



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2019 00245

(22) Data de depozit: 19/04/2019

(41) Data publicării cererii:  
30/01/2020 BOPI nr. 1/2020

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

(72) Inventatori:  
• DUMITRU MIHAELA,  
STR.INDEPENDENȚEI, NR.40,  
COMUNA CORBEANCA, IF, RO;  
• HĂBEANU MIHAELA, STR. REZERVEI  
NR. 66B, BL.1, ET.4, AP. 76, CHIAJNA, IF,  
RO;

• LEFTER NICOLETA AURELIA,  
STR.APUSULUI, NR. 96, BL.F, SC.2, ET.9,  
AP.165, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;  
• SORESCU IONUȚ, STR.BAICULEȘTI,  
NR.17, BL.C13, SC.B, ET.5, AP.64,  
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;  
• TABUC CRISTINA,  
BD.CONSTRUCTORILOR NR.11, SC.B,  
ET.4, AP.37, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,  
RO;  
• GHEORGHE ANCA, STR. 23 AUGUST  
NR. 16, BL. P32, SC. I, ET. 1, AP. 4,  
OTOPENI, IF, RO;  
• IDRICEANU LAVINIA, STR.PIEȚEI, NR.18,  
ETAJ 2, AP.17, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B,  
RO

(54) NUTREȚ COMBINAT, ÎMBUNĂTĂȚIT PRIN ADAOS  
DE ADITIV ZOOTEHNIC BACTERIAN PENTRU PURCEI  
ÎN CRIZA DE ÎNȚĂRCARE

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un nutreț combinat pentru hrana purcelor aflați în criza de înțărare. Nutrețul, conform invenției, este constituit în procente masice din 33,48% porumb, 25% sorg, 17% mazăre, 13% șrot soia, 3% gluten de porumb, 5% înlocuitor de lapte, 0,1% DL-metionină, 0,21% L-Lizină HCl, 1,6% carbonat de calciu, 0,01% fitază, 0,4% fosfat monocalcic, 0,1% sare, 0,1% premix colină, 1% premix vitamino-mineral și 1...3% aditiv zootehnic bacterian pe bază de *Bacillus licheniformis* cu activitate proteolitică, amilazică și

celulozolică, fiind sub formă de făină cu o granulație de 2,8 mm, având un conținut de 18,23% proteină brută, 88,7% substanță uscată, 1,2% lizină, 0,72% lizină și metionină, 0,9% calciu, 0,7% fosfor, 4,11% celuloză, și 13,55 MJ energie metabolizabilă, nutrețul având un efect de reducere a frecvenței enteritelor specifice perioadei post-înțărare la purcei.

Revendicări: 5



## Nutret combinat imbunatatit prin adaos de aditiv zootehnic bacterian pentru purcei in criza de intarcare

Inventia se refera la un nutret combinat imbunatatit prin adaosul unui aditiv zootehnic cu aplicabilitate de preferinta la purcei in criza de intarcare. In particular, prezenta inventie face referire la includerea in nutretul combinat neconventional a unui preparat bazat pe o tulpina bacteriana vie care poate constitui o alternativa la antibiotice.

Nutretul combinat traditional reprezinta o asociere a unor ingrediente energetice, proteice, la care se adauga amestecul de vitamine si minerale intr-o proportie care sa permita satisfacerea cerintelor nutritionale specifice categoriei de varsta si greutate, conform brevet RO106641 B1 și RU2294113 (C3). Acest tip de nutret asigura functia primara a hranei, respectiv necesarul de nutrienti pentru crestere, dezvoltare si obtinerea de produse. Dezavantajul acestui tip de nutret combinat este reprezentat de faptul ca nu contine acele componente de tipul agentilor antimicrobieni, care sa asigure prin efectul lor terapeutic trecerea la o nutritie stiintifica moderna, bazata pe sanatate.

O serie de factori generatori de stres afecteaza perioada imediat urmatoare intarcarii purceilor care devine critica si poate afecta ciclurile ulterioare de dezvoltare. Efectele negative ale factorilor stresori sunt asociate cu proliferarea bacteriilor conditionat patogene *Escherichia coli* si *Salmonella* spp. in intestinul purceilor. Stresul poate cauza perturbari de natura nutritionala, fiziologica si imunologica conform Lallès si col., (2008) si Pluscke, (2013). Functiile si morfologia intestinala sunt afectate, iar capacitatea de prevenire a colonizarii cu serotipuri patogene de *Escherichia coli* la nivel intestinal este redusa dupa cum subliniau Kim si col. (2012), Rhouma si col. (2017). Echipamentul enzimatic al purceilor este incomplet dezvoltat. Aceasta conduce la o sensibilitate crescuta a purceilor intarcati la enteropatii cu instalarea rapida a starii diareice (Draghici si Aristide, 1982). Pluske, (2013) si Nyachoti si col. (2006) au evidentiat faptul ca instalarea in forma severa a enteritelor poate duce la o rata crescuta a morbiditatii si mortalitatii, ceea ce conduce la compromiterea performantelor permise de potentialul genetic. Componente ale hranei cum ar fi proteine, polizaharide fara amidon si minerale, influenteaza microflora digestiva, iar nutrientii nedigerati devin disponibili pentru dezvoltarea bacteriilor (Kim si col. 2012). In stomac si intestinul subtire proximal sunt un numar limitat de bacterii ( $10^3$ - $10^5$  bacterii/g), cu predominanta bacteriilor *Lactobacillus* si *Streptococcus* spp. Din contra, partea distala a intestinului subtire contine un numar mult mai mare si mai divers de populatii bacteriene ( $10^8$  bacterii/g), dupa cum mentionau Kiarie si col., (2013).

Conform celor mentionate de Aarestrup si col., (1998) la diminuarea acestor probleme a contribuit mult timp administrarea de antibiotice care folosite irational au condus la o distrugere masiva a florei intestinale saprofitice, lactobacili propionici, si la o selectare a unor tulpini antibioretistente concomitent cu transferul de bacterii patogene rezistente de la animal la om (Stanton, 2013).

In continuare este redată in figura 1 legatura între efectele cauzate de factorii generatori de stres specifici crizei de intarcare si beneficiile nutretului combinat aditivat.

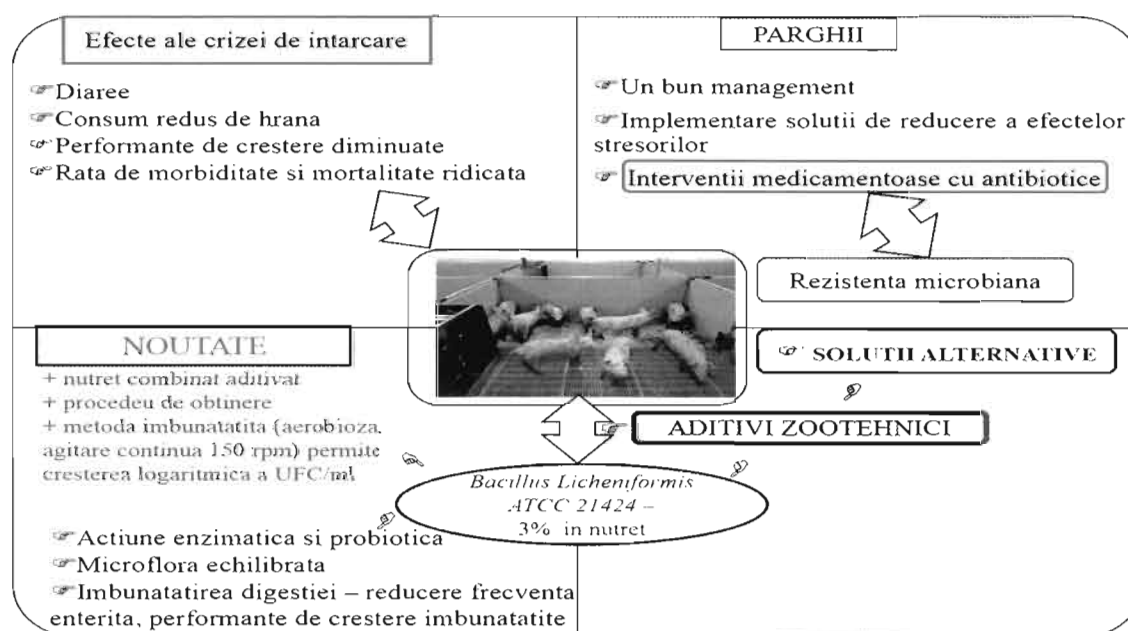


Figura 1. Legatura între problemele specifice perioadei post-intarcare la purcei si efecte ale produsului bacterian

Problema tehnica pe care o rezolva inventia consta in reducerea frecventei enteritelor la purcei, cu precadere a celor agresive, al caror scor fecal predominant pe o scara de la 1 la 3 este 3 (agresiv, fecale moi). Aceasta solutie permite asocierea efectelor nutrientilor cu cele ale agentilor antimicrobieni din aditivul zootehnic obtinut din tulpini bacteriene ce actioneaza enzimatic/probiotic si contribuie la stabilizarea florei intestinale. Actiunea acestuia se reflecta pozitiv asupra starii de sanatate.

In urma cercetarilor efectuate privind imbunatatirea statutului de sanatate la purcei intarcati in conditiile restrictiei folosirii de antibiotice, s-a constatat ca tulpinile bacteriene au actiune probiotica si enzimatica. De un mare interes in acest sens este *Bacillus* spp. datorita capacitatii mari de secretie enzimatica pe un anumit mediu de cultura (20-25 g/L, Schallmey si col., 2004). Studii cu privire la amestecul in diferite proportii între *Lactobacillus acidophilus* (50%) si *Lactobacillus plantarum* (50%) pentru purcei sugari

(Habeanu si col. 2016), sau *Bacillus subtilis* si *Bacillus licheniformis* (1:1), pe porcei in crestere (Kaewtapee si col., 2017) au evidentiat o actiune enzimatica pozitiva si un rol probiotic in mentinerea ecosistemului intestinal. Desi mecanismele de actiune ale acestora au fost destul de bine documentate, in practica inca persista o inconsistenta a cunostintelor cu privire la modul de preparare, stabilitate, eficienta, nivel de includere in hrana.

*Bacillus licheniformis* este o bacterie gram-pozitiv, izolata din sol, caracterizata printr-o mare capacitate de secretie enzimatica de lipaze, proteaze, amilaze (Zhou si col., 2016). *Bacillus licheniformis* este o specie considerata sigura conform EFSA Journal (2017). Nutretul combinat conform inventiei revendicate inlatura dezavantajul specificat anterior prin aceea ca prezinta o asociere de ingrediente furajere care permit un optim nutritional si este aditivat cu un produs bacterian bazat pe *Bacillus licheniformis* ATCC 21424 - 3%, cu o concentratie de  $1,6 \times 10^9$  UFC/ mL cultura fata de  $3 \times 10^9$  UFC/ml cultura concentratie initiala. Tulpina de *Bacillus licheniformis* utilizata are un grad de siguranta 1. Actiunea enzimatica a acestei tulpini la nivelul organismului porceilor a fost stimulata prin structura nutretului combinat care acopera cerintele nutritionale specifice porceilor in criza de intarcare.

In continuare este prezentata in tabelul 1 structura retetelor de nutret combinat in care nivelul de includere al produsului bacterian a fost 0 la Martor, 1% la lotul BL-1%, respectiv 3% la lotul BL-3%. Testul biologic s-a derulat pe 60 porcei TOPIGS cu varsta de  $30 \pm 3$  zile, la o greutate medie initiala de 8,51 Kg, timp de 16 zile.

Tabelul 1. Structura retetelor de nutret combinat

Ingrediente - %	Martor	BL- 1%	BL-3%
Porumb	33,48	33,48	33,48
Sorg	25,0	25,0	25,0
Mazare	17,0	17,0	17,0
Srot soia (44%)	13,0	13,0	13,0
Gluten de porumb	3,0	3,0	3,0
Inlocuitor de lapte	5,0	5,0	5,0
DL-metionina	0,10	0,10	0,10
L-Lizina HCl	0,21	0,21	0,21
Carbonat de calciu	1,60	1,60	1,60
Fitaza	0,01	0,01	0,01
Fosfat monocalcic	0,40	0,40	0,40
Sare	0,10	0,10	0,10
Premix colina	0,10	0,10	0,10
Premix vitamino-mineral*	1,0	1,0	1,0
<i>Bacillus licheniformis</i>	-	1,00	-

ATCC 21424 -1%			
<b><i>Bacillus licheniformis</i></b> ATCC 21424 -3%	-	-	<b>3,00</b>
<b>Caracteristici nutritionale (%)</b>			
Energie Metabolizabila (EM, Mj/kg)	13,55	13,55	13,55
Substanta uscata	88,7	88,7	88,7
Proteina bruta	18,23	18,23	18,23
Lizina	1,20	1,20	1,20
Metionina + Cistina	0,72	0,72	0,72
Calciu	0,90	0,90	0,90
Fosfor	0,70	0,70	0,70

\*Premixul vitamino-mineral inclus in nutretul combinat contine/Kg nutret: 10 000 UI vitamina A; 2 000 UI vitamina D3; 30 UI vitamina E; 3 mg vitamina K3; 2 mg vitamina B1; 6 mg vitamina B2; 20 mg vitamina B3; 13.5 mg vitamina B5; 3 mg vitamina B6; 0.06 mg vitamina B7; 0.8 mg vitamina B9; 0.05 mg vitamina B12; 10 mg vitamina C; 30 mg Mn; 110 mg Fe; 25 mg Cu; 100 mg Zn; 0.38 mg I; 0.36 mg Se; 0.3 mg Co; 60 mg antioxidant (oxitec). BL-1%, *Bacillus licheniformis* ATCC 21424-1%; BL-3%, *Bacillus licheniformis* ATCC 21424 - 3%.

Nutretul combinat, intr-o combinatie preferata contine: porumb 33,48 %, sorg 25,0%, mazare 17,0%, srot soia 13,0 %, gluten de porumb 3,0%, inlocuitor de lapte 5,0 %, DL-metionina 0,1%, L-Lizina HCL 0,21%, carbonat de calciu 1,6%, fitaza 0,01%, fosfat monocalcic 0,4%, sare 0,10%, premix colina 0,10%, premix vitamino-mineral pentru pucei in criza de intarcare 1,0%, produs bacterian pe baza de *Bacillus licheniformis* 1-3,0% ATCC 21424, de preferinta 3%.

Nutretul combinat BL-3% conform inventiei are ca obiectiv principal reducerea frecventei enteritelor prin rolul imunomodulator si de modificare a compozitiei microflorei intestinale. La un nivel de includere de 3% reducerea frecventei enteritelor cu 44% se coreleaza foarte semnificativ cu scorul fecal,  $R = 1$ ,  $P < 0,0001$ . Nutretul combinat BL-3% revendicat, reduce de 6 ori scorul fecal cu grad 3, respectiv cazurile cu diaree agresiva. Dupa ingerare, datorita prezentei sporilor ca forma de rezistenta, tulpina vie de *Bacillus licheniformis* ATCC 21424 din nutretul combinat incepe procesul de germinare in intestinul animal, servind drept biocatalizator de tip enzimatic, prin elaborarea unor enzime bacteriene ce actioneaza asupra glucidelor, lipidelor si proteinelor, favorizand astfel, absorbtia substantelor nutritive la nivelul mucoasei intestinale. La nivel plasmatic markerii biochimici proteici, lipidici, minerali si enzimatici, care reprezinta indicatori ce ne dau informatii cu privire la starea de sanatate, au fost situati intre limitele de referinta.

Obiectivul subsidiar consta in imbunatatirea performantelor bioproductive. Greutatea corporala si sporul mediu zilnic sunt imbunatatite fiind negativ si semnificativ corelate cu frecventa enteritelor, respectiv  $R = -0,72$  pentru corelatia Pearson intre greutatea finala si frecventa enteritelor, iar intre sporul mediu zilnic si frecventa enteritelor  $R = -0,86$ .

Nutretul combinat conform inventiei revendicate este caracterizat prin aceea ca are o culoare galben cenusie, miros si gust normal, placut, se prezinta sub forma de faina cu o granulatie de 2,8 mm si prezinta un continut de: proteina bruta – 18,23%, substanta uscata – 88,7%, lizina – 1,20%, metionina + cistina – 0,72%, calciu – 0,9%, fosfor – 0,7%, celuloza 4,11%, energie metabolizabila 13,55 MJ. Numarul total de germeni este de 14,25 lg UFC/g, coliformi 8,5 lg UFC/g, *Escherichia coli* 4,75 lg UFC/g, ceea ce il situeaza in limitele de referinta. Tulpina bacteriana utilizata a fost conservata pe mediul de intretinere agar nutritiv in plan inclinat (preinocul sau cultura stoc, pastrata la 4°C). Rezista mai mult de 9 luni la 4°C si temperatura camerei, si la – 80°C cu adaos de glicerol 20% pana la 2 ani.

Originalitatea inventiei se datoreaza inclusiv imbunatatirii metodei de obtinere a inoculului de *Bacillus licheniformis* ATCC 21424 prin modificarea conditiilor de dezvoltare (37°C, 24 h, 150 rpm). Metoda consta in: se insamanteaza o cantitate de biomasa din preinocul in baloane Erlenmayer de 100 ml, sterile, in mediu de bulion nutritiv (Merck), la un pH=7±2 (sterilizat conform instructiunilor prezentate de producător), etapa insotita de incubare la 37°C, 24 h, 150 rpm. Suspensia bacteriana a prezentat o densitate optica (DO),  $DO_{600\text{ nm}} = 1.799$ . Dupa etapa de dezvoltare, cultura bacteriana s-a analizat din punct de vedere al puritatii prin coloratia Gram (preparat microscopic).

Inventivitatea deriva si din determinarea activitatii enzimaticе, respectiv proteaza, amilaza si celuloza, in mediul fermentativ cu adaos de nutret combinat prin inoculare cu *Bacillus licheniformis* ATCC 21424 in raport de 1:10. Mediul fermentativ sau mediul de biosinteza contine urmatoarele componente: nutret combinat 2%, glucoza 6%,  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$  0,04%,  $\text{MgCl}_2$  0,02%, pentru un volum de 100 ml cu apa distilata, fiind ajustat la pH-ul corespunzator cu NaOH 20% sau HCl 1 N. Sterilizarea mediului se face prin autoclavare la 121°C, 15 min. Dupa inoculare, mediul de biosinteza se incubeaza la 37°C, 72 h, in baloane Erlenmayer de 100 ml, in conditii de agitare continua (150 rpm). Biosinteza, natura si nivelul activitatii enzimaticе difera in functie de enzima ce se doreste a se determina, de timpul de incubare si de pH-ul mediului fermentativ. Supernatantul sau extractul enzimatic crud rezultat in urma centrifugarii mediului de biosinteza (4°C, 20

min, 8000 rpm) cu adaos de 2% nutret combinat este supus determinării activității enzimaticice.

În tabelul 2 tulpina de *Bacillus licheniformis* ATCC 21424, prezintă activitate proteazică (după metoda Anson), amilazică (după metoda Hostetler) și celulozolică (după metoda Porath și Petterson) prin respectarea modului de lucru prezentat de Jurcoane și col. (2006). Exprimarea activității enzimaticice s-a determinat pe baza curbei etalon cu ajutorul ecuației de regresie (Anexa 2, figura 2, 4, 6).

Tabelul 2. Activitatea enzimatică a tulpinii de *Bacillus licheniformis* ATCC 21424

Mediul de biosinteză	Proteaza [μmoli tirozina/ml/min] sau U/ml			Amilaza [μmoli maltoza/ml/min] sau U/ml			Celulaza [mg glucoză/ml/min] sau U/ml		
	pH=8						pH=6.4	pH=7	pH=3
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	72 h		
Mediul + 2% nutret combinat	2.69	94.27	97.75	3.5	5.08	6.63	2.3	0.19	0.9

**Activitatea proteolitică.** La 72 de ore, *Bacillus licheniformis* ATCC 21424 prezintă o activitate proteolitică în mediul cu nutret combinat de 97.75 U/mL, fiind de 1,03 ori mai mare comparativ cu mediul incubat la 48 ore, respectiv de 36,33 ori mai mare comparativ cu mediul incubat la 48 de ore (Anexa 1, figura 2-3).

Cresterea timpului de incubare (72 h) mărește capacitatea enzimatică a tulpinii de *Bacillus licheniformis* ATCC 21424 reflectată printr-o creștere logaritmică și implicit segregare de enzime exogene proteolitice în mediul fermentativ, cu rol catalitic asupra legăturilor complexe din structura nutretului combinat, respectiv scindarea legăturilor peptidice până la forme simple, ușor asimilabile de organism (aminoacizi).

**Activitatea amilazică.** La 72 de ore, tulpina de *Bacillus licheniformis* ATCC 21424 prezintă în mediul de biosinteză cu adaos de nutret combinat, o activitate de 6,63 U/mL, fiind cu 89,42% mai mare vs. mediul fermentativ incubat timp de 24 de ore. Boabele de porumb datorită conținutului ridicat de amidon, imprimă tulpinii de *Bacillus licheniformis* ATCC 21424 o maximizare în ceea ce privește sinteza de enzime hidrolitice extracelulare (Anexa 2, figura 4-5).

**Activitatea celulozolică.** Tulpina de *Bacillus licheniformis* ATCC 21424 în urma ajustării mediului fermentativ la pH 6,4, 7 și 3 a atins valoarea maximă a sintezei de enzime celulozolitice în mediul cu pH 6,4, pH-ul fiind și un factor limitativ, deoarece conform figurii 7 (Anexa 3), la pH=3 s-a remarcat cea mai scăzută activitate celulozolică. Nutrețul combinat prin aportul celulozic, poate fi mai ușor digerat dacă se utilizează un

preparat enzimatic bacterian cu capacitate de descompunere a componentei fibroase în glucide asimilabile.

Necesitatea administrării acestui tip de nutret combinat este justificată de următoarele avantaje: completează producția endogenă de enzime știut fiind faptul că echipamentul enzimatic al purceilor până la 7 săptămâni este incomplet dezvoltat, iar activitatea pancreatică la purcei nu este suficient de eficientă; asigură o biodisponibilitate sporită a substanțelor nutritive fapt reflectat în performanțele de creștere superioare; reduce frecvența enteritelor cu 44%; dejectiile nu produc un impact negativ asupra zonei de depozitare datorită creșterii gradului de absorbție al nutrienților. Concentrația trigliceridelor la nivel plasmatic scade cu 18,43%, în timp ce concentrația proteinelor crește cu 6%.

În continuare este redat un exemplu de realizare a nutretului conform invenției revendicate.

Faza 1. Preparare aditiv. Tulpina selectată de *Bacillus licheniformis* ATCC 21424 sub formă liofilizată, a fost revitalizată în bulion nutritiv, la 37°C, 24 de ore, în condiții de aerobioză. Inoculul de *Bacillus licheniformis* ATCC 21424 s-a obținut în condiții aseptice prin recoltarea cu ansă sterilă, a unei cantități de biomasă din preinocul și însămânțarea acesteia în baloane Erlenmayer de 100 ml, sterile, 37 °C, 24 de ore, 150 rpm, pentru obținerea unei suspensii omogene. Tulpina bacteriană, considerată posibilă sursă cu rol probiotic, este analizată din punct de vedere al nepatogenității (activitate nehemolitică) asupra gazdei, aceasta fiind unul dintre principalele criterii pe care trebuie să-l îndeplinească un organism probiotic. Tulpina luată în lucru este evaluată pe placă de agar sange suplimentată cu 5% sange de oaie (TSA, Sanimed), confirmare înregistrată printr-o  $\gamma$ -hemoliză în jurul coloniilor dezvoltate pe mediul TSA. Nu se dezvoltă colonii  $\beta$ -hemolitice cu zonă transparentă, sub formă de halou. Produsul zootehnic bacterian se obține sub formă lichidă, cultura de 24 de ore, bine dezvoltată, formată din celule tinere, aflate în fază logaritmică de creștere.

Faza 2. Obținere nutret combinat. Ingredientele se dozează după care se macină într-o moară cu ciocanele. Porumbul, sorgul, mazarea, srotul de soia se introduc într-un malaxor pentru omogenizare. Se adaugă treptat glutenul de porumb și înlocuitorul de lapte. Se continuă amestecarea adăugându-se premixul vitamino-mineral și restul ingredientelor. Se omogenizează 6 min. Nutretul combinat obținut sub formă de făină are o granulație de 2,80 mm.

Faza 3. Produsul zootehnic se adaugă în nutretul combinat în pondere de 3%, prin ajustarea



concentratiei initiale de  $3 \times 10^9$  UFC/ml, 1-6 zile/4°C, in ser fiziologic steril la  $1,6 \times 10^9$  UFC/ml/kg nutret combinat, cu verificarea microscopica (1000X) atat a preinoculului, cat si a inoculului, inainte si dupa insamantare.

Nutretul combinat conform inventiei se administreaza purceilor in primele 3 saptamani dupa intarcare ca amestec unic de hrana cu o componenta de: proteina bruta – 18,23%, substanta uscata - 88,70%, lizina – 1,20%, metionina + cistina – 0,72%, calciu – 0,90%, fosfor – 0,70%, celuloza 4,11%, energie metabolizabila 13,55 MJ. Procentele sunt raportate la 100 Kg nutret combinat.

Produsul are o valabilitate de 60 zile de la data fabricației. Se pastreaza in conditii care nu permit mucegairea, incingerea, infestarea cu bacterii sau ciuperci. Folosit si pastrat in conditiile recomandate, produsul nu prezinta nici un risc pentru operator si toxicitate pentru animale. Se recomanda in mod deosebit in hrana purceilor in maternitate si intarcare pentru facilitarea trecerii de la consumul preponderent cu lapte matern la cel cu hrana solida si reducerea in acest fel a riscului de imbolnaviri care afecteaza performantele ulterioare. Poate fi folosit si la alti hibrizi sau rase de purcei.

Inainte de intarcare purceii au un tip de hranire bazat in principal pe lapte matern, consumul de nutret combinat demarand dupa 10 zile, dar in cantitati destul de limitate. Protectia fata de agentii infectiosi inaintea administrarii nutretului conform inventiei le este asigurata prin imunoanticorpii prezenti in laptele matern. Aditivul zootehnic bacterian adaugat in nutretul combinat revendicat, practic faciliteaza neutralizarea efectelor negative provocate de trecerea de la un tip de hrana predominant lichid la unul solid. Pe fondul activitatii enzimactice caracteristice se completeaza deficientele echipamentului enzimatic care nu este complet dezvoltat. In cazul inventiei, dupa 30 zile purceii sunt hraniti in doua tainuri zilnice cu un furaj imbunatatit cu un aditiv zootehnic ce inlocuieste antibioticele conform inventiei.

In continuare sunt prezentate in tabelul 3 performantele de crestere si corelatia acestora cu frecventa enteritelor si scorul fecal.

Tabelul nr. 3. Performantele de crestere si corelatia acestora cu frecventa enteritelor si scorul fecal.

Specificatie	Martor	BL-1%	BL-3%	P	Frecventa enteritelor
					Corelatia Pearson-R
Greutatea initiala - Kg	8,56	8,57	8,42	0,89	0,59**
Greutatea dupa 7 zile - Kg	9,74	9,8	8,42	0,97	0,45*
Greutatea finala - Kg	12,8	12,2	13,03	0,10	-0,72 **

Spor mediu zilnic I saptamana -Kg	0,197	0,205	0,222	0,36	-0,86**
Spor mediu zilnic final-Kg	0,222	0,227	0,288	0,02*	-0,70**
Scor fecal <sup>1</sup>	0,52	0,33	0,23	0,02*	1**
- Scor fecal gr. 1	0,15	0,20	0,15	0,11	
- Scor fecal gr. 2	0,50	0,50	0,40	0,16	
- Scor fecal gr. 3	0,90	0,33	0,15	0,05	
Frecventa enteritelor	4,2	3,0	2,7	0,37	

<sup>1</sup>Scor fecal grad 1 – diaree usoara, consistenta usor moale; scor fecal grad 2 – consistenta mijlocie; scor fecal grad 3 – diaree severa; BL-1%, *Bacillus Licheniformis* ATCC 21424-1%; BL-3%, *Bacillus Licheniformis* ATCC 21424-3%; \*\*diferente foarte semnificative P<0,0001; \* diferente semnificative P<0,05.

Microbiota intestinala este prezentata grafic in anexa 4, figurile 8 si 9: la nivel de ileon, numarul de *Lactobacillus* spp. Prin utilizarea nutretului revendicat ajunge la 8.85 lg UFC/g continut intestinal, ceea ce inseamna o crestere de 1.06 ori fata de un nivel de 1% produs zootehnic, respectiv cu 14,34% fata de nutretul fara produs. Microbiota in acest segment intestinal se imbunatateste. La nivelul cecumului, numarul lactobacililor a fost imbogatit cu adaos de BL-3% de 1.08 ori comparativ cu BL 1% si 1.27 fata de varianta fara produs. De asemenea, in cecum, abundenta lactobacililor poate fi 2,71% mai pronuntata fata de ileon.

In conformitate cu EFSA (2008) *Salmonella* spp. A fost evidentiata drept pericolul major in ceea ce priveste contaminarea microbiana a furajelor, urmată de *Listeria monocytogenes*, *Echerichia coli* O157: H7 si *Clostridium* spp. Aceste microorganisme sunt implicate in modificari ale microbiotei intestinale la porci, evidentiata prin tulburari gastrointestinale. In cazul utilizarii nutretului combinat –BL-3% supus inventiei, conform metodei ISO 6579-1 (2017), *Salmonella* spp. Nu s-a identificat la niciun lot experimental. Nutretul combinat supus inventiei modifica pozitiv ecosistemul bacterian, reprezentat de bacterii din genul *Bacillus* spp. La nivel de ileon si in cecum, prin utilizarea produsului bacterian pe baza de *Bacillus licheniformis* ATCC 21424. Se remarca o pierdere a diversitatii microbiene cu un impact asupra bacteriilor anaerobe (*Clostridium* spp., *Enterococcus* spp.) si facultativ anaerobe *E. coli* in cazul in care nu se utilizeaza BL-3%.

## Anexa 1

**Activitatea proteazica.** Cu ajutorul curbei etalon (figura 2) se determina  $\mu$ molii de tirozina corespunzatori extincției măsurate ( $DO_{660\text{ nm}}$ ). O unitate de activitate proteazica reprezinta cantitatea de enzima care elibereaza în mediu de reactie, în urma hidrolizării cazeinei (1% cazeina preparata în tampon Tris-HCl 0,05 M, pH=8) a 1  $\mu$ mol tirozina, în timp de 1 minut, la 35°C.

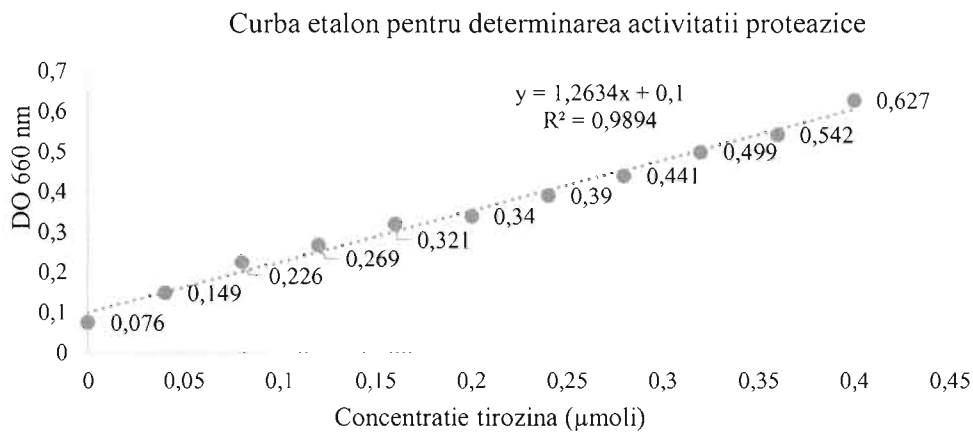


Figura 2. Curba etalon pentru determinarea activitatii proteazice

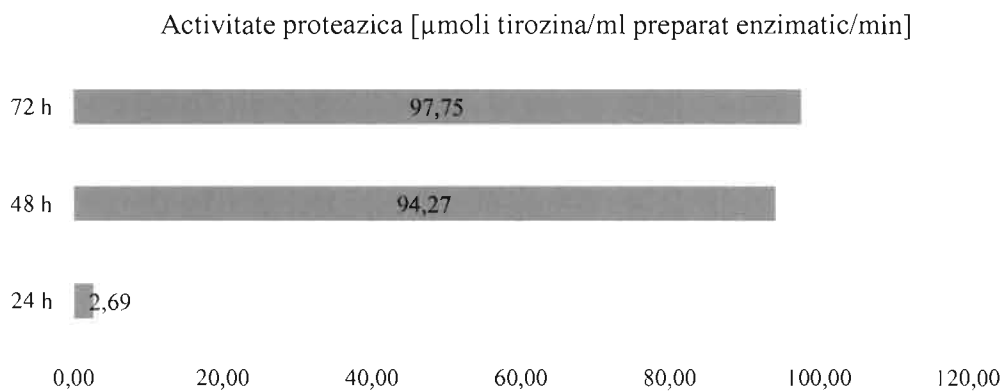


Figura 3. Evidențierea activitatii proteolitice pentru tulpina de *Bacillus licheniformis* ATCC 21424 în mediul fermentativ cu nutret combinat

## Anexa 2

**Activitatea amilazica (AA).** Pentru estimarea capacitatii amilolitice, se construiește curba etalon (figura 4). Cu ajutorul ecuatiei de regresie se determina concentratia de maltoza ( $\mu\text{moli}$  maltoza) care corespunde extintiei citite la  $\text{DO}_{546 \text{ nm}}$ . Conform acestei metode o unitate amilazica este echivalentul unui  $\mu\text{mol}$  de maltoza, rezultat în urma hidrolizarii enzimatice a amidonului la valoarea de pH a solutiei tampon luata in lucru (tampon fosfat 0,2 M,  $\text{pH}=7$ ), eliberata de 1 gram preparat enzimatic, într-un minut la  $30^\circ\text{C}$ .

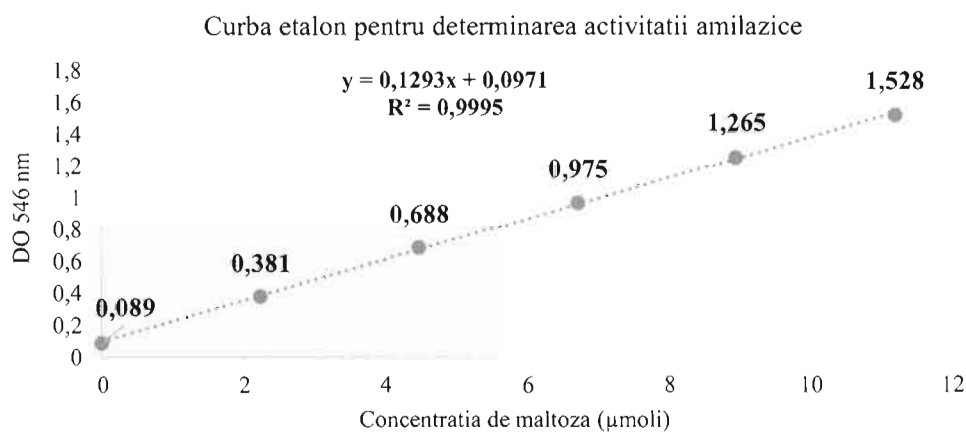
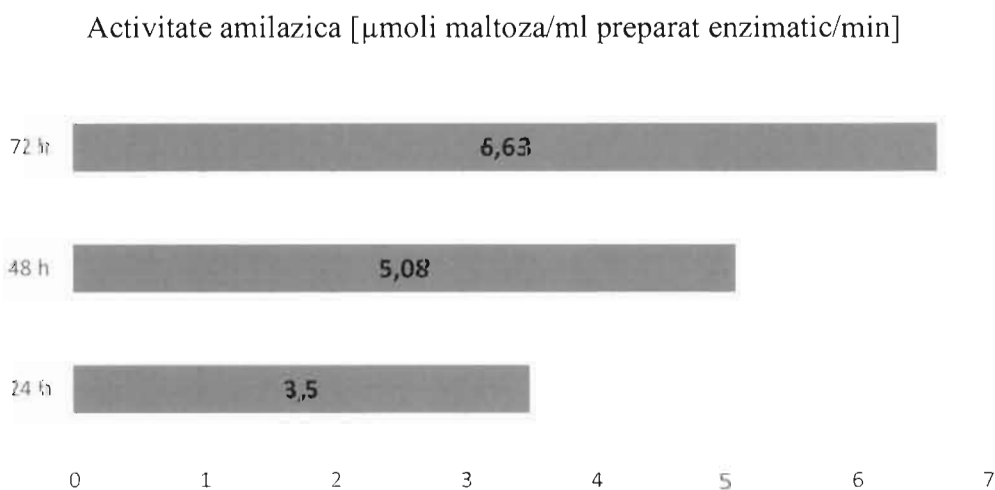


Figura 4. Curba etalon pentru determinarea activitatii amilazice

Figura 5. Evidentierea activitatii amilazice pentru tulpina de *Bacillus licheniformis* ATCC 21424 in mediul fermentativ cu nutret combinat

Anexa 3

**Activitatea celulozolitica (AC).** Metoda se bazeaza pe hidroliza enzimatica a carboximetilcelulozei (CMC) si dozarea gruparilor reductoare eliberate cu reactivul dinitrosalicilic (DNS). O unitate de activitate celulozolitica reprezinta, conform metodei, cantitatea de enzima care elibereaza din solutia de CMC-celuloza (CMC 0,5% preparata in tampon fosfat 0,2 M pH=7 si 6,4; tampon fosfat-citrat 0,1M, pH=3) o cantitate de glucide reductoare care dau cu reactivul DNS aceeasi DO (640nm) similara cu aceea a 1 mg de glucoza. Cu ajutorul ecuatiei de regresie redada prin interpolarea absorbantelor citite la DO<sub>640nm</sub> corespunzatoarea unei concentratii de glucoza (0,1-1% glucoza), se obtine curba etalon (figura 6).

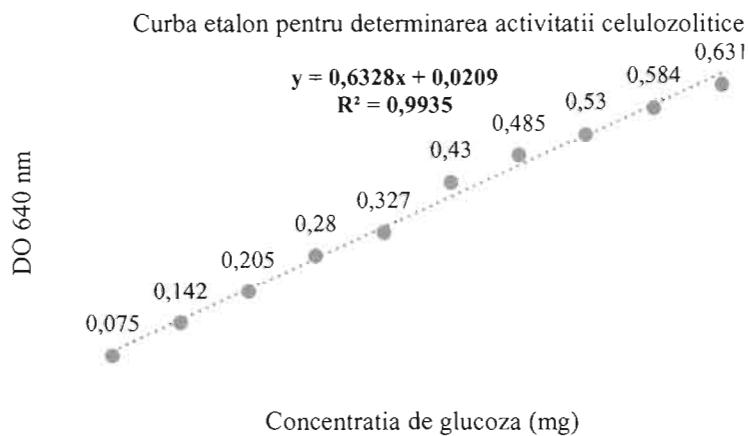


Figura 6. Curba etalon pentru determinarea activitatii celulozolitice

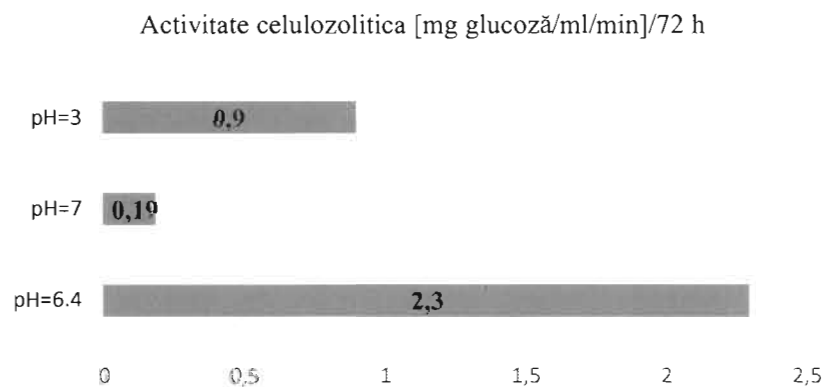


Figura 7. Evidentierea activitatii celulozolitice pentru tulpina de *Bacillus licheniformis* ATCC 21424 in mediul fermentativ cu nutret combinat

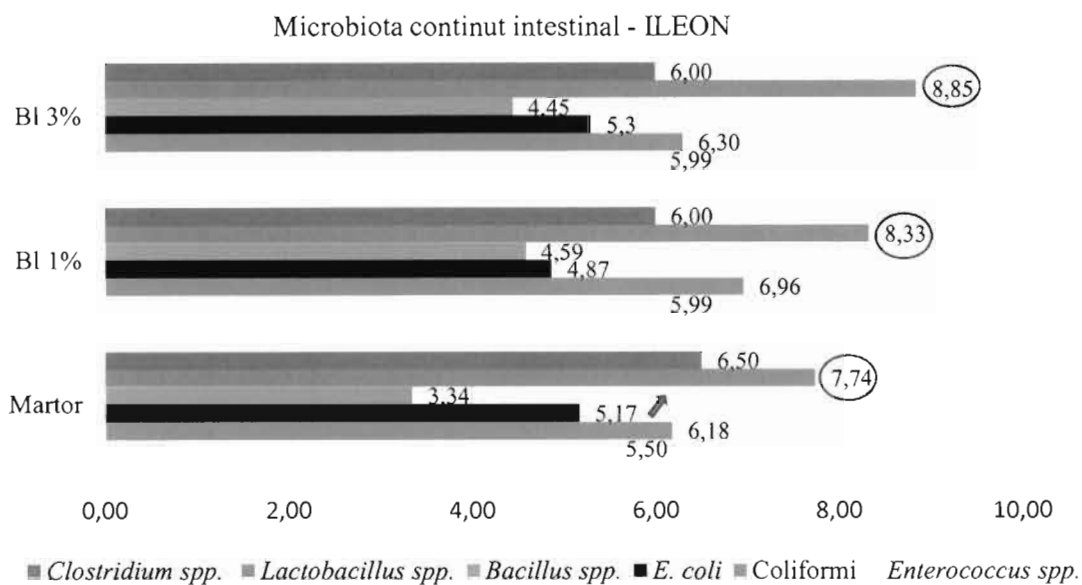


Figura 8. Microbiota intestinala a purceilor la nivel de ileon (46±3 zile) la adaos de *Bacillus licheniformis* ATCC 21424

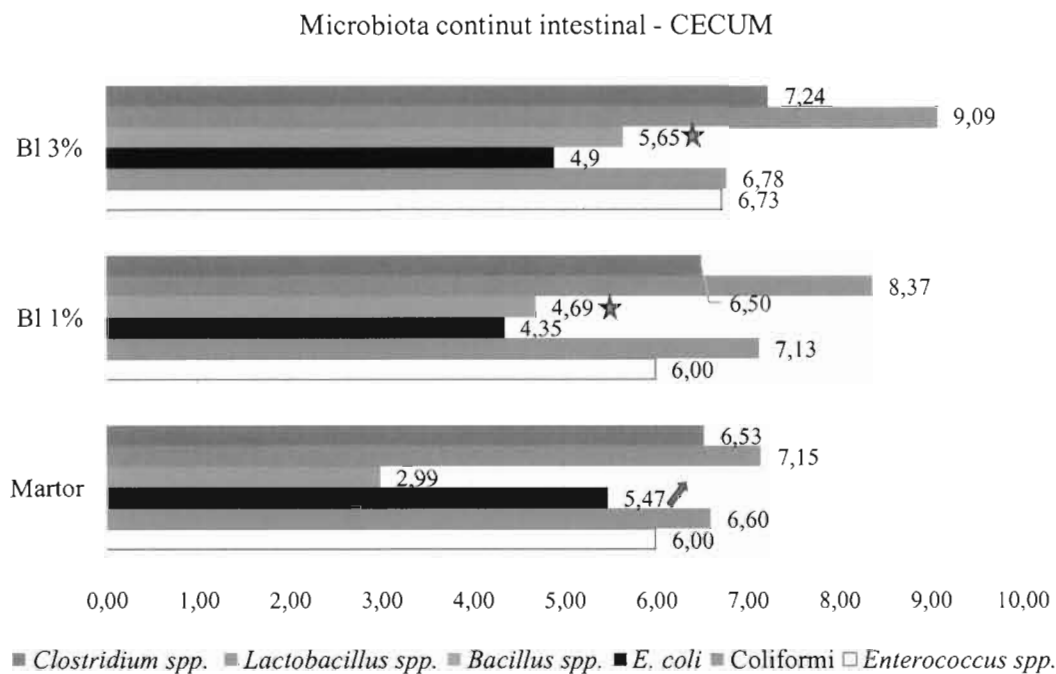


Figura 9. Microbiota intestinala a purceilor la nivel de cecum (46±3 zile) la adaos de *Bacillus licheniformis* ATCC 21424

## Anexa 5

**Bibliografie**

1. Aarestrup F. M., F. Bager, N. Einar Jensen, M. Madsen, A. Meyling and H. C. Wegener. 1998. Surveillance of antimicrobial resistance in bacteria isolated from food animals to antimicrobial growth promoters and related therapeutic agents in Denmark. *APMIS* 106: 606422, 1998.
2. Brevet de inventie nr 106641 B1. Nutret combinat pentru rumegatoare si porcine.
3. Brevet de inventie RU 2294113 (C2).
4. Hăbeanu Mihaela, Cristina Tabuc, Anca Gheorghe, Mariana Ropota, Mihaela Dumitru, Loredana Călin, T. Mihalcea, M. Palade. 2016. Preliminary study on the interrelation between sow milk quality and litter performance in relation to their health. *Scientific Papers-Animal Science Series: Lucrări Științifice - Seria Zootehnie*, vol. 66.
5. Jurcoane Ștefana, Diguță Filofteia-Camelia, Groposila-Constantinescu Diana-Gabriela, 2006. *Biotehnologie generală, Lucrări practice*.
6. Kaewtapee C., K. Burbach, G. Tomforde, Th. Hartinger, A. Camarinha-Silva, S. Heinritz, J. Seifert, M. Wiltafsky, R. Mosenthin and P. Rosenfelder-Kuon. 2017. Effect of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* supplementation in diets with low- and high-protein content on ileal crude protein and amino acid digestibility and intestinal microbiota composition of growing pigs. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 8:37.
7. Kiarie E., L.F. Romero and Ch. M. Nyachoti. 2013. The role of added feed enzymes in promoting gut health in swine and poultry. *Nutrition Research Reviews*, 26, 71-88 .
8. Kim, J.C., Hansen, C.F., Mullan, B.P. & Pluske, J.R. 2012. Nutrition and pathology of weaner pigs: Nutritional strategies to support barrier function in the gastrointestinal tract. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 173, 3-16.
9. Lallès, J-P. 2008. Nutrition and gut health of the young pig around weaning: what news? *Archiva Zootechnica* 11, 5-15.
10. Nyachoti, C.M., Omogbenigun, F.O., Rademacher, M. 2006. Performance responses and indicators of gastrointestinal health in early-weaned pigs fed low-protein amino acid-supplemented diets. *J. Anim. Sci.*, 84(1): 125-134
11. Pluske, J.R. 2013. Feed and feed additives related aspects of gut health and development in weanling pigs. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 4, 1-7.

12. Rhouma M., J. M. Fairbrother, F. Beaudry and A. Letellier. 2017. Post weaning diarrhea in pigs: risk factors and non-colistin-based control strategies. *Acta Veterinaria Scandinavica* 59-31.
13. Stanton T. 2013. A call for antibiotic alternatives research. *Forum: Science & Society*. Vol 21. Nr. 3.
14. Schallmey M., Ajay S. and O. P. Ward. 2004. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Can. J. Microbiol.* Vol. 50.
15. Zhou M., D. Zeng, X. Ni, T. Tu, Z. Yin, K. Pan and Bo Jing. 2016. Effects of *Bacillus licheniformis* on the growth performance and expression of lipid metabolism-related genes in broiler chickens challenged with *Clostridium perfringens*-induced necrotic enteritis. *Lipids in Health and Disease*. 15:48.
16. EFSA Journal. 2017. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2016. European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control.
17. EFSA Journal. 2008. Microbiological risk assessment in feedingstuffs for food-producing animals. Scientific of the Panel Opinion on Biological Hazards. 720, 1-84.
18. ISO 6579-1, 2017. <https://www.sis.se/api/document/preview/921516/>.



**REVENDICARI:**

1. Nutret combinat pentru hrana purceilor in criza de intarcare caracterizat prin aceea ca are in componenta porumb 33,48 %, sorg 25,0%, mazare 17,0%, srot soia 13,0 %, gluten de porumb 3,0%, inlocuitor de lapte 5,0 %, DL-metionina 0,1%, L-Lizina HCL 0,21%, carbonat de calciu 1,6%, fitaza 0,01%, fosfat monocalcic 0,4%, sare 0,10%, premix colina 0,10%, premix vitamino-mineral pentru porcei in criza de intarcare 1,0% si un aditiv zootehnic 1-3%.
2. Nutret combinat conform revendicarii 1 caracterizat prin aceea ca are in componenta un aditiv zootehnic bacterian pe baza de *Bacillus licheniformis* 3,0% cu o activitate proteolitica de 94,27 [U/mL], amilazica de 6,63 [U/mL] si intr-un procent mai scazut celulozolitica de 2.3 [U/mL].
3. Nutret combinat conform revendicarii 1 si 2 caracterizat prin aceea ca are culoare galben cenusie, miros si gust normale, placute, se prezinta sub forma de faina cu o granulatie de 2,8 mm si un continut de: proteina bruta – 18,23%, substanta uscata – 88,7%, lizina – 1,20%, metionina + cistina – 0,72%, calciu – 0,9%, fosfor – 0,7%, celuloza 4,11%, energie metabolizabila 13,55 MJ. Numarul total de germeni este de 14,25 lg UFC/g, coliformi 8,5 lg UFC/g, *Escherichia coli* 4,75 lg UFC/g, ceea ce il situeaza in limitele de referinta.
4. Metoda imbunatatita de obtinere a inoculului de *Bacillus licheniformis* ATCC 21424 prin modificarea conditiilor de dezvoltare: 37° C, 24 h, 150 rpm. Metoda consta in insamantarea unei cantitati de biomasa din preinocul in baloane Erlenmayer de 100 ml, sterile, in mediu de bulion nutritiv Merck, la un pH = 7 ± 2, etapa insotita de incubare la 37°C, 24 h, 150 rpm. Suspensia bacteriana prezinta o densitate optica (DO), DO<sub>600 nm</sub> = 1.799.
5. Nutret combinat conform revendicarilor 1, 2 si 3 imbunatateste microbiota la nivel de ileon cu 14,34%, respectiv cu 2,71% in cecum, reduce frecventa enteritelor cu 44% si reduce scorul fecal grad 3 de 6 ori.