 BOPI nr. 6/2019

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
BIOLOGIE ȘI NUTRIȚIE ANIMALĂ - IBNA
BALOTEȘTI, CALEA BUCUREȘTI NR. 1,
BALOTEȘTI, IF, RO

(72) Inventatori:
• CRISTE RODICA DIANA,
STR.VALEA IALOMIȚEI NR.2A, BL.417,
SC.D, AP.151, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,
RO;
• PANAITA TATIANA DUMITRA,
BD. IULIU MANIU NR. 71, BL. 4, SC. 2,
AP. 56, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• TABUC CRISTINA,
BD.CONSTRUCTORILOR NR.11, SC.B,
ET.4, AP.37, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,
RO;

• VLAICU PETRU-ALEXANDRU,
STR.JOHANN SEBASTIAN BACH NR.9,
AP.1, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;
• SĂRĂCILĂ MIHAELA, STR.AUREL
VLAICU NR. 37, GIURGIU, GR, RO;
• OLTEANU MARGARETA, ȘOS.
PANTELIMON NR. 92, BL. 211, AP. 9,
SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;
• TURCU RALUCA PAULA, BD.IULIU
MANIU NR.52-72, BL.4, SC.A, ET.1, AP.5,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• PAPUC CAMELIA PUIA, BD. UVERTURII
NR.87, BL.O 14 A, SC.C, ET.3, AP.61,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

(54) REȚETĂ FURAJERĂ PENTRU FAZA DE CREȘTERE
A PUILOR DE CARNE CRESCUȚI ÎN STRES TERMIC
RIDICAT

(57) Rezumat:

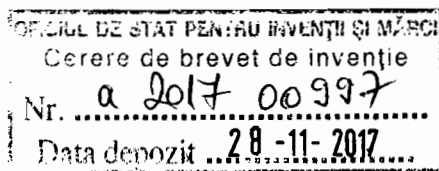
Invenția se referă la o compoziție furajeră pentru faza de creștere (14...35 zile) a puilor de carne crescuți în condiții de stres termic ridicat. Compoziția, conform invenției, este constituită în procente masice din 1% pulbere obținută din planta întreagă uscată de *Artemisia annua*, 0,005% ulei de *Artemisia annua*, precum și, în

rest, furaje convenționale, având un conținut de 87,94% substanță uscată, 22,32% proteină brută și 3140,03 kcal/kg energie metabolizabilă.

Revendicări: 2

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





RETETA FURAJERA PENTRU FAZA DE CREȘTERE A PUILOR DE CARNE CREȘCUTI IN STRES TERMIC RIDICAT

DESCRIEREA INVENȚIEI

Domeniul tehnic la care se referă invenția: Zootehnie

Invenția se referă la o nouă rețetă furajera pentru faza de creștere (14-35 zile) a puilor de carne crescuți în condiții de stres termic ridicat (32⁰ C) prin care, față de o rețetă convențională, se pot atenua efectele adverse ale stresului termic ridicat asupra performanțelor productive și asupra echilibrului microflorei intestinale.

Una dintre cele mai mari provocări pentru producția animală în secolul XXI este și va fi să asigure suficiente alimente sănătoase pentru populația în creștere a globului pământesc. Cererea pentru alimentele de origine animală (surse de proteină) constituie o provocare pentru nutriția și producția animală. Producția de carne în UE a crescut pentru al patrulea an consecutiv cu + 1,7% în 2016 față de 2015. Acest lucru se datorează, în principal, creșterii semnificative a producției carnii de pasare (+ 4,4%). Prin comparație cu situația din 2015, în anul 2050 cererea de alimente de origine animală va crește cu 100% (FAO, 2015). Dezvoltarea industriei avicole este mai rapidă decât alte segmente ale producției din sectorul zootehnic. Datele disponibile pe parcursul primului deceniu din secolul XXI indică faptul că industria producătoare de carne de pasare a fost mai dinamică decât industria producătoare de ouă.

În prezent, în cale dezvoltării producției de carne de pui există două mari dezavantaje legate de folosirea rețetelor furajere convenționale. În primul rând stresul termic ridicat care constituie o preocupare majoră a întregii industrii avicole deoarece provoacă pierderi economice majore. Datorită performanțelor de producție ridicate precum și a eficienței în conversia hranei, puii de astăzi sunt foarte sensibili la stresul termic. În cazul puilor crescuți în stres termic ridicat, furajați cu rețete convenționale, sunt afectate negativ consumul de furaje, sporurile de greutate, conversia hranei, producția de carne și echilibrul florei intestinale. Menținerea echilibrului microflorei intestinale, în esență menținerea sănătății tractusului digestiv, constituie o condiție esențială pentru producția de carne iar folosirea rețetelor furajere convenționale constituie al doilea dezavantaj cauzat de interzicerea folosirii

antibioticelor ca promotori de crestere in hrana pasarilor (January 1, 2006, EC regulation No. 1831/20031).

In acest context, furajarea puilor de carne cu retete furajere noi care sa raspunda limitarilor impuse de anumite situatii specifice de crestere, constituie calea naturala cu efect direct in diminuarea pierderilor economice prin mentinerea sanatatii tractusului digestiv iar cercetarile cu aceasta tematica au devenit o prioritate in domeniul cercetarii zootehnice. Interzicerea folosirii antibioticelor a aparut pe fundalul ingrijorarii si preocuparii consumatorilor cu privire la utilizarea acestora in hrana pasarilor, inclusiv contaminarea cu reziduuri a alimentelor obtinute de la pasari si a agenților patogeni bacterieni rezistenți la antibiotice. Din aceste motive, suplimentarea ratiilor cu aditivi fitogenici vegetali (plante, extracte din plante si /sau amestecuri botanice) castiga tot mai mult teren in nutritia pasarilor.

Problema tehnica pe care o rezolva inventia revendicata consta in folosirea unei noi retete furajere pentru faza de crestere (14-35 de zile) a puilor crescuti in stres termic ridicat (32°C), care poate atenua efectele adverse ale stresului termic ridicat asupra performantelor productive si asupra echilibrului microflorei intestinale. Fata de o reteta conventionala, noua reteta propusa pentru brevetare este suplimentata cu un amestec de fitoaditivi format din ulei si pudra de artemisia. Suplimentarea retetelor furajere cu aditivi fitogenici, care contin substante fitochimice abundente, multe cu caracter antioxidant, este o abordare fezabilă in mod satisfăcător pentru ameliorarea efectelor dăunătoare ale animalelor crescute conditii extreme.

Avantajele pe care le prezinta inventia revendicata se refera la o reteta furajera care asigura echilibru microflorei intestinale si astfel are un impact semnificativ asupra performantelor puilor (14-35 de zile) crescuti in stres termic ridicat. Reteta contine ulei si pudra de artemisia (*Artemisia annua*), planta care are in compozitie sesquiterpenoide, flavonoide, cumarine, lipide, fenoli, purine, steroizi, triterpenoide, alifatici și artemisinin. Un mare avantaj al prezentei artemisinei este marja mare de siguranță la folosirea in hrana pasarilor. Chiar și la doze orale unice si mari, artemisina are puține efecte secundare adverse la puii de carne. Artemisina este cunoscuta ca avand efecte antibacteriene, antifungice, antileishmanial, antioxidante, antitumorale și activitate anti-inflamatoare.

Inventia revendicata poate fi obtinuta la scara industrială fiind adresata producatorilor de furaje in vederea diversificarii productiei in conditiile asigurarii de furaje, fara antibiotice, dedicate pasarilor crescute in stres termic ridicat (32°C). Prin folosirea uleiului de artemisia

in combinatie cu pudra obtinuta din planta intreaga uscata, care este mai ieftina, se diminueaza costurile furajului fabricat noii retete furajere propusa pentru brevetare.

In prezent, cererea pentru alimentele de origine animala constituie o provocare pentru nutritia si productia animala care trebuie sa urmareasca nu numai cantitatile obtinute dar si cerintele societale. Aceste cerinte se focalizeaza pe calitate, produs sigur, efectele asupra sanatatii consumatorului, bunastarea animalelor si protejarea mediului inconjurator (Magnin si Picot, 2015). In acest context, cercetarea si inovarea din nutritia animala sunt fundamentale in sustinerea sectorului cresterii animalelor din UE si reprezinta cea mai profitabila investitie pentru acest sector industrial (Caprarulo si colab., 2015). Performantele de productie mai mari si eficienta conversiei hranei pentru animale, fac puii de astazi mai sensibili decat oricand la stresul termic (Lin et al., 2006). Incalzirea globala creste frecventa, intensitatea si agraveaza impactul negativ al stresului termic. Si chiar animalele din mediul artificial sunt expuse diferitelor provocari, inclusiv stresului termic (Wan et al., 2017). Principala consecinta a expunerii la stres termic o reprezinta reducerea consumului de hrana pentru a reduce producerea caldurii metabolice. Aceasta reducere este de aproximativ 17% pentru o crestere a temperaturii ambiante cu 10° C (Austic, 1985). Totodata, scaderea consumului de furaje conduce la reducerea ratei de crestere (Geraert et al., 1996). Tractusul gastrointestinal este considerat unul dintre organele principal afectate de stresul termic (Song et al., 2017). O microbiota intestinala echilibrata este necesara pentru a sprijini sanatatea si cresterea. Cresterea excesiva a agentilor microbieni intestinali sau a agentilor patogeni poate schimba echilibrul ecosistemului si poate compromite integritatea intestinului declansand complicatii gastro-intestinale (Helieh S. Oz., 2017). Afectarea sanatatii intestinului poate influenta intreaga sanatate a animalului si, prin urmare, poate modifica absorbtia nutrientilor si cerintele acestuia (Choct, 2009).

Deoarece folosirea antibioticelor a fost vehement condamnată de către asociațiile de consumatori, precum și de mai mulți oameni de știință, nutrețurile fără aditivi chimici sunt tot mai folosite în hrana pasărilor (Demir, 2005). Mai multe studii au scanat posibilele alternative la antibiotice: folosirea probioticelor, a acizilor organici, oligozaharidelor, materialelor simbiotice, acizilor grași cu lant catenic scurt sau mediu, materialelor botanice sau extractelor din plante, fibrelor functionale, Cu, Zn (Maguin si Picot, 2015). Aditivii furajeri de origine vegetală sunt plante sau derivate din plante care au efect benefic asupra producției și sănătății animalelor (Peric si colab., 2010). Aditivii fitogenici care conțin fenoli și flavonoizi pot îmbunătăți rezistența puilor la stresul termic (Song et al., 2017). În ultimele decenii, folosirea

aditivilor fitogenici sau a aditivilor pe baza de plante în alimentația păsărilor, a câștigat o mare atenție ca posibile alternative pentru antibioticele utilizate ca promotori de creștere și care au fost interzise în hrana animalelor de către Uniunea Europeană în 2006 (Cherian et al., 2013). Cercetările pentru noi antioxidanți bio-eficienți s-au concentrat în mod special asupra antioxidanților naturali pentru a respecta preocupările consumatorilor cu privire la siguranță și toxicitate (Brenes et al., 2010).

Rațiile suplimentate cu aditivi fitogenici, care conțin substanțe fitochimice abundente pot fi utilizate ca promotori de creștere și antioxidanți și reprezintă o abordare fezabilă, pentru ameliorarea efectelor dăunătoare animalelor crescute în condiții dificile (Akbarian și colab., 2016). Fitoaditivii sunt compuși bioactivi benefici pentru procesul de creștere și pentru sănătate (Tuorkey, 2015). Se considera ca în special compușii fenolici și flavonoidele din plante sunt principalii compuși cu rol antioxidant (Shahidi et al., 1992, Pietta 2000). Interesul nutrițional pentru compușii polifenolici a crescut foarte mult în lumina activității lor antioxidante (Scalbert și Williamson, 2000).

Printre fitoaditivii studiați ca alternativă naturală la folosirea antibioticelor se numără și *Artemisia annua*. Această plantă a fost folosită ca un medicament popular pentru tratamentul unui număr mare de boli. O varietate de compuși au fost extrasi din *Artemisia annua* L., cum ar fi sesquiterpenoide, flavonoide, cumarine, lipide, fenoli, purine, steroizi, triterpenoide, compuși alifatici și artemisinin (Bhakuni et al., 2001). Remarcabil, printre cei 32 de polifenoli caracterizați în diferite părți ale țesutului vegetal, inclusiv flori, frunze, tulpini și rădăcini, 10 compuși au fost detectați (Song et al., 2016). *Artemisia annua* este o plantă aromatică anuală aparținând familiei *Asteraceae*. Frunzele uscate de *A. annua* au fost folosite din vechi timpuri în medicina orientală (Cherian, 2013). Plantele aparținând familiei *Asteraceae* au fost utilizate la păsări de curte și la rumegătoarele mici ca agenți anticoccidici și antiparazitari (Allen et al., 1997; Brisibe et al., 2008; Ferreira, 2009).

Principalul component al *Artemisiei annua* este artemisinină care are efecte antibacteriene, antifungice, antileishmaniale, antioxidante, antitumorale și activitate anti-inflamatoare (Efferth et al, 2006; Konkimalla et al, 2008; Ferreira et al, 2010). Cavar și colab., (2012) au demonstrat că uleiul esențial de *A. annua* posedă activitate antifungică și antimicrobiană iar Yang et al., (2009) au demonstrat că *A. annua* are un conținut bogat în polifenoli, ceea ce îi conferă o puternică activitate antioxidantă. Mai mulți autori scot în evidență acțiunea de coccidiostatic al frunzelor uscate de *Artemisia* (de Almeida et al., 2012 ; Khalaji et al., 2011) și a extractelor din această plantă (Arab et al., 2006).

Wan et al., (2016) au investigat efectele preparatului enzimatic de *Artemisia annua* in concentratii de 0,0, 0,5, 1,0 și 1,5 g / kg, in hrana broilerilor asupra performanței de creștere, calității cărnii și asupra stabilității oxidative a pieptului și a pulpei. Pe parcursul experimentului (42 zile) puii din toate loturile au avut spor mediu zilnic, consum mediu zilnic și rata de conversie a hranei similare între loturi. Aceeasi autori Wan et al., (2017) au demarat un experiment pe broileri crescuti in conditii de stres termic ($34 \pm 1^\circ \text{C}$, 8 ore / zi și $22 \pm 1^\circ \text{C}$, 16 h /zi), pentru a investiga efectele preparatului enzimatic de *Artemisia annua* prezent in dieta asupra performantelor de crestere si a parametrilor sanguini. Concluzia lor a fost ca suplimentarea dietei cu 0,75-1,25 g / kg preeparat enzymatic de *A. annua* a inlaturat efectele negative ale stresului termic asupra broilerilor (Wan et al., 2017). Engberg si colab., (2012) si Gholamrezaie si colab., (2013), au folosit pulbere de frunze uscate si, separat, extract de *Artemisia annua* in dietele administrate puilor. Engberg si colab., (2012) au observat ca introducerea a 10 si 20 g/kg frunze de *Artemisia annua* in dieta broilerilor Ross 308 (1-35 zile) tinde sa reduca consumul zilnic si sa imbunatateasca consumul specific. Gholamrezaie si colab., (2013) au demonstrat ca adaosul de pulbere din frunze sau de extract de *Artemisia annua* in dieta broilerilor Cobb 500 (1- 42 zile) scade consumul mediu zilnic, consumul specific si creste sporul mediu zilnic.

Exista insa putine studii privind efectele folosirii fitoaditivilor vegetali in hrana broilerilor care cresc in conditii de stres termic si cu atat mai putin folosirea simultana a uleiului si pulberii obtinuta din planta intreaga uscata de *Artemisia annua*. In acest context s-a realizat un studiu privind efectele folosirii unei noi retete furajere cu ulei si pulbere de *Artemisia annua* pentru furajarea puilor broileri (14-35 zile), crescuti in stres termic ridicat (32°C).

Reteta furajera pentru faza de crestere a puilor de carne crescuti in stres termic ridicat propusa pentru brevetare, a fost elaborata tinand cont de urmatoarele:

- cerintele nutritionale-pe baza cerintelor nutritionale (NRC, 1994) si a recomandarilor producatorului hibridului COBB 500 pe care s-a organizat testarea experimentală.

- cerintele specifice fazei de crestere a puilor (14-35 zile).

- s-a realizat estimarea unor parametrii preliminari privind: greutatele, consumul mediu zilnic; consumul specific.

Reteta furajera pentru faza de crestere a puilor de carne crescuti in stres termic ridicat, este structurata pe furaje conventionale (porumb, srot soia) si a inclus in mod particular ca fitoaditivi furajeri:

- pulbere obtinuta din planta intreaga uscata de *Artemisia annua* recoltata la maturitate deplina in Livezeni, Târgu-Mureş (46.55° N, 24.63° E). Pentru a obtine pulberea de *A. Annua*, plantele au fost uscate timp de 3 saptamani la intuneric la temperatura ambientala de 20°C si apoi macinate fin. Aceasta pulbere a fost caracterizata prin caracterizata printr-un continut ridicat de proteine (18.24 %) si fibre (27.61%). In ceea ce priveste continutul in substante volatile, planta de *Artemisia annua* detine concentratii semnificative de: camfor, camfen, α -pirene, eucalyptol, artemisia ketone.

- ulei de *Artemisia annua* achizitionat de la compania Jiangxu Xuesong Natural Medicinal Oil Co Ltd., China. Continutul in substante volatile determinate in acest ulei a aratat ca este bogat in artemisia ketone, camphor, eucalyptol, compusi care contribuie la activitatea antioxidanta a acestuia. Acesta contine in plus fata de planta, numerosi compusi printre care cei mai importanti sunt: α -terpinene, yomogi alcohol, artemisia alcohol, α -terpinolene, trans-pinocarveol, terpinen-4-ol, α -terpineol, estragol, α -copaene, β -caryophyllene, γ -muurolene, α -selinene. Juteau si colab., (2002) au aratat ca uleiul de *Artemisia annua* are capacitate antioxidanta echivalenta cu 18% din cea a α -tocopherol-ului. Determinarea indicilor de degradare ai grasimii din ulei au certificat calitatea necesara acestuia pentru introducerea in furaje.

Folosirea noii retete furajere, propusa pentru brevetare, intr-un experiment desfasurat pe pui de carne in faza de crestere (14- 35 zile) crescuti in stress termic ridicat (32⁰ C)

Experimentul s-a efectuat timp de 21 zile pe 60 pui din hibridul Cobb 500 (varsta 14 zile). La 14 zile, puii au fost impartiti in 2 loturi (30 pui/ lot). Pe parcursul experimentului temperatura in hala experimentală s-a mentinut la 32°C, umiditatea la 36%, lumina 23h/24 ore. In hala ventilatia/cap/animal a fost de 0,38% si emisia de CO₂ de 899 ppm, fiind sub valoarea maxima stabilita prin *Norma sanitara veterinara privind stabilirea normelor minime de protectie a puilor destinati productiei de aprobata prin Ordinul ANSVSA nr. 30/2010*.

La demararea experimentului s-a intocmit un protocol experimental care a fost aprobat de catre Comisia de etica din IBNA Balotesti infiintata prin decizia nr. 52/30.07.2014 si care functioneaza pe langa Consiliul de Administratie si Consiliul Stiintific al IBNA. Fitoaditivii

vegetali folositi in structura noii retete furajere propuse pentru brevetare au fost caracterizate din punct de vedere chimic (tabelele 1, 2,3) pentru a evalua calitatea lor de aditivi furajeri.

Tabelul 1. Date privind compozitia chimica a pulberii de *Artemisia annua*

Specificatie	Valoare
Energia metabolizabila (kcal/kg)	1511,39
Substanta uscata (%)	88,30
Proteina bruta (%)	18,24
Grasime (%)	3,04
Celuloza (%)	27,61
Cenusa (%)	8,90
Aminoacizi (%)	
Acid aspartic	1,77
Acid glutamic	1,74
Serina	0,74
Glicina	0,79
Treonina	1,26
Arginina	1,02
Alanina	0,97
Tirozina	0,53
Valina	0,89
Fenilalanina	0,78
Izoleucina	0,70
Leucina	1,32
Lizina	0,93
Cistina	0,129
Metionina	0,166
Minerale	
Ca (%)	0,58
P (%)	0,38
Cu (mg/kg)	17,50

Mn (mg/kg)	76,30
Zn (mg/kg)	24,32
Na (mg/kg)	0,007
K (mg/kg)	2,64

Datele din tabelul 1 arata un continut ridicat de proteine (18,24 %) si fibre (27,61%) pentru pulberea de *Artemisia annua*. In ceea ce priveste continutul in substante volatile, planta de *Artemisia annua* detine cantitati mai ridicate de camfor, camfen, α -pirene, eucalyptol decat uleiul essential (tabelul 2).

Tabelul 2. Compusi volatili identificati* in uleiul esential si in planta de *Artemisia annua*

Compus	Numar CAS	Ulei esential (%)	Planta (%)
α -Pinene	80-56-8	2,83	11,95
Camphene	79-92-5	2,88	22,52
Sabinene	3387-41-5	3,49	0,88
β -Pinene	127-91-3	2,56	3,55
Yomogi alcohol	30458-12-9	0,85	
α -Terpinene	99-86-5	0,15	
p-Cymene	99-87-6	0,13	3,07
Eucalyptol	470-82-6	18,62	9,28
Artemisia ketone	546-49-6	18,20	1,33
trans-Sabinene hydrate	17699-16-0	0,20	0,53
Artemisia alcohol	27644-04-8	1,25	
α -Terpinolene	586-62-9	0,12	
trans-Pinocarveol	547-61-5	0,14	
Camphor	76-22-2	11,74	46,21
Verbenone	80-57-9	0,22	
Borneol	507-70-7	1,22	0,68
Terpinen-4-ol	562-74-3	0,98	
α -Terpineol	98-55-5	0,77	
Myrtenal	564-94-3	0,28	
Estragole	140-67-0	3,69	

Thymol	89-83-8	0,21	
Eugenol	97-53-0	0,13	
α -Copaene	3856-25-5	1,50	
β -caryophyllene	87-44-5	5,79	
β -cis-Caryophyllene	118-65-0	1,17	
Humulene	6753-98-6	0,36	
γ -Gurjunene	22567-17-5	0,54	
Germacrene D	23986-74-5	0,48	
γ -Muurolene	30021-74-0	8,37	
α -Selinene	473-13-2	9,51	
α -Muurolene	31983-22-9	0,65	
δ -Cadinene	483-76-1	0,44	
Spathulenol	6750-60-3	0,32	
Caryophyllene oxide	1139-30-6	0,23	

determinari realizate, pe baza de contract la Facultatea de Chimie, Universitatea Bucuresti

Din ulei au fost determinati indicii de degradare ai grasimii (tabelul 3) iar rezultatele obtinute arata ca valorile sunt in parametrii admisi pentru includerea in furaje.

Tabelul 3. Indicii de degradare ai grasimii din uleiul de *Artemisia annua*

Specificatie	Valoare
Indicele peroxid (mL tiosulfat 0.01 N/ 1 g grasime)	1,18
Aciditatea grasimii, (mg KOH)	12,68
Reactia Kreiss	Negativa
<u>Limite maxime admise conform STAS 12266-84-metoda volumetrica</u> : indice de peroxid max 1.2 mL_tiosulfat 0.01 N/ 1 g grasime; aciditatea grasimii MAX 50 mg KOH; reactia Kreiss -negativa	

Dupa caracterizarea materiilor prime, pe baza rezultatelor obtinute in concordanta cu cerintele nutritionale (NRC, 1994) si cerintele nutritionale ale hibridului Cobb 500, au fost elaborate rețetele furajere. Puii din lotul martor au primit un nutret combinat conventional, bazat pe porumb si srot soia (tabelul 4). Noua rețeta furajera experimentata pentru lotul E a inclus 0.005 % ulei si 1% pulbere de *Artemisia annua* (tabelul 4). Apa si furajul au fost administrate ad libitum.

La fiecare sarja de furaj fabricata, pentru fiecare lot, s-au prelevat probe din care s-au facut determinari privind compozitia chimica primara, determinari bacteriologice si micologice (NTG, coliformi totali, *E. coli*, *Salmonella spp*, NTF).

Tabelul 4. Structura rețetelor furajere

Ingrediente	Faza de crestere (14 – 35 zile)	
	M	E
	%	
Porumb	62	62
Srot soia	26,58	26,58
Ulei de <i>Artemisia annua</i>	-	0,005
Pulbere de <i>Artemisia annua</i>	-	1
Gluten	4	4
Ulei vegetal	2,5	2,5
Lizina	0,47	0,48
Metionina	0,26	0,26
Colina	0,05	0,05
Carbonat de calciu	1,4	1,4
Fosfat monocalcic	1,36	1,36
Sare	0,37	0,37
Premix vitamin mineral	1	1
Total	100	100
<u>1kg premix vitamino- mineral contine:</u> = 1100000 IU/kg vit. A; 200000 IU/kg vit. D3; 2700 IU/kg vit. E; 300 mg/kg Vit. K; 200 mg/kg Vit. B1; 400 mg/kg Vit. B2; 1485 mg/kg acid pantotenic; 2700 mg/kg acid nicotinic; 300 mg/kg Vit. B6; 4 mg/kg Vit. B7; 100 mg/kg Vit. B9; 1.8 mg/kg Vit. B12;		

2000 mg/kg Vit. C; 8000 mg/kg mangan; 8000 mg/kg fier; 500 mg/kg cupru; 6000 mg/kg zinc; 37 mg/kg cobalt; 152 mg/kg iod; 18 mg/kg seleniu.

Rezultatele determinarilor privind compozitia chimica primara a celor doua nutreturi denota ca acestea au fost echilibrate din punct de vedere energo- proteic (tabelul 5). In stabilirea concentratiei in nutrienti (substanta uscata, proteina, grasime, celuloza, cenusa) s-au utilizat metodele standardizate conform *Regulamentului (CE) nr. 152/2009 privind controlul calitatii furajelor*.

Tabelul 5. Compozitia chimica primara a retetelor furajere

Specificatie	Reteta M	Reteta E
Energia metabolizabila, kcal/kg	3.140,03	3.140,03
Substanta uscata,%	88,43	87,94
Proteina bruta, %	22,72	22,32
Grasimea, %	4,68	4,98
Celuloza, %	3,85	4,03
Cenusa, %	5,85	6,63

In tabelul 6 sunt rezultatele analizelor bacteriologice si micologice efectuate pe nutreturile combinate administrate celor doua loturi (M, E). Determinarea NTG Col/g s-a efectuat conform standardului SR 13178-1; Coliformi totali/g conform SR 13178-2; E. Coli/g conform SR 13178-2; Salmonella Col/g conform SR EN 12824; NTF Col/g conform STAS 6953-81.

Tabelul 6. Analiza bacteriologica si micologica a nutreturilor combinate

Specificatie	NTG Col/g SR 13178-1	Coliformi totali/g SR 13178-2	E.coli/g SR 13178-2	Salmonella Col/g SR EN 12824	NTF Col/g STAS 6953-81
Reteta lotului M (14-35 zile)	34,5 x 10 ⁴	0,8	0	Absent	-
Reteta lotului E	39 x 10 ⁴	1.6	0,9	Absent	3500

(14-35 zile)					
Limite maxime admise: (MO 362 bis/2003): NTG: maxim 15×10^6 col/g; coliformi totali: maxim 3000 col/g; <i>E.coli</i> : maxim 100 col/g; <i>Salmonella sp.</i> : 0 col/g; NTF: maxim 5×10^4 col/g. Unde: SR= Standard romanesc; STAS= Standarde de stat; SR EN= Standarde europene.					

Valorile rețetei propuse pentru brevetare se încadrează în limitele maxime admise, reglementate de Monitorul Oficial al României 362/ 2003. În toate loturile de furaje, *Salmonella spp.* a fost absentă (tabelul 6).

Rezultate obținute în experiment privind performanțele de producție.

Pe parcursul perioadei experimentale s-au monitorizat următorii parametri: greutatea corporală (g); consumul mediu zilnic (g furaj/pui/zi); sporul mediu zilnic (g/pui/zi); consumul specific (g furaj/g spor). Mortalitatea a fost înregistrată pe parcursul întregii perioade experimentale.

Tabelul 7. Efectul utilizării *Artemisia annua* (ulei și pulbere) în dieta broilerilor (14-35 zile) asupra performanțelor de creștere

Lot Performanța	Perioada	M	E	SEM	Valoarea lui p
Greutate corporală (g/pui)	14 zile	318,96	304,97	6,773	0,307
	21 zile	789,26	844,88	16,63	0,095
	28 zile	1107,75	1225,50	31,6	0,061
	35 zile	1523,05	1680,26	49,6	0,114
Consum mediu zilnic (g/pui/zi)	14-21 zile	78,37 ^a	86,05 ^b	1,344	0,0034
	21-28 zile	83,86	89,78	2,57	0,253
	28-35 zile	90,18 ^a	105,82 ^b	4,27	0,066
	14-35 zile	84,13 ^a	93,88 ^b	1,78	0,006
Spor mediu zilnic (g/pui/zi)	14-21 zile	52,25 ^a	59,99 ^b	1,88	0,038
	21-28 zile	47,84	54,37	3,4	0,344
	28-35 zile	59,56	63,98	4,19	0,605
	14-35 zile	53,09	59,37	1,19	0,099

Consum specific (g furaj/g spor)	14-21 zile	1,45	1,41	0,04	0,669
	21-28 zile	1,68	1,77	0,10	0,52
	28-35 zile	1,65	1,72	0,13	0,794
	14-35 zile	1,78	1,63	0,06	0,199

Unde : litere diferite in acelasi rand= diferente semnificative; SEM= eroarea standard a mediei

La 21, 28, 35 zile greutatea corporala a puilor hraniti cu reteta propusa pentru brevetare a fost mai mare decat cea a puilor hraniti cu reteta conventionala (tabelul 7). La 21 zile greutatea lotului E a fost mai mare cu 7.04 %, la 28 zile cu 10.63 %, iar la 35 zile cu 10.3% fata de lotul martor. Fata de greutatea corporala din ghidul de crestere a hibridului Cobb 500, greutatea finala a puilor a fost mai mica cu 43.85 % (lotul M) si cu 30.39 % (lotul E). Pe parcursul perioadei experimentale (14-35 zile), puii hraniti cu reteta propusa pentru brevetare (mix de ulei si pulbere de *A. annua*) au avut un consum mediu zilnic semnificativ ($p \leq 0.05$) mai mare fata de cei hraniti cu dieta conventionala. Fata de datele din ghidul de crestere a hibridului Cobb 500, puii de la lotul M au avut un consum mediu zilnic (14-35 zile) cu 52.74% mai mic, iar puii de la lotul E cu 36.87 % mai mic.

Sporul mediu zilnic la 14 zile a fost semnificativ ($p \leq 0.05$) mai mare la E fata de lotul M (tabelul 7). Si in celelalte perioade sporul mediu zilnic a fost mai mare la puii hraniti cu reteta propusa pentru brevetare, inasa nu a fost asigurat statistic. Broilerii care au inclus in dieta ulei si pulbere de *A. annua* au avut consum specific (tabelul 7), mai mic decat cei hraniti cu dieta conventionala.

La 35 de zile, conform protocolului de lucru aprobat, au fost sacrificati 5 pui/ lot. Intregul intestin a fost prelevat, iar continutul intestinal (duoden, jejun, ileon) si cecal a fost golit in tuburi de plastic in vederea examinarii bacteriologice (*Enterobacteriaceae*, *E. coli*, lactobacilli, stafilococi, *Salmonella spp*).

Tabelul 8. Efectul adaosului de *Artemisia annua* (ulei si pulbere) in dieta broilerilor (14-35 zile) asupra compozitiei microbiotei intestinale (log₁₀ UFC*/g continut intestinal)

Specificatie	M	E	SEM	Valoarea lui p
<i>Enterobacteriaceae</i> , lg10	7,27 ^b	7,22 ^a	0,008	<0,0001

<i>E. coli</i> , lg 10	5,88 ^b	5,83 ^a	0,01	0,003
Stafilococci, lg10	5,60 ^b	5,53 ^a	0,012	<0,0001
<i>Lactobacilli</i> , lg 10	6,41 ^a	7,00 ^c	0,098	<0,0001
<i>Salmonella spp.</i>	Absent	Absent	-	-

Unde: * unitati formatoare de colonii; litere diferite in acelasi rand= diferente semnificative;
SEM= eroarea standard a mediei

Numarul de bacterii patogene, respectiv, *Enterobacteriaceae*, *E.coli* si stafilococi a fost semnificativ ($P \leq 0.05$) mai mic in continutul intestinal al puilor de la lotul E (reteta propusa pentru brevetare) comparativ cu lotul martor (tabelul 8). Numarul de lactobacilli din continutul intestinal al puilor din lotul experimental a fost semnificativ ($P \leq 0.05$) mai mare comparativ cu lotul M, fapt ce demonstreaza ca utilizarea *A. annua* in dieta puilor favorizeaza multiplicarea bacteriilor benefice pentru mentinerea echilibrului florei intestinale (tabelul 8).

Tabelul 9. Efectul adaosului de *Artemisia annua* (ulei si pulbere) in dieta broilerilor (14-35 zile) asupra compozitiei microbiotei cecale (log₁₀ UFC*/g continut cecal)

Specificatie	M	E	SEM	Valoarea lui p
<i>Enterobacteriaceae</i> , lg10	11,02 ^b	10,98 ^a	0,007	0,0019
<i>E. coli</i> , lg 10	9,93 ^c	9,84 ^a	0,015	<0,0001
Stafilococci, lg10	8,65 ^b	8,54 ^a	0,018	<0,0001
<i>Lactobacilli</i> , lg 10	11,45 ^a	12,27 ^b	0,135	<0,0001
<i>Salmonella spp.</i>	Absent	Absent	-	-

Unde: * unitati formatoare de colonii; litere diferite in acelasi rand= diferente semnificative;
SEM= eroarea standard a mediei

In ceea ce priveste analiza microbiologica a continutului cecal, putem observa in tabelul 9 ca reteta propusa pentru brevetare (care a inclus ulei si pulbere de *A. annua*) administrata puilor a determinat reducerea semnificativa ($P < 0.05$) a numarului de unitati formatoare de colonii de bacterii patogene in cecum (*Enterobacteriaceae*, *E. coli*, *Stafilococci*). Totodata, numarul de lactobacilli a fost semnificativ ($P < 0.05$) mai mare in

continutul cecal al puilor de la lotul experimental fata de cei de la lotul martor (tabelul 8). Acest rezultat demonstreaza ca utilizarea retetei propuse pentru brevetare are ca si consecinta mentinerea sanatatii tractului digestiv al puilor, pe de- o parte prin inhibarea multiplicarii bacteriilor patogene, iar pe de alta parte prin efectul prebiotic (multiplicarea bacteriilor lactice, benefice pentru asigurarea echilibrului dintre speciile bacteriene din intestin). In toate probele de continut, *Salmonella spp.* a fost absenta.

REVENDICARI:

1. *Reteta furajera pentru faza de crestere a puilor de carne crescuti in stres termic ridicat care are in structura sa, din 100 de procente,: 1 % pulbere obtinuta din planta intrega uscata de Artemisia annua si 0,005 % ulei de Artemisia annua*
2. *Reteta furajera pentru faza de crestere a puilor de carne crescuti in stres termic ridicat caracterizata prin: 87,94 % substanta uscata; 22,32 % proteina bruta; 4,98% grasime bruta; 4,03% celuloza; 6,63% cenusa ; 3.140, 03 kcal/kg energie metabolizabila.*