

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **233898**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **416204**

(22) Data zgłoszenia: **19.02.2016**

(51) Int.Cl.

C12N 1/20 (2006.01)

C12R 1/225 (2006.01)

C12R 1/245 (2006.01)

A61K 35/741 (2015.01)

A61K 35/747 (2015.01)

A23K 10/18 (2016.01)

(54) **Nowe szczepy bakterii fermentacji mlekowej do zwalczania E
i Clostridium perfringens u zwierząt, zwłaszcza u przeżuwaczy,
ich kompozycje i zastosowania**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

28.08.2017 BUP 18/17

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

31.12.2019 WUP 12/19

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIwersytet PRZYRODNICZY
W POZNANIU, Poznań, PL
INSTYTUT WŁÓKIEN NATURALNYCH
I ROŚLIN ZIELARSKICH, Poznań, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**ANNA SIP, Poznań, PL
WŁODZIMIERZ GRAJEK, Poznań, PL
KATARZYNA GRAJEK, Poznań, PL
JOANNA FOKSOWICZ-FLACZYK, Chyby, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Bartłomiej Fijałkowski

PL 233898 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku są nowe szczepy bakterii fermentacji mlekowej *Lactobacillus casei* eub1B, *Lactobacillus salivarius* eub2B oraz *Lactobacillus sakei* eub3B do ograniczania rozwoju chorobotwórczych szczepów bakterii *Escherichia coli* i *Clostridium perfringens*, występujących w organizmach zwierząt dzikich i hodowlanych oraz w środowisku ich bytowania, szczególnie w odniesieniu do młodych osobników bydła, owiec, kóz, jeleni i saren.

Wynalazek obejmuje także preparaty i kompozycje probiotyczne, które w swoim składzie zawierają nowe szczepy bakterii fermentacji mlekowej *Lactobacillus casei* eub1B, *Lactobacillus salivarius* eub2B oraz *Lactobacillus sakei* eub3B oraz zastosowania nowych szczepów bakterii fermentacji mlekowej *Lactobacillus casei* eub1B, *Lactobacillus salivarius* eub2B oraz *Lactobacillus sakei* eub3B do produkcji preparatu probiotycznego do zabezpieczenia zwierząt przed chorobotwórczymi bakteriami *E. coli* i *C. perfringens* oraz do dezynfekcji powierzchni ich ciał, a także pomieszczeń inwentarskich środkami zawierającymi komórki i/lub metabolity tych kompozycji.

Pod pojęciem probiotyku rozumie się produkt zawierający aktywne formy bakterii probiotycznych, który wpływa korzystnie na zdrowie zwierząt. Pod terminem „korzystny wpływ” rozumie się ograniczenie biegunek i chorób przewodu pokarmowego wywołanych patogennymi mikroorganizmami z gatunków *E. coli* i *C. perfringens*, lepszą ogólną kondycję zwierząt i inne korzystne efekty spożywania probiotyku. Termin probiotyk obejmuje preparaty samych komórek bakteryjnych, preparaty komórek bakteryjnych wraz z dodatkami, premiksy i inne dodatki paszowe zawierające probiotyczne bakterie, a także pasze zawierające probiotyczne szczepy.

Zakażenia zwierząt hodowlanych chorobotwórczymi mikroorganizmami stanowią główną przyczynę strat ekonomicznych oraz w poważnym stopniu utrudniają zapewnienie bezpieczeństwa biologicznego żywności w przemyśle przetwórczym. Przeważająca część zakażeń bakteryjnych u zwierząt dotyczy ich przewodu pokarmowego i objawia się stanami zapalnymi jelit i biegunkami. U cieląt, w pierwszym miesiącu życia, aż 70% upadków jest spowodowanych ostrymi biegunkami. Wśród najgroźniejszych drobnoustrojów chorobotwórczych atakujących przewód pokarmowy zwierząt przeżuujących, szczególnie bydła, są enterotoksyczne szczepy bakterii z gatunku *Escherichia coli*, w tym szczególnie szczep ETEC wytwarzający niebezpieczną toksynę STa, wywołującą zmiany chorobowe w enterocytach jelita cienkiego (Kolendra i in. 2015). Bakterie te atakują cielęta szczególnie w pierwszych dniach po urodzeniu. Skutkiem ataku bakteryjnego jest biegunka sekrecyjna wywołana zaburzeniami transportu elektrolitów w obrębie nabłonka jelitowego. Inwazji bakterii z grupy *coli* towarzyszy często atak rotawirusów. Choroba objawia się szybkim odwodnieniem organizmu zwierzęcia, kończącym się często śmiercią zwierzęcia.

Wśród groźnych patogenów wykrywanych u przeżuwaczy wymieniane są także szczepy z gatunku *Clostridium perfringens*. Szczepy te u przeżuwaczy powodują krwotoczne zapalenie jelit, które jest konsekwencją produkcji alfatoksyny, związku o aktywności fosforylasy C i sfmgomielinazy. Choroba ta występuje zwłaszcza u młodych zwierząt, szczególnie cieląt, jagniąt i koźląt (Rypuła i in. 2012).

Dotychczas w ochronie zwierząt przed patogenami stosowano osłonę antybiotykową. Antybiotyki, podawane z paszami, pełniły podwójną rolę – chroniły zwierzęta przed inwazją patogenów i jednocześnie stymulowały wzrost zwierząt. Masowe stosowanie antybiotyków spowodowało jednak pojawienie się antybiotyko-opornych szczepów patogennych bakterii, co doprowadziło do wydania zakazu stosowania antybiotyków w żywieniu zwierząt na terenie UE.

Rolę antybiotyków w żywieniu zwierząt przejmują obeCN1e probiotyki. Terminem tym określa się produkty zawierające bakterie, które podane w odpowiedniej ilości, wywierają korzystny wpływ na dobrostan zwierząt, którym zostały podane. Dzięki stosowaniu probiotyków można ograniczyć liczbę zachorowań i złagodzić ich przebieg, stymulować szybszy wzrost zwierzęcia, osiągać lepsze wykorzystanie paszy i poprawiać ogólną kondycję zwierząt. Zdecydowana większość bakterii probiotycznych należy do grupy bakterii fermentacji mlekowej, takich rodzajów jak *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Pediococcus*, *Streptococcus* i *Enterococcus*. W wyniku intensywnych badań i eksperymentów żywieniowych na zwierzętach uzyskano bogatą wiedzę na temat mechanizmów oddziaływania probiotyków na zwierzęta (Gaggia i in. 2010). Jedną z najważniejszych aktywności probiotycznych wykorzystywanych w praktyce hodowlanej jest zdolność do hamowania wzrostu i redukcji liczebności komórek bakterii chorobotwórczych. Antagonistyczne działanie probiotycznych bakterii fermentacji mlekowej w stosunku do patogenów bakteryjnych może być efektem syntezy substancji antybakteryjnych. kolonizacji ścian przewodu pokarmowego zwierząt i tym samym niedopuszczania do ich kolonizacji przez

bakterie chorobotwórcze, aglomerowania komórek bakterii probiotycznych z komórkami bakterii patogennych i ich usuwaniem z przewodu pokarmowego wraz z kałem oraz konkurencji o substancje pokarmowe. Aktywność hamująca oraz bójcza w stosunku do patogenów wynika najczęściej z produkowania przez bakterie fermentacji mlekowej substancji hamujących lub zabijających bakterie chorobotwórcze, jak bakteriocyny, nadtlenuk wodoru, aldehyd octowy, kwasy organiczne i inne metabolity.

Aktywność antagonistyczną wykrywa się w testach laboratoryjnych wykonywanych metodami dyfuzyjnymi. Pojawienie się stref przejaśnień wokół punktu naniesienia testowanych bakterii fermentacji mlekowej świadczy o aktywności antibakteryjnej badanego szczepu/izolatu. Im większa jest średnica strefy przejaśnienia, tym silniejsza jego aktywność antibakteryjna.

W praktyce do zwalczania bakterii chorobotwórczych wykorzystywane są preparaty zawierające pojedyncze gatunki bakterii probiotycznych lub ich kompozycje. W technice znanych jest szereg rozwiązań opisujących wykorzystanie bakterii probiotycznych do zwalczania *E. coli* i *C. perfringens*.

Rozwój wiedzy na ten temat doprowadził do pojawienia się wielu rozwiązań technicznych wykorzystujących probiotyki do zwalczania chorobotwórczych szczepów bakterii *Escherichia coli* i *Clostridium perfringens* u przeżuwaczy.

W rozwiązaniu znanym z opisu US2013115328 przedstawiono mikrokapsułkowany probiotyk do zwalczania bakterii chorobotwórczych *Escherichia coli* O157:H7 u cieląt. W skład tego probiotyku wchodzi co najmniej jeden z izolatów bakterii należących do gatunku *Lactobacillus paracasei*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *Bifidobacterium animalis* i *B. bifidum*. Do kapsułkowania bakterii zastosowano karagen. Podano, że probiotyczne bakterie, dozowane w ilości 10^{10} jtk/dzień do odcinka przewodu pokarmowego za żwaczem, wywołują u przeżuwaczy redukcję liczebności bakterii *Escherichia coli*. Bakterie probiotyczne są nanoszone na powierzchnię dziennej porcji paszy lub wstrzyknięte analnie do przewodu pokarmowego zwierzęcia. Probiotyk jest przeznaczony dla krów, owiec, kóz i jeleni.

Z opisu WO2005009139 znany jest probiotyk wykazujący antagonistyczne działanie wobec patogennych *E. coli* O157:H7. W tym przypadku do zwalczania tego patogena u krów zastosowano probiotyczne bakterie *Enterococcus* podawane indywidualnie lub w kompozycji z *Lactobacillus acidophilus* i *Enterococcus faecium* SF-273. Probiotyk ten obniża liczebność patogenów, co najmniej o dwa cykle logarytmiczne. Dzienna dawka tego probiotyku wynosi 10^7 – 10^{12} jtk dziennie w przeliczeniu na zwierzę. Zastosowanie *E. faecium* F-273 opisano także w patencie US20050084483. Antagonistyczne działanie wobec patogennych *E. coli* O157:H7 u bydła wykazały też bakterie probiotyczne *Enterococcus faecium* SF-273 i SF-301 i *Lactobacillus acidophilus*, co opisano w zgłoszeniu US2005084483.

W patencie CN1703146 do zwalczania infekcji bakterii chorobotwórczych u przeżuwaczy, a szczególnie patogennych *E. coli* O157:H7, zaproponowano długą listę probiotycznych szczepów z rodzaju *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* i *Streptococcus*, szczególnie zaś probiotyczny szczep *Lactobacillus acidophilus* LA51 i LA45. Bakterie mlekowe mogą być podawane indywidualnie lub w połączeniu ze sobą lub z *Propionibacterium freundenreichii*. Ta sama grupa autorów ujawniła dodatkowe rozwiązania w opisie US2014286919 łącząc probiotyczny szczep *Lactobacillus animalis* LA51 z bakteriami *Propionibacterium freundenreichii* P9, P42 i P24, wykazującymi zdolność do fermentacji laktozy. Również ten probiotyk jest przeznaczony do ochrony bydła.

W innym opisie patentu koreańskiego K.R101164512 przedstawiono kompozycję probiotyczną dla bydła, w tym cieląt, składającą się ze szczepów bakterii fermentacji mlekowej, należących do rodzaju *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* i *Pediococcus*, które wykazują zdolność zwalczania w przewodzie pokarmowym zwierząt chorobotwórczych bakterii *Salmonella gallinarum*, *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni* i *Clostridium perfringens*. Probiotyk zawiera 10^7 – 10^{15} jtk/g i jest podawany w ilości 10^{10} – 10^{13} jtk/zwierzę.

Do hamowania *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* i *Vibrio* u bydła, owiec, kóz, bizonów, bawołów, żyraf i wielbłądów, a szczególnie krów, zastosowano probiotyczny szczep bakterii *Lactobacillus* PTA-5249, ujawniony w opisie US7323166 i zdeponowany w kolekcji ATCC.

W rozwiązaniu znanym z opisu CN102373172 do zwalczania bakterii *Salmonella* i *E. coli* u zwierząt gospodarskich użyto szczepu *Enterococcus faecium* CGMCC 5058.

W opisie RU2246537 do zwalczania patogennych bakterii *E. coli* zaproponowano szczep bakterii *Bacillus subtilis* VKM B-2287, natomiast w rozwiązaniu MX2014012098 do niszczenia chorobotwórczych bakterii *E. coli* i *Clostridium perfringens* wykorzystano probiotyczne szczepy, z rodzaju *Bacillus*, a mianowicie *B. majovensis* DSM 25839, *B. amyloliquefaciens* DSM 25840, DSM 27032 i *B. subtilis* DSM 25841, a także ich mutanty. Z kolei w opisie RU2231362 do niszczenia patogenów u cieląt za-

stosowano bakterie z rodzaju *Bifidobacterium*. Niektóre kompozycje probiotyczne dla przeżuwaczy zawierają stosunkowo rzadko stosowane gatunki bakterii, jak przykładowo w patencie RU2260043, w której obok *Lactobacillus acidophilus* występują jeszcze *Ruminococcus flavefaciens*, *Clostridium cellohioparum* i *Propionibacterium acnes*. Podobnie w opisie CN104363769 do zwalczania biegunek u bydła, owiec, koni, świń i drobiu użyto szczepu *Faecalibacterium prausnitzii*. Oryginalne podejście do probiotycznych izolatów prezentuje rozwiązanie ujawnione w opisie US2007009577, które obejmuje nieokreślone gatunkowo izolaty z przewodu pokarmowego zwierząt, pasz spożywanych przez zwierzęta, np. trawy, i środowisk przebywania krów, owiec i kóz, ale także dzikich zwierząt afrykańskich, jak bawoły, antylopy, a także jeleni, łosi i lam.

Wśród probiotycznych szczepów wykorzystywanych do zwalczania enteropatogennych i enterotoksycznych bakterii *E. coli* wykorzystywany jest także szczep *L. casei* ATCC PTA-3945, przedstawiony w opisie CA2520178. Z kolei *Lactobacillus johnsonii* D115 wykazuje antagonistyczną aktywność wobec wielu gatunków bakterii patogennych, w tym wobec *E. coli* i *Clostridium perfringens*, co przedstawiono w opisie AU2008245685.

Kompozycję złożoną z *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium longum*, *Bacillus subtilis* i *B. licheniformis* zastosowano do ochrony sanitarnej bydła i drobiu, co przedstawiono w opisie CN101368165. W opisie CN103636923 do zwalczania bakterii chorobotwórczych z gatunku *E. coli* wykorzystano bakterie *Bacillus coagulans* CGMCC5233. Probiotyk zawierający ten szczep uzyskano na drodze fermentacji w podłożu stałym złożonym z wielu składników roślinnych, w tym otrębów ryżowych, mąki sojowej i ekstraktu słodowego.

Obok wymienionych szczepów do zwalczania chorobotwórczych szczepów *E. coli* stosuje się także takie szczepy probiotyczne, jak *Lactobacillus casei* KE01, ujawniony w opisie US6797266, oraz *Lactobacillus murinus*, *L. pentosus*, *L. salivarius* i *Pediococcus pentosaceus*, ujawnione w opisie US8603461. Szczepy te wprowadzane są do przewodu pokarmowego zwierząt z paszą.

Opisy bakterii probiotycznych działających antagonistycznie wobec bakterii *Escherichia coli* można znaleźć także w patentach opublikowanych przez Urząd Patentowy RP. W opisie PL 209987 przedstawiono charakterystykę probiotycznego szczepu *Lactobacillus casei* ŁOCK 0915, zdeponowanego w Kolekcji Czystych Kultur Przemysłowych ŁOCK pod numerem ŁOCK 0915 oraz w Zakładzie Mikrobiologii Molekularnej Narodowego Instytutu Leków pod numerem depozytu 08/01/2012. Szczep ten wykazuje zdolność do zwalczania patogennych *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis*, *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes* i *C. jejuni*. W opisie PL 209986 scharakteryzowano inny szczep *L. casei* ŁOCK 0908, który wykazuje aktywność wobec *E. coli* i grupy innych bakterii chorobotwórczych.

Przykłady zwalczania chorobotwórczych *E. coli* i *C. perfringens* u przeżuwaczy przez probiotyczne bakterie opisano także w literaturze naukowej. Niewątpliwie głównym zagrożeniem zdrowia dla przeżuwaczy wśród chorobotwórczych patogenów jest *E. coli* O157: H17 (Lejeune i in. 2007). Drobnooustroje zawarte w probiotykach mają zdolność do szybkiego namnażania się w przewodzie pokarmowym zwierząt, konkurując z enterotoksycznymi szczepami *E. coli* i innymi bakteriami patogennymi, stabilizują kwasowość przewodu pokarmowego i zmniejszają śmiertelność oraz częstość występowania biegunek (Von Buenau i in. 2005, Timmerman i in. 2005). Ponadto powodują poprawę strawności składników pokarmowych pasz, wytwarzają substancje o działaniu antybiotycznym, zwiększają aktywność enzymów jelitowych, redukują toksyczne aminy biogenne oraz obniżają stężenie amoniaku w przewodzie pokarmowym i we krwi.

Stosowanie dodatków probiotycznych jest szczególnie wskazane w początkowym okresie życia cieląt ze względu na modyfikację i stabilizację mikroflory przewodu pokarmowego, co zapobiega zakażeniom jelit, poprawia smakowitość karmy, wspomaga procesy trawienia i odporność organizmu, przyspiesza rozwój przedżołądków oraz poprawia przyrosty masy ciała. Wykazano, że probiotyki podawane dorosłemu bydłu optymalizują funkcje żwacza, poprawiają wykorzystanie węglowodanów strukturalnych, stymulują produkcję lotnych kwasów tłuszczowych, co prowadzi do wzrostu koncentracji tłuszczu w mleku, poprawiają także zdrowotność krów oraz wskaźniki rozrodu (Adams i in. 2008, Sauvante 2009).

W publikacji Newbolda (1995) opisano użycie probiotycznych bakterii mlekowych do zwalczania chorób przewodu pokarmowego u zwierząt przeżuwających wywołanych przez enteropatogenne szczepy *Escherichia coli*. Wśród korzyści ze stosowania probiotyków u cieląt i jagniąt, szczególnie zawierających bakterie *Lactobacillus*, wymieniono redukcję miana *coli*, hamowanie biegunek, a także większe pobieranie paszy, zwiększenie przyrostów ciała i mniejszą śmiertelność.

Frizzo i in. (2011) dokonali meta analizy wpływu probiotyków na mikrobiotę przewodu pokarmowego młodych cieląt i wykazali, że wprowadzenie do diety probiotycznych szczepów bakterii fermentacji mlekowej hamuje rozwój patogenów, co zapobiega biegunkom i poprawia wzrost cieląt. Profilaktyka probiotyczna jest szczególnie ważna dla zdrowia zwierząt w pierwszych tygodniach po porodzie. Najczęściej podawanymi produktami probiotycznymi są preparaty mleko-zastępcze i startery zawierające bakterie z rodzaju *Lactobacillus*, *Enterococcus* i *Bifidobacterium*. Opis sposobu izolacji i skringu bakterii mlekowych o właściwościach probiotycznych przeznaczonych dla bydła mlecznego przedstawiono w publikacji Nader-Macias i in (2008). Podanie młodym jagniętom preparatów zawierających probiotyczne bakterie fermentacji mlekowej pozwoliło na redukcję rozprzestrzeniania się patogennego szczepu *E. coli* O157:H7 (Lema i in. 2001). Do zwalczania patogennych szczepów *Clostridium perfringens* u zwierząt zalecane są probiotyczne szczepy z rodzaju *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Pedococcus*, *Streptococcus* i *Bacillus* (Allaart i in. 2013).

W ostatnich dwóch dekadach na rynkach światowych pojawiło się szereg produktów probiotycznych dla zwierząt przeżuwających, przeznaczonych do zwalczania bakterii chorobotwórczych. Mimo rosnącej oferty problem bezpieczeństwa biologicznego hodowli zwierząt nie został definitywnie rozwiązany. Przyczyną tego jest duża naturalna zmienność genetyczna bakterii chorobotwórczych i bakterii probiotycznych. Dodatkowo efekt antagonizmu między mikroorganizmami jest zależny od oporności patogena na metabolity wytwarzane przez bakterie probiotyczne. Wrażliwość ta jest zmienna i po dłuższym stosowaniu probiotyków na danym terenie pojawiają się szczepy patogenów odporne na biobójcze czynniki wytwarzane przez mikroorganizmy probiotyczne. Występuje tu pełna analogia do uodparniania się bakterii chorobotwórczych na antybiotyki. Oznacza to, że dla ochrony zwierząt konieczne jest nieustanne poszukiwanie nowych szczepów bakterii probiotycznych wykazujących antagonistyczną aktywność wobec patogenów występujących aktualnie na danym terenie. Problemem jest dostosowanie odpowiednich probiotyków do lokalnie występujących szczepów drobnoustrojów chorobotwórczych.

Rozwiązaniem problemu jest znalezienie nowych szczepów mikroorganizmów probiotycznych, bezpiecznych dla zwierząt i ludzi, które mają zdolność hamowania, a nawet niszczenia, patogenów aktualnie występujących na danym obszarze.

W celu pozyskania nowych szczepów przeprowadza się procedurę izolacji mikroorganizmów z naturalnych źródeł oraz skring pod kątem aktywności pozyskanych izolatów wobec bakterii wskaźnikowych, którymi są szczepy bakterii chorobotwórczych aktualnie występujące w fermach zwierząt hodowlanych lub w środowisku bytowania zwierząt dzikich. Dla pozyskania skutecznych szczepów bakterii probiotycznych konieczne jest prowadzenie skringu izolatów bakterii probiotycznych wobec patogenów występujących w danym momencie na obszarze, na którym ma być przeprowadzana ochrona zwierząt przed tymi patogenami.

Idąc za tym tokiem rozumowania przeprowadzono skring bakterii fermentacji mlekowej wyizolowanych z ferm wobec chorobotwórczych szczepów bakterii *Escherichia coli* i *Clostridium perfringens* zebranych aktualnie z terenu Polski i nieoczekiwanie odkryto nowe szczepy bakterii fermentacji mlekowej zdolne do hamowania wzrostu i niszczenia tych patogenów. Szczególnie silną aktywność w stosunku do patogennych dla bydła bakterii wykazały szczepy *Lactobacillus casei* eub1B, *Lactobacillus salivarius* eub2B oraz *Lactobacillus sakei* eub3B.

Nowy szczep bakterii fermentacji mlekowej o właściwościach probiotycznych *Lactobacillus casei* eub1B według wynalazku charakteryzuje się sekwencją nukleotydową regionu DNA kodującego gen 16S rRNA, określającą jego przynależność gatunkową wskazaną pod numerem 1 w wykazie sekwencji nukleotydowych.

Nowy szczep bakterii fermentacji mlekowej o właściwościach probiotycznych *Lactobacillus salivarius* eub2B według wynalazku charakteryzuje się sekwencją nukleotydową regionu DNA kodującego gen 16S rRNA, określającą jego przynależność gatunkową wskazaną pod numerem 2 wykazu sekwencji.

Nowy szczep bakterii fermentacji mlekowej o właściwościach probiotycznych *Lactobacillus sakei* eub3B według wynalazku charakteryzuje się sekwencją nukleotydową regionu DNA kodującego gen 16S rRNA, określającą jego przynależność gatunkową wskazaną pod numerem 3 wykazu sekwencji.

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

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

Lactobacillus salivarius eub2B = *Lactobacillus salivarius* B/00102

Lactobacillus sakei eub3B = *Lactobacillus sakei* B/00101

Nowe, nieznane i nieopisane szczepy bakterii fermentacji mlekowej *Lactobacillus casei* eub1B, *Lactobacillus salivarius* eub2B oraz *Lactobacillus sakei* eub3B według wynalazku wykazują aktywność antagonistyczną wobec chorobotwórczych szczepów bakterii *Escherichia coli* i *C. perfringens*.

W poszukiwaniu nowych szczepów bakterii probiotycznych przyjęto trzy założenia: (1) do izolacji będzie pobierany materiał od zdrowych osobników zwierząt należących do grupy, która ma być chroniona, w tym przypadku przeżuwaczy, (2) pozyskiwane będą selektywnie izolaty należące do bakterii fermentacji mlekowej zaliczanych do grupy GRAS (generally recognized as safe) oraz (3) w stosowanie w testach skринingowych wyłącznie chorobotwórczych szczepów bakterii *E. coli* i *C. perfringens* pobranych aktualnie przez służby weterynaryjne od chorych zwierząt z ferm zlokalizowanych na terenie Polski.

Korzystnie izolacja bakterii polegała na pobraniu próbek kału, korzystnie smółki oraz wymazów z pysków cieląt, a także ściółki a następnie na namnożeniu tych bakterii na pożywce MRS. selektywnie wspomagającej wzrost bakterii fermentacji mlekowej. Następnie z otrzymanych kolonii wyprowadzono monokultury tych izolatów. W ten sposób uzyskano bank monokultur bakterii mlekowych wyizolowanych ze środowiska zwierząt. Następnie przeprowadzono procedurę skринingową mającą na celu wyłonienie spośród pozyskanych izolatów bakteryjnych tych, które wykazują zdolność niszczenia chorobotwórczych szczepów bakterii *Escherichia coli* i *C. perfringens*.

Korzystnie szczepy chorobotwórcze *E. coli* i *C. perfringens*, wobec których testowano izolaty bakterii mlekowych, pozyskano od weterynarzy z różnych części Polski, którzy pobrali je od zwierząt zaatakowanych przez enteropatogenne bakterie *E. coli* i *C. perfringens*.

Procedura skринingu polegała na wysianiu chorobotwórczych szczepów bakterii *E. coli* i *C. perfringens* na pożywce umieszczonej na płytkach Petriego. a następnie naniesieniu na nie punktowo komórek badanego izolatu. Po wspólnej inkubacji obu mikroorganizmów na płytkach przez okres co najmniej 24 godzin mierzono średnice powstałych stref przejaśnień. Strefa przejaśnienia oznacza, że komórki badanego izolatu bakterii mlekowych wykazują zdolność niszczenia komórek bakterii chorobotwórczych, a więc wykazują działanie antagonistyczne wobec tych patogenów. Izolaty te wybierano do dalszych badań mających na celu ustalenie czy mogą być one zastosowane w ochronie zwierząt przed patogenami, wpływając korzystnie na dobrostan zwierząt.

Kolejnym krokiem w badaniach była identyfikacja przynależności taksonomicznej szczepów najaktywniejszych spośród wyizolowanych wobec patogennych *E. coli* i *C. perfringens*. Korzystnie identyfikację przynależności gatunkowej izolatów oparto na sekwencjonowaniu genu 16S rRNA izolatów. Zidentyfikowane izolaty zdeponowano w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów we Wrocławiu. Przynależność gatunkowa nowych szczepów bakterii fermentacji mlekowej została potwierdzona co najmniej 97% homologią do sekwencji 16S rRNA danego gatunku.

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

Aby wykazać oporność pozyskanych szczepów na niskie pH zbadano ich przeżywalność w środowisku o pH 2.0. Wykazano, że 2 h inkubację w tych warunkach przeżyły szczepy *Lactobacillus casei* eub1B, *Lactobacillus salivarius* eub2B oraz *Lactobacillus sakei* eub3B.

Następnie przeprowadzono test oporności na sole żółciowe, polegający na inkubacji pozyskanych szczepów przez 4 h w środowisku zawierającym 3% dodatek soli żółciowych. Korzystnie wykazano, że test ten przeżywały szczepy *Lactobacillus casei* eub1B, *Lactobacillus salivarius* eub2B oraz *Lactobacillus sakei* eub3B. Wszystkie badane szczepy były zatem odporne na niskie pH i działanie soli kwasów żółciowych (wytrzymywały warunki zbliżone do panujących w przewodzie pokarmowym).

Kolejne badania objęły określenie właściwości adhezyjnych bakterii do mucyny świńskiej. Test ten pozytywnie przeszły szczepy *Lactobacillus casei* eub1B, *Lactobacillus salivarius* eub2B oraz *Lactobacillus sakei* eub3B.

Biomasa komórkowa szczepów bakterii probiotycznych. wchodzących w skład kompozycji, może być otrzymywana w wyniku namnożenia komórek w pożywkach ciekłych lub półstałych o składzie dostosowanym do wymogów kultur bakterii fermentacji mlekowej. Korzystnie w skład

podłoża hodowlanego powinien wejść jeden z mono- lub disacharydów, organiczne źródło azotu zawierające aminokwasy i krótkie peptydy, witaminy z grupy B i potrzebne sole mineralne. Przykładowo, odpowiednim podłożem do hodowli probiotycznych bakterii fermentacji mlekowej jest handlowa pożywka MRS (bulion DeMan-Rogosa-Sharpe), serwatka podpuszczkowa lub kwasowa, podłoże melasowe. W trakcie hodowli bakterii korzystne jest stabilizowanie pH pożywki do poziomu powyżej 5.0. Hodowlę bakterii wchodzących w skład kompozycji prowadzi się w warunkach beztlenowych lub względnie beztlenowych w temperaturze 30–42°C, korzystnie 35–37°C. Po zakończeniu hodowli korzystnie jest wydzielić komórki z ciekłego podłoża przez wirowanie lub mikrofiltrację i uzyskać w ten sposób koncentrat komórkowy, który następnie może być utrwalany przez zamrożenie lub wysuszenie. W przypadku hodowli bakterii w podłożu półstałym/stałym, w którym aktywność wody wynosi powyżej 0,95, bakterie suszy się lub zamraża z całym podłożem.

Probiotyk do zwalczania patogennych szczepów bakterii *Escherichia coli* u zwierząt przeżuwających, zwłaszcza cieląt według wynalazku zawiera nowy szczep bakterii *Lactobacillus sakei* eub3B. Korzystnie, jego postać aplikacyjna zawiera w jednym gramie co najmniej 10^6 jtk, korzystnie 10^6 – 10^{11} jtk.

Kompozycja probiotyczna do zwalczania patogennych szczepów bakterii *Clostridium perfringens* u zwierząt przeżuwających, zwłaszcza cieląt według wynalazku zawiera nowy szczep bakterii fermentacji mlekowej *Lactobacillus casei* eub1B i/lub *Lactobacillus salivarius* eub2B. Szczepy bakterii fermentacji mlekowej wchodzące w skład kompozycji probiotycznej mogą być stosowne jako szczepy alternatywne, wymienne w danej kompozycji w razie ataku wirusowego. Postać aplikacyjna kompozycji zawiera w jednym gramie, co najmniej 10^6 jtk, korzystnie 10^9 – 10^{11} jtk.

Kompozycja probiotyczna do zwalczania patogennych szczepów bakterii *Escherichia coli* i *Clostridium perfringens* u zwierząt przeżuwających, zwłaszcza cieląt według wynalazku zawiera nowe szczepy bakterii fermentacji mlekowej *Lactobacillus sakei* eub3B i *Lactobacillus casei* eub1B i/lub *Lactobacillus salivarius* eub2B. Szczepy bakterii fermentacji mlekowej wchodzące w skład kompozycji probiotycznej mogą być stosowne jako szczepy alternatywne, wymienne w danej kompozycji w razie ataku wirusowego. Postać aplikacyjna kompozycji zawiera w jednym gramie, co najmniej 10^6 jtk, korzystnie 10^9 – 10^{11} jtk.

Zastosowanie kompozycji probiotycznej do zwalczania patogennych szczepów bakterii *Escherichia coli* i/lub *Clostridium perfringens* według wynalazku polega na produkcji preparatu probiotycznego zawierającego nowe szczepy bakterii fermentacji mlekowej *Lactobacillus casei* eub1B i/lub *Lactobacillus salivarius* eub2B i/lub *Lactobacillus sakei* eub3B i podawaniu go zwierzętom przeżuwającym, zwłaszcza cielętom w celu ograniczania rozwoju chorobotwórczych szczepów bakterii *Escherichia coli* i *Clostridium perfringens*. Kompozycja probiotyczna jest podawana zwierzętom doustnie, wziewnie lub doodbytniczo w ilości co najmniej 10^7 – 10^9 jtk/kg masy ciała zwierzęcia dziennie, korzystnie 10^8 jtk/kg masy ciała zwierzęcia dziennie. Korzystnie, kompozycja probiotyczna jest podawana zwierzętom doustnie razem z wodą, mlekiem, preparatami mlekozastępczymi, paszą, dodatkami paszowymi lub w formie specjalnych preparatów bakteryjnych.

Zastosowanie kompozycji do produkcji preparatu do dezynfekcji ciał zwierząt i miejsca ich przebywania według wynalazku polega na dezynfekcji ciał zwierząt i miejsc ich przebywania środkami zawierającymi w swoim składzie nowe szczepy bakterii fermentacji mlekowej *Lactobacillus casei* eub1B i/lub *Lactobacillus salivarius* eub2B i/lub *Lactobacillus sakei* eub3B i/lub ich metabolity. Metabolitami bakterii probiotycznych stosowanymi w celach dezynfekcji są bakteriocyliny i/lub kwasy organiczne i/lub nadtlenuk wodoru i/lub aldehyd octowy i/lub D-aminokwasy i/lub kwasy tłuszczowe i/lub cały płyn pohodowlany bakterii probiotycznych. Korzystnie, kompozycje i/lub metabolity są stosowane w formie zawiesiny komórkowej lub w formie utrwalonej.

Zgodnie z wynalazkiem, na podstawie wyników testów opracowano kompozycje probiotycznych szczepów bakterii fermentacji mlekowej, dobierając grupy drobnoustrojów pod kątem ich pochodzenia odzwierzęcego. Przykładowo, szczepy wyizolowane od cieląt mogą stanowić środek do ochrony bydła i innych przeżuwaczy przed patogennymi szczepami *E. coli* i/lub *C. perfringens*. Korzystnie ochrona tych zwierząt odnosi się szczególnie do patogennych szczepów *E. coli* i/lub *C. perfringens* występujących na terenie Polski.

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

Przedmiot wynalazku przedstawiono w przykładach wykonania.

Przykład 1. Izolacja i skryning na aktywność antagonistyczną

Z pyska zdrowych cieląt wykonano wymazy, natomiast ze ściółki pobrano próbki ich kału. Pobrany materiał zhomogenizowano, a następnie rozcieńczono metodą rozcieńczeń dziesiętnych i posiano na płytki Petriego, które zalano pożywką MRS-agar o składzie (g/l): agar 20,0 ekstrakt drożdżowy – 5,0, ekstrakt mięsny – 10,0, pepton K – 10,0, glukoza – 20,0, cytrynian amonu – 2,0, fosforan dwupotasowy – 2,0, octan sodu – 5,0, siarczan magnezu 0,1, siarczan manganu – 0,05. Płytki inkubowano w warunkach beztlenowych w temperaturze 35–37°C przez co najmniej 48 godzin. Po inkubacji sterylną eżą pobrano pojedyncze kolonie i wprowadzono do ciekłej pożywki MRS umieszczonej w probówkach szczelnie zamykanych korkiem. Hodowle izolatów prowadzono w temperaturze 35–37°C przez 24 h, a następnie wykonano z nich preparaty barwione metodą Grama. Monokultury oznaczono numerami pozwalającymi identyfikować je pod względem pochodzenia i zabezpieczano w ciekłym azocie. Utworzono w ten sposób bank izolatów bakterii fermentacji mlekowej naturalnie bytujących w organizmie cieląt.

Izolaty badano dalej w kierunku zdolności oddziaływania na patogenne szczepy bakterii *E. coli* i *C. perfringens*, pozyskane z Państwowego Instytutu Weterynarii w Puławach.

W testach stosowano trzy szczepy *E. coli* wyizolowane od chorych zwierząt z różnych regionów Polski. Na płytkach Petriego umieszczono podłoże – bulion wzbogacony z dodatkiem 2% glukozy i 1% agaru uprzednio zaszczepione chorobotwórczymi szczepami *E. coli*. Po zestaleniu wprowadzano na nie kolejno po 20 µl zawiesiny każdego badanego izolatu bakteryjnego. Aktywność każdego izolatu testowano wobec trzech różnych szczepów *E. coli*.

Po 24 godzinach inkubacji w temperaturze 35–37°C dokonywano pomiaru średnicy stref przejaśnień wokół miejsc naniesienia zawiesiny izolatów. Na tej podstawie sporządzono ranking izolatów o antagonistycznej aktywności wobec testowanych szczepów. Aktywność w stosunku do wszystkich badanych szczepów *Escherichia coli* wykazał izolat *Lactobacillus sakei* eub3B. Izolat ten wykorzystano do konstrukcji preparatu probiotycznego.

W analogiczny sposób wykonano test na antagonistyczną aktywność wyizolowanych szczepów wobec patogennych *Clostridium perfringens*. Do testu użyto 4 szczepów *C. perfringens*, pozyskanych z różnych regionów Polski. Każdy z izolatów bakterii fermentacji mlekowej testowano wobec wszystkich 4 chorobotwórczych szczepów *C. perfringens*. Bakterie *C. perfringens* hodowano na płytkach Petriego w pożywce RCM-agar (Reinforced Clostridial Medium). W wyniku testu wykazano, że najsilniejszą aktywnością antagonistyczną w stosunku do wszystkich testowanych szczepów *C. perfringens* charakteryzowały się izolaty *Lactobacillus casei* eub1B i *Lactobacillus salivarius* eub2B.

Przykład 2. Identyfikacja izolatów

W wyniku hodowli wstępnej izolatów wybranych w przykładzie 1. pozyskano biomasę komórkową, z której izolowano bakteryjne DNA. Następnie przeprowadzono sekwencjonowanie regionu DNA kodującego gen 16S rRNA. Otrzymaną sekwencję nukleotydową genu 16S rRNA porównano za pomocą programu BLASTN 2.2.27+ z sekwencjami dostępnymi w bazie National Center of Biotechnology Information (NCBI). Na podstawie analizy porównawczej sekwencji genów 16S rRNA izolatu określono przynależność gatunkową poszczególnych izolatów. Wyniki badań zamieszczono w tabeli 1.

Tabela 1. Bakterie probiotyczne wykazujące aktywność przeciw chorobotwórczym szczepom *Escherichia coli*

Numer izolatu	Pochodzenie izolatu	Przynależność gatunkowa na podstawie sekwencjonowania 16S rRNA	Homologia do wzorca gatunku, %	Numer akcesyjny w depozycie Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów we Wrocławiu
eub2B	kał cieląt	<i>Lactobacillus casei</i>	99	B/00103
eub2B	kał cieląt	<i>Lactobacillus</i>	99	B/00102
		<i>salivarius</i>		
eub3B	wymaz z pyska	<i>Lactobacillus sakei</i>	98	B/00101

Sekwencja 16S rDNA szczepu *Lactobacillus casei* eub1B wskazana pod numerem 1 wykazu sekwencji nukleotydowych.

Sekwencja 16S rDNA szczepu *Lactobacillus salivarius* eub2B wskazana pod numerem 2 wykazu sekwencji nukleotydowych.

Sekwencja 16S rDNA szczepu *Lactobacillus sakei* eub3B wskazana pod numerem 3 wykazu sekwencji nukleotydowych.

Przykład 3. Hodowla bakterii

Izolaty bakterii mlekowych wymienione w przykładzie 2 hodowano w ciekłej pożywce o składzie (g/l): ekstrakt drożdżowy – 5,0, ekstrakt mięsny – 8,0, pepton K – 5,0, glukoza – 10,0, cytrynian amonu – 2,0, fosforan dwupotasowy – 2,0, octan sodu – 5,0, siarczan magnezu 0,1, siarczan manganu – 0,05. Hodowle prowadzono metodą okresową w bioreaktorze laboratoryjnym o poj. 3 L. Pożywkę sterylizowano metodą mikrofiltracji membranowej, a następnie zaszczipiano 2% v/v inoculum o stężeniu komórek ok. 10^9 jtk/ml. Hodowlę prowadzono w warunkach względnie beztlenowych w temperaturze 37°C, przy pH 6,0, z mieszaniem 80 obr./min. Po upływie 20 godzin hodowlę przerywano i oznaczano liczebność żywych komórek metodą klasycznych posiewów ilościowych. W opisanych warunkach uzyskiwano stężenie komórek powyżej 5×10^9 jtk/ml.

Przykład 4. Oporność na niskie pH

Hodowle szczepów otrzymane w przykładzie 3 odwirowywano, przemywano dwukrotnie solą fizjologiczną, a następnie zawieszano w 0,01 M buforze fosforanowym o pH 2,0. Stężenie wyjściowe komórek w zawiesinie doprowadzano do poziomu ok. 10^7 jtk/ml. Tak przygotowaną zawiesinę inkubowano przez 2 godziny w temp. 37°C. Po inkubacji metodą posiewów ilościowych oznaczano liczebność żywych komórek w zawiesinie. Ustalono, że ekspozycję na niskie pH przeżywały wszystkie badane szczepy, na co wskazują wyniki badań zamieszczone w tabeli 2.

Tabela 2. Przeżywalność bakterii probiotycznych w środowisku o niskim pH

Badany szczep	Początkowa liczebność komórek w zawiesinie jtk/ml	Końcowa liczebność komórek w zawiesinie jtk/ml
<i>Lactobacillus casei</i> eub1B	$5,06 \times 10^7$	$8,04 \times 10^5$
<i>Lactobacillus salivarius</i> eub2B	$2,66 \times 10^7$	$1,42 \times 10^4$
<i>Lactobacillus sakei</i> eub3B	$1,58 \times 10^7$	$1,17 \times 10^3$

Przykład 5. Oporność na sole żółciowe

Hodowle szczepów otrzymane w przykładzie 3 odwirowywano, przemywano dwukrotnie jałową solą fizjologiczną, a następnie zawieszano w 3% (w/v) roztworze soli żółciowych, wyjąłowanych na zimno za pomocą filtrów membranowych Millex GV (Millipore). Zawiesinę o stężeniu komórek ok. 10^7 jtk/ml inkubowano przez 4 godziny w temp. 37°C. Jako kryterium oceny wytrzymałości na działanie soli żółciowych przyjęto wyniki oznaczenia liczebności komórek po ekspozycji. Wyniki te przedstawiono w tabeli 3.

Tabela 3. Przeżywalność bakterii probiotycznych w obecności soli żółciowych

Badany szczep	Początkowa liczebność komórek w zawiesinie jtk/ml	Końcowa liczebność komórek w zawiesinie jtk/ml
<i>Lactobacillus casei</i> eub1B	$7,77 \times 10^7$	$3,02 \times 10^7$
<i>Lactobacillus salivarius</i> eub2B	$3,07 \times 10^7$	$2,50 \times 10^7$
<i>Lactobacillus sakei</i> eub3B	$1,42 \times 10^7$	$5,01 \times 10^4$

Przykład 6. Właściwości adhezyjne

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

Tabela 4. Zdolności adhezyjne probiotycznych bakterii po godzinnej ekspozycji wobec mucyny

Badany szczep	Stopień adhezji, % populacji wyjściowej
<i>Lactobacillus casei</i> eub1B	38,3
<i>Lactobacillus salivarius</i> eub2B	38,2
<i>Lactobacillus sakei</i> eub3B	36,3

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

Szczep *Lactobacillus sakei* eub3B wykazujący aktywność przeciw patogennym *E. coli* hodowano w bioreaktorze w pożywce MRS o zwiększonym dwukrotnie stężeniu ekstraktu drożdżowego i zredukowanej o połowę zawartości glukozy. Hodowle prowadzono przez 20 godzin. Następnie płyn pochowolany odwirowano w wirówce przy 4000 g przez 10 min. Uzyskaną gęstwą komórkową wymieszano z 20% dodatkiem niskoscukrzanej maltodekstryny i wysuszono w suszarni rozpyłowej. W suszu określono liczebność komórek metodą płytkową. Niewielką próbkę wytworzonego preparatu przeznaczono na testy mające potwierdzić jego aktywność antagonistyczną wobec patogennych *E. coli*. W tym celu susz bakteryjny wprowadzono do pożywki MRS na 18 godzin celem ożywienia zawartych w nim komórek, a następnie zaszczerpiono nim pożywkę MRS w kolbach o poj. 250 ml. Hodowle prowadzono przez 16 godzin w temp. 37°C. Uzyskaną kulturę wykorzystano do przeprowadzenia testu na aktywność antagonistyczną wobec *E. coli*, który przeprowadzono jedną ze znanych metod dyfuzyjnych. Testy dyfuzyjne potwierdziły zdolność badanego szczepu do antagonistycznego działania na patogenne *E. coli*.

Pozostały przygotowany preparat wymieszano z wodą w ilości 1,2 g/l. Wodą tą pojono trzy grupy cieląt, każda po 8 zwierząt przez okres 14 dni. Dzienna dawka bakterii probiotycznych podana zwierzęciu wynosiła 10^7 – 10^8 jtk/kg masy ciała. Próbę kontrolną stanowiła grupa zwierząt, której podawano paszę bez dodatku probiotyków. Zwierzęta były hodowane w pomieszczeniach o niskich standardach higienicznych. Wykazano, że zwierzęta należące do grupy odpajanej wodą z dodatkiem kompozycji probiotycznych nie miały biegunk, podczas gdy biegunki były obserwowane w grupie kontrolnej. Ponadto grupa kontrolna miała luźniejszy kał od grupy chronionej probiotykiem.

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

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

Kompozycja A: *Lactobacillus casei* eub1B i *Lactobacillus salivarius* eub2B (2:3)

Kompozycja B: *Lactobacillus casei* eub1B i *Lactobacillus salivarius* eub2B (1:1)

Kompozycja C: *Lactobacillus salivarius* eub2B.

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

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

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

Kompozycja A: *Lactobacillus casei* eub1B + *Lactobacillus sakei* eub3B (1:2)

Kompozycja B: *Lactobacillus salivarius* eub2B + *Lactobacillus sakei* eub3B (5:1)

Kompozycja C: *Lactobacillus casei* eub1B + *Lactobacillus salivarius* eub2B + *Lactobacillus sakei* eub3B (1:2:2)

Przykład 10. Dezynfekcja

Przeprowadzono hodowle bakterii probiotycznych *Lactobacillus salivarius* eub2B oraz bakterii *Lactobacillus sakei* eub3B w oddzielnych bioreaktorach. Jako medium hodowlane stosowano pożywkę MRS zawierającą zwiększoną zawartość glukozy do 30 g/l. Hodowle prowadzono w warunkach beztlenowych w temperaturze 32–35°C przez 18 godzin. Po tym czasie płyn pohodowlany poddano mikrofiltracji membranowej w celu usunięcia komórek, a następnie przeniesiono go do zbiornika aplikatora aparatu do dezynfekcji i spryskano nim powierzchnie posadzki w oborze. Preparat stosowano w ilości 20 ml/nr i pozostawiano na dezynfekowanych powierzchniach przez 15 minut. Dla porównania część posadzki nie dezynfekowano. Następnie pobrano wymazy z powierzchni dezynfekowanych i kontrolnych i oznaczono na nich pozostałą liczbę żywych komórek *Escherichia* oraz *Clostridium*, postępując zgodnie z normą PN-EN 13697. Stwierdzono, że w stosunku do powierzchni niedezynfekowanej liczebności żywych komórek bakterii *Escherichia* zmniejszyła się o co najmniej 10^5 a *Clostridium* o ponad 10^6 .

Literatura

- Lejeune J.T., Wetzel A.N.: Preharvest control of *Escherichia coli* O157 in cattle, J. Anim. Sci. 2007, 85, 73–80.
- Von Buenau R., Jaekel L., Schubotz E., Schwarz S., Stroff T., Krueger M.: *Escherichia coli* strain Nissle 1917: significant reduction of neonatal calf diarrhoea. J. Dairy Sci. 2005, 88, 317–323.
- Timmerman H.M., Mulder L., Everts EL van Espen D.C., van der Wal E., Klaassen G., Rouwcrs S.M., Hartemink R., Rombouts F.M., Beynen A.C.: Health and growth of veal calves fed milk replacers with or without probiotics. J. Dairy Sci. 2005, 88, 2154–2165.
- Adams M.C., Luo J., Rayward D., King S., Gibson R., Moghaddam G.H.: Selection of a novel direct-fed microbial to enhance weight gain in intensively reared calves. Anim. Feed Sci. Tech. 2008, 145, 41–52.
- Desnoyers M., Giger-Reverdin S., Bertin G., Duvaux-Ponter C., Sauvant D.: Metaanalysis of the influence of *Saccharomyces cerevisiae* supplementation on ruminal parameters and milk production of ruminants. J. Dairy Sci. 2009, 92, 1620–1632.
- Rypuła K., Płoneczka-Janeczko K., Kita J., Kumala A., Zakażenia zwierząt przez *Clostridium perfringens*. Życie Weterynaryjne 87(3). 192–197. 2012.
- Kolendra M., Burdukiewicz M., Schierack P.: A systematic review and meta-analysis of the epidemiology of pathogenic *Escherichia coli* of calves and the role of calves as reservoir for human pathogenic *E. coli*. Font Cell. Infect. Microbiol. 12 March 2015/<http://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2013.00023>
- Gaggia F., Mattarelli P., Biavati B.: Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. Int. J. Food Microbiol. 141. S15–S28, 2010.
- Newbold C.J.: Microbial feed additives for ruminants. In: Biotechnology in animal feeds and animal feeding. Chapter 13. Eds. Wallace RJ, Chesson A., Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany, 1995.
- Frizzo L.S., Zbrun MV, Soto LP, Signorini ML.: Effect of probiotic on growth performance in young calves: a meta-analysis of randomized controlled trials. Animal Feed Sci. Technol. 169, 147–156, 2011.
- Nader-Macias MEF, Otero MC, Espeche MC, Maldonado NC.: Advances in the design of probiotic products for the prevention of major diseases in dairy cattle. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 35, 1387–1395, 2008.
- Lema M. Williams L., Rao DR.: Reduction of fecal shedding of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in lambs by feeding microbial feed supplement. Small Ruminant Res. 39, 31–39, 2001.
- Allaart JG. Van Asten AJ AM. Groene A.: Predisposing factors and prevention of *Clostridium perfringens*-associated enteritis. Comparative Immun. Microbiol. Infectious Diseases 36, 449–464, 2013.

SEKWENCJA NUKLEOTYDOWA

<110> Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

<120> Nowe szczepy bakterii fermentacji mlekowej do zwalczania
Escherichia coli i Clostridium perfringens u zwierząt, zwłaszcza
u przeżuwaczy, ich kompozycje i zastosowania.

<130> P.416204

<160> 3

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1421

<212> DNA

<213> Lactobacillus casei

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

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

<220>

<221> misc_feature

<222> (1413)..(1413)

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

<400> sekwencja 1

anagggttac gccaccggct tcgggtgtta caaacctctca tgggtgtgacg ggcgggtgtgt 60
 acaaggcccc ggaacgtatt cacegeggeg tgctgatccg cgattactag cgattccgac 120
 ttctgttagg cgagttgcag cctacagtcc gaactgagaa ttgctttaag agattagctt 180
 gacctcggcg tctcgcaact cgttgtacca tccattgtag cactgtgtga gccacggtea 240
 taaggggcat gatgattga cgtcatcccc accttctcc ggtttgtae cggcagtctt 300
 actagagtgc ccaactaaat gctggcaact agtcataagg gttgcgctcg ttgcgggact 360
 taaccaaca tctcagaca cgagctgacg acaacctgc accacctgc attttgcccc 420
 cgaaggggaa acctgatcgc tcaggtgatc aaaagatgc aagacctggg aaggttcttc 480
 gcgttgcttc gaattaaacc acatgctcca cegctgtgc ggccccccgt caatctctt 540
 gagtccaac ctgcggctcg tactccccag gcggaatgt taatgcgta gctgcggcac 600
 tgaagggcgg aaacctcca acacctagca ttcatcttt acggcatgga ctaccagggt 660
 atetaatct gttegtacc catgtttcg agctcagcg tcagttacag accagacagc 720
 cgccttcgcc actgggtgta ttccatat ctacgcattt cacegtaca catggagttc 780
 cactgtctc ttctgaetc aagttccca gttccgatg cgttctctg gttaagccga 840
 gggctttcac atcagactta aaaaaccgcc tgcgctcgct ttacgcccc taaatccgga 900
 taacgttgc cactacgta ttaccgggc tgetggcag tagttagccg tggtttctg 960

gttgataacc gtaegeeega caacagttac tetgeegacc attettetec aacaacagag 1020

ttttacgacc cgaaagecctt cttactacac geggegttgc tccatcagac ttgcgtccat 1080

tgtggaagat tccctactgc tgcctcccggt aggagtttgg gcegtgtctc agtcccaatg 1140

tggccgatac aactctcagt tgggtacgt atcctcgctt tggtagacca ttactcacc 1200

aactagctaa tacgcgcggg gtccatccaa aagcgatagc ttacgccatc ttccagccaa 1260

gaacctgcg gttcttgat ctatcggtta ttacatctg ttccaaatg ttaccacca 1320

cctaagggea ggttaccac ggttactca cccgtccgc actcgttcca tgttgaatct 1380

cggtgcaagc accgacatc aacgagaact cgnegactgc a 1421

<210> 2

<211> 1116

<212> DNA

<213> Lactobacillus salivarius

<220>

<221> misc_feature

<222> (17)..(18)

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

<220>

<221> misc_feature

<222> (72)..(72)

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

<220>

<221> misc_feature

<222> (83)..(86)

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

<220>

<221> misc_feature

<222> (98)..(99)

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

<400> sekwencja 2

ttgagtggcg gacgggnnag taacccgtgg gtaacctgcc ttaaagaagg ggataacct 60

tggaaacagg tncctaatcc cgnnmctct taaggatnnc atgatectta gatgaaagat 120

ggttttgcta tegetttag atggaccgc ggetlatta ctagttggcg gggtaacggc 180

ctaccaaggt gatgatacga ctaccgaac tgagagggtg atcgccaca ttgggactga 240

gaccggccc aaattctac gggaggcagc agtagggaat ctccacaat ggacgcaagt 300

ctgatggagc aacgcgcgt gagtgaagaa ggtcttcgga tcgtaaaact ctgtttag 360

agaagaacac gagtgagagt aactgttcac tcgatgacgg tatctaacca gcaagtcacg 420

gctaactacg tgccagcagc cgcggtaata cgtagtggc aagcgtgtc cggatttatt 480

gggcgtaaag ggaacgcagg cggctcttta agtctgatgt gaaagccttc ggettaaccg 540

gagtagtgca ttggaaactg gaagacttga gtgcagaaga ggagagtgga actccatgtg 600
 tagcggtgaa atgcgtagat atatggaaga acaccagtgg cgaaagegge tctctggtct 660
 gtaactgacg ctgagggtcg aaagcgtggg tagcaaacag gattagatac cctggtagtc 720
 cacgcegtaa acgatgaatg ctaggtgttg gaggggttcc gcccttcagt gccgcagcta 780
 acgcaataag cattccgect ggggagtaag accgcaaggt tgaaactcaa aggaattgac 840
 gggggcccgc acaagecgtg gageatgtgg tttaattega agcaacgca agaaccttac 900
 caggtettga cctccttga ccacctaaga gattaggltt tccctcggg gacaaagtga 960
 caggtggtgc atggctgtcg tcagctcgtg tcgtgagatg ttgggttaag tcccgaacg 1020
 agegcaacc ttgtgtcag ttgccagcat taagtgggc actctggcga gactgecgt 1080
 gacaaaccgg aggaagggtg ggacgacgtc aagtea 1116

<210> 3

<211> 1116

<212> DNA

<213> Lactobacillus sakei

<400> sekwencja 3

cttagacgge tggtcccgga agggttacct caccggcttt ggggtttaca aactctcatg 60

gtgtgacggg cggltgtgac aaggeccggg aaaglattea ccgcggcatg ctgatccgcg 120

attactageg attccggctt catgtaggcg agttgcagcc tacaatccga actgagaatg 180
 gttttaagag attagctaaa cctcggggtc tegcaactcg ttgtaccatc cattgtagea 240
 cgtgtgtage ccaggtcata aggggcatga tgatttgacg tegtccceac ctctctcgg 300
 ttgtcaccg gcagtctcac tagagtgcc aactaaatgc tggcaactag taataagggt 360
 tgcgtcgtt gggggactta acccaacatc taacgacacg agctgacgac aacctgcac 420
 caactgtcac ttgtccccc aagggaagc tctatctcta ggtgggcaa aggatgtcaa 480
 gacctggtaa gggtcttcgc gttgtctga attaaaccac atgtccacc gcttgtcgg 540
 gccccgtca attccttga gttcaacct tgcgggtgta ctccccagc ggagtgtta 600
 atggttgcg tgcggcactg aaggggcgaa acctccaac acctagcact catcgtttac 660
 ggcattgact accagggtat ctaatctgt ttgtaccac tgtttcgag cctcagctc 720
 agttacagac cagacagcgc ccttcgccac tgggtgttct ccatatatc acgatttca 780
 ccgtacaca tggagtcca ctgtctctt ctgactcaa gtttcccagt ttccgatga 840
 ctcttcgggt tgagccgaag gctttacat cagacttaag aaaccgctg cgtcgttt 900
 acgccaata aatccggaca acgttgcca cctacgtatt accgcggtg ctggcagta 960
 gttagccgtg gctttctggt tggataccgt cactacctga tcagttacta tcagatacat 1020
 tcttccaa caacagagt ttaegatecg aaaacctct tcactacgc ggcgtgtc 1080
 catcagact tctccattg tggaagatc ctaact 1116

Zastrzeżenia patentowe

1. Nowy probiotyczny szczep bakterii fermentacji mlekowej *Lactobacillus casei* eub1B, zdeponowany pod numerem PKM B/00103, charakteryzujący się sekwencją nukleotydową regionu DNA kodującego gen 16S rRNA wskazana pod numerem 1 wykazu sekwencji nukleotydowych.
2. Nowy probiotyczny szczep bakterii fermentacji mlekowej *Lactobacillus salivarius* eub2B, zdeponowany pod numerem PKM B/00102, charakteryzujący się sekwencją nukleotydową regionu DNA kodującego gen 16S rRNA wskazana pod numerem 2 wykazu sekwencji nukleotydowych.
3. Nowy probiotyczny szczep bakterii fermentacji mlekowej *Lactobacillus sakei* eub3B, zdeponowany pod numerem PKM B/00101, charakteryzujący się sekwencją nukleotydową regionu DNA kodującego gen 16S rRNA wskazana pod numerem 3 wykazu sekwencji nukleotydowych.
4. Probiotyk do zwalczania patogennych szczepów bakterii *Escherichia coli* u zwierząt przeżuujących, zwłaszcza cieląt, **znamienny tym**, że w jego skład wchodzi nowy szczep bakterii *Lactobacillus sakei* eub3B jak określono w zastrz. 3.
5. Probiotyk według zastrz. 4, **znamienny tym**, że jego postać aplikacyjna zawiera w jednym gramie co najmniej 10^6 jtk, korzystnie 10^9 – 10^{11} jtk.
6. Kompozycja probiotyczna do zwalczania patogennych szczepów bakterii *Clostridium perfringens* u zwierząt przeżuujących, zwłaszcza cieląt, **znamienna tym**, że zawiera nowy szczep bakterii fermentacji mlekowej *Lactobacillus casei* eub1B jak określono w zastrz. 1 i/lub *Lactobacillus salivarius* eub2B jak określono w zastrz. 2.
7. Kompozycja według zastrz. 6, **znamienna tym**, że szczepy wchodzące w jej skład mogą być stosowne jako szczepy alternatywne, wymienne w danej kompozycji w razie ataku wirusowego.
8. Kompozycja probiotyczna do zwalczania patogennych szczepów bakterii *Escherichia coli* i *Clostridium perfringens* u zwierząt przeżuujących, zwłaszcza cieląt, **znamienna tym**, że zawiera nowy szczep bakterii fermentacji mlekowej *Lactobacillus sakei* eub3B jak określono w zastrz. 3 i *Lactobacillus casei* eub1B jak określono w zastrz. 1 i/lub *Lactobacillus salivarius* eub2B jak określono w zastrz. 2.
9. Kompozycja według zastrz. 8, **znamienna tym**, że szczepy wchodzące w jej skład mogą być stosowne jako szczepy alternatywne, wymienne w danej kompozycji w razie ataku wirusowego.
10. Kompozycja według zastrz. 6 albo 7 albo 8 albo 9, **znamienna tym**, że jej postać aplikacyjna zawiera w jednym gramie, co najmniej 10^6 jtk, korzystnie 10^9 – 10^{11} jtk.
11. Zastosowanie kompozycji jak określono w zastrz. 6 albo 7 albo 8 albo 9 albo 10 do produkcji preparatu probiotycznego do podawania zwierzętom przeżuującym, zwłaszcza cielętom w celu ograniczania rozwoju chorobotwórczych szczepów bakterii *Escherichia coli* i *Clostridium perfringens*.
12. Zastosowanie według zastrz. 11, **znamiennie tym**, że kompozycja probiotyczna według zastrz. 6 albo 7 albo 8 albo 9 albo 10 jest podawana zwierzętom doustnie, wziewnie lub doodbytniczo w ilości co najmniej 10^7 – 10^9 jtk/kg masy ciała zwierzęcia dziennie, korzystnie 10^8 jtk/kg masy ciała zwierzęcia dziennie.
13. Zastosowanie według zastrz. 12, **znamiennie tym**, że kompozycja probiotyczna według zastrz. 6 albo 7 albo 8 albo 9 albo 10 jest podawana zwierzętom doustnie razem z wodą lub mlekiem lub preparatami mleko zastępczymi lub paszą lub dodatkami paszowymi lub w formie specjalnych preparatów bakteryjnych.
14. Zastosowanie kompozycji jak określono w zastrz. 6 albo 7 albo 8 albo 9 albo 10 do produkcji preparatu do dezynfekcji ciał zwierząt i miejsca ich przebywania, **znamiennie tym**, że ciała zwierząt i miejsca ich przebywania dezynfekuje się środkami zawierającymi w swoim składzie kompozycje według zastrz. 6 albo 7 albo 8 albo 9 albo 10 i/lub ich metabolity.
15. Zastosowanie według zastrz. 14, **znamiennie tym**, że metabolitami bakterii probiotycznych stosowanymi w celach dezynfekcji są bakteriocyny i/lub kwasy organiczne i/lub nadutlenek wodoru i/lub aldehyd octowy i/lub D-aminokwasy i/lub kwasy tłuszczowe i/lub cały płyn pohodowlany bakterii probiotycznych.
16. Zastosowanie według zastrz. 14, **znamiennie tym**, że kompozycje i/lub metabolity są stosowane w formie zawiesiny komórkowej lub w formie utrwalonej.