

METODOLOGIA CERCETARII

Pe baza rezultatelor obtinute de catre echipa de cercetare pana in prezent si pe baza informatiilor din literatura de specialitate, se vor stabili nivelele de suplimentare a principalelor microelemente (Fe, Cu, Zn, Mn, Se, Co si I). Acestea vor fi asigurate prin doua surse: saruri anorganice, pe de o parte; Sel-Plex si frita, pe de alta parte. Deoarece fitoaditivii sunt asigurati prin intermediul plantelor medicinale, vor fi analizate (determinari de laborator) apoi un numar de 33 plante medicinale, care se gasesc mai frecvent in tara noastra. Dintre acestea se vor alege cele care prezinta efect antimicrobian si antioxidant, stabilindu-se 3 combinatii de cate 5 plante, care alaturi de principalele microelemente vor face obiectul prezentului studiu.

Cele 33 de plante care vor fi studiate sunt: Arnica, Anghinare, Catina, Cimbru, Coada calului, Coada soricelului, Crusin, Echinacee, Fenicul, Galbenele (Filimica), Macese, Menta, Mugur de pin, Musetel, Nalba, Paducel, Papadia, Patlagina, Pelin, Pufulita, Rostopasca, Roinita, Salcie, Salvie, Sanzaiene (Dragaica), Sunatoare, Tataneasa, Tei, Traista ciobanului, Trei frati patati, Troscot, Urzica si Valeriana.

Pentru studierea **performantelor bioproductive** vor fi organizate experiente pe broileri de gaina. Durata va fi de 42 de zile. Se vor inregistra: greutatea puilor – la o zi, 21 de zile si 42 de zile; consumul de furaje. Pe baza acestora se vor calcula sporurile in greutate (total si cel mediu zilnic) si consumul specific. Experientele vor fi organizate in cadrul disciplinei de Alimentatia animalelor.

Pentru a evidentia modul in care este afectata **calitatea carnii** puii vor fi sacrificati la varsta de 42 de zile. Se va calcula randamentul la sacrificare, iar ulterior se vor determina urmatorii parametri: capacitatea de retinere a apei, pH-ul carnii, continuturile de proteina, lipide si substanta uscata. De la fiecare broiler vor fi prelevate probe (piept si pulpa) pentru determinarea pH-ului si a pierderilor de apa. Pentru fiecare determinare se vor preleva câte doua probe. Acestea se separa de os, se învelesc în pungi de plastic si se atarnate cu ajutorul unor cârlige. Probele se pastreaza la 4 0 C. La 24 de ore post mortem se va face prima determinare pentru pierderile de apa. De asemenea, se va masura pH-ul, cu un pH-metru portabil tip 91 WTW. La 48 de ore post mortem se va face a doua determinare pentru pierderile de apa. De asemenea, atat pentru piept cat si pentru pulpa se vor determina: proteina - prin metoda Kjeldhal; grasimea – prin metoda Soxhlet si substanta uscata – cu termobalanta. Toate aceste determinari vor fi facute la disciplinele de Alimentatia animalelor si Merceologia produselor alimentare. Asa cum s-a aratat anterior starea de sanatate va fi urmata pe trei directii: efect antimicrobian, capacitate antioxidanta si efect imunomodulator.

Efectul antimicrobian va fi studiat in cadrul disciplinei de Microbiologie. Extractele luate in studiu vor fi testate individual pentru activitatea antimicrobiana, prin metoda discurilor, conform Normelor Standard pentru Testarea Sensibilitatjii Antimicrobiene a Discurilor Impregnate. In acest sens se vor alege o serie de bacterii Gram pozitiv (*Staphylococcus aureus* - ATCC 29213, *Bacillus cereus* - ATCC 11778) si Gram negativ (*Pseudomonas aeruginosa* - ATCC 27853; *Escheri chia coll* - ATCC 25822) si o specie de ciuperca microscopica (*Candida albicans* - ATCC 10239).

Din fiecare specie bacteriana se vor prepara culturi proaspete de 24 de ore, prin insamantare in bulion nutritiv si incubare timp de 24 de ore la 37°C Ciuperca microscopica se insamanteaza pe mediul *Sabouraud* cu adaos de antibiotic si se incubeaza la 25°C.

In paralel cu testarea efectului antimicrobian al extractelor se efectueaza si sensibilitatea la antibiotice a tulpinilor bacteriene folosind ciprofloxacina.

Din fiecare cultura microbiana se vor face dilutii in ser fiziologic steril pentru obtinerea unei densitati bacteriene de 10⁸ unitati formatoare de colonii la un mililitru. (u.f.c./ml).

Pentru testarea efectului antimicrobian, mediul de cultura folosit (geloza nutritiva) se va turna in placi Petri sterile. Dupa solidificarea mediului, pe suprafata acestuia se insamanteaza prin inundare cate 1 ml din fiecare cultura bacteriana pregatita. Dupa dispersia uniforma a

acesteia excesul se indeparteaza. Placile astfel insamantate se vor mentine la termostat la 37°C pentru zvantare.

In paralel se vor pregati rondellele de hartie de filtru, care au diametrul de 6 mm. Din fiecare extract se vor depune pe fiecare rondea cate 50 μ l, pentru fiecare tip de cultura bacteriana.

Rondellele se depun in mod steril pe suprafata mediului de cultura, inscriindu-se pe fiecare placa denumirea culturii si a extractelor corespunzatoare rondellelor si se mentin timp de doua ore la 5°C, dupa care se incubeaza la 37°C timp de 24 de ore.

Acelasi lucru se face si pentru testarea extractelor asupra ciupercii microscopice, doar ca, in placile Petri se toarna mediul Sabouraud cu adaos de antibiotice.

Capacitatea antioxidanta va fi studiata prin doua metode: metoda FRAP si metoda Folin-Ciocalteu.

Determinarea capacitatii antioxidante totale prin metoda FRAP.

Se va lucra cu spectrofotometrul Specord 205 UV-VIS Analytik Jena, utilizandu-se cuve de quart cu grosimea de 1cm.

Aceasta metoda a fost dezvoltata initial pentru determinarea capacitatii antioxidante a plasmei (Ferric reducing ability of plasma) si se baza pe capacitatea plasmei de a reduce ionii ferici la ioni ferosi care formau la pH acid un complex colorat cu tripiridil triazina (TPZ), cu maximul de absorbtie la 593 nm. Capacitatea antioxidanta este direct proportionala cu cantitatea de ioni ferosi formati, care se determina pe baza unei curbe de etalonare utilizand etaloane cu concentratii cunoscute de ioni ferosi.

Dozarea spectrofotometrica a polifenolilor totali prin metoda Folin -Ciocalteu.

Se va lucra cu spectrofotometrul Specord 205 UV-VIS Analytik Jena, utilizandu-se cuve de quart cu grosimea de 1cm.

Polifenolii sunt substante cu caracter antioxidant, care se gasesc in cantitati apreciabile in produsele de origine vegetala. Nu sunt prevazute limite legale, dar valoarea lor ofera indicatii asupra calitatii produsului. Polifenolii sunt compusi chimici aromatici cu mai multe grupari hidroxil inserate pe nucleul aromatic. Datorita acestei structuri au proprietati redox, putand fi oxidati de reactivul Folin Ciocalteu cu formarea unei coloratii albastre cu maximul de absorbtie la 750 nm.

Efectul imunomodulator va fi estimat prin determinarea lizozimului seric, a properdinei si a formulei leucocitare.

Sistemul imun, constituit din ansamblul organelor, tesuturilor, celulelor si moleculelor care participa la recunoasterea structurilor straine, asigura protectia organismului fata de actiunea acestor structuri. Factorii de aparare elaborati de sistemul imun pot fi nespecifici, caracteristici rezistentei naturale a organismelor si specifici, caracteristici raspunsului imun adaptativ. Factorii celulari, caracteristici mecanismelor nespecifice de aparare cuprind si lizozimul, properdina serica, leucocitele polimorfonucleare.

Lizozimul seric se va determina printr-o metoda al carei principiu se bazeaza pe incorporarea unei culturi de *Micrococcus lysodeicticus* in agar, cu aplicarea probelor de analizat (ser) in godeuri practicate in agarul respectiv. In urma difuziei lizozimului din serul de analizat se formeaza in jurul godeului un halou, al carui diametru este proportional cu concentratia lizozimului seric, care lizeaza germenii inclusi in mediu.

Properdina serica se va determina printr-o metoda de izolare a acesteia din serul de cercetat prin complexarea pe inulina, tratat cu reactiv biuret si determinarea colorimetrica, la spectofotometru, a intensitatii de culoare a reactiei. Formula leucocitara se va determina prin metoda May-Grunwald-Giemsa, în hemocitometru Turk determinandu-se numarul elementelor sangvine pe un milimetru cub de sange, reprezentand un indicator pretios in aprecierea reactiilor de raspuns ale organismului fata de diferiti stimuli externi.