

UNA SOSTANZA PERMEABILIZZANTE PER AUMENTARE L'EFFICACIA DEGLI ACIDI ORGANICI ED ALDEIDE CINNAMICA

A PERMEABILISING SUBSTANCE TO INHANCES THE EFFICACY OF ORGANIC ACIDS AND CINNAMALDEHYDE

RIEMENSPERGER A.V., PAODAN D., PASTEINER S.

Biomin Holding GmbH, Industriestrasse 21, 3130 Herzogenburg - Austria

Parole chiave: sostanza permeabilizzante, acidi organici, aldeide cinnamica, inibizione batterica.
Key words: permeabilising substance, organic acids, cinnamaldehyde, bacteria inhibition.

Riassunto

E' stata condotta una prova in vitro per dimostrare gli effetti di una sostanza permeabilizzante (SP) sull'efficacia di una miscela antimicrobica (MA) contenente un mix di acidi organici (acido formico, propionico ed acetico) ed aldeide cinnamica (AC). Per l'esperimento sono state testate la MA sola ed in combinazione con la SP in una piastra per microtitolazione sull'inibizione di *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *E.coli* O55:K59(B5):H ed *E.coli* O128:H2. La MA ha inibito la crescita di *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *E.coli* O55:K59(B5):H ed *E.coli* O128:H2 del 6,9; 3,9; 29,5 e 2,3% rispettivamente mentre l'aggiunta del SP alla MA ha dato come risultato l'inibizione di crescita del 86,2; 100,0; 70,5 e 100,0%. In una prova in vivo sono stati usati 60 suini svezzati di $8,72 \pm 1,15$ Kg peso vivo a 28 giorni di età per verificare se l'aggiunta di MA e SP ad una dieta standard (mangime starter: 13,70 MJ/Kg energia metabolizzabile (ME), 12,27% proteina greggia (PG) e 1,37% Lisina (Lis) da 0 a 14 giorni, mangime grower: 12,47 MJ/Kg ME, 17,96% PG e 1,14% Lis da 15 a 56 giorni) migliora i risultati di accrescimento in un periodo di 56 giorni. Il peso finale (37,7 vs. 35,5) e l'accrescimento medio giornaliero (517 g vs. 481 g) sono stati significativamente ($p < 0,05$) aumentati in suini alimentati con la dieta sperimentale in confronto ai suini alimentati con la dieta di controllo. In conclusione, l'aggiunta di SP ad una MA ha inibito la crescita batterica più efficacemente. Alimentare con una MA e SP suinetti in svezzamento ha dato come risultato aumentato accrescimento giornaliero ed un peso finale più alto.

Abstract

An in vitro trial was conducted in order to show the effects of a permeabilising substance (PS) on the efficacy of an antimicrobial mixture (AM) containing a blend of organic acids (formic, propionic and acetic acid) and cinnamaldehyde. For the experiment the AM alone and in combination with the PS were tested in a micorplate assay on the inhibition of *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *E. coli* O55:K59(B5):H and *E. coli* O128:H2. The AM inhibited the growth of *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *E. coli* O55:K59 (B5):H and *E. coli* O128:H2 by 6.9, 3.9, 29.5 and 2.3%, while the addition of the PS to the AM resulted in a growth inhibition of 86.2, 100.0, 70.5 and 100.0%. In an in vivo trial 60 pigs weaned with 8.72 ± 1.15 kg live weight at 28 days of age were used to investigate, if the addition of an AM and PS to a standard diet (starter diet: 13.70 MJ/kg metabolisable energy (ME), 17.27% crude protein (CP) and 1.37% Lysine (Lys) from day 0 to 14, grower diet: 12.47 MJ/kg ME, 17.96% CP and

1.14% Lys from day 15 to 56) improves growth performance over a 56 day period. Final body weight (37.7 vs. 35.5kg) and average daily gain (517 g vs. 481 g) were significantly ($p < 0.05$) improved in pigs fed the experimental diet compared to pigs fed the control diet. In conclusion, adding a PS to an AM inhibited bacterial growth more effectively. Feeding an AM and PS to weaning pigs resulted in improved ADG and a higher final weight.

INTRODUZIONE

Gli antibiotici promotori di crescita (AGPs) sono stati usati per decenni nella produzione animale poichè era già stato dimostrato nei primi anni '50 che gli AGPs incrementano l'efficienza produttiva (Moore et al., 1946, Jukes et al., 1950). Comunque, non molto più tardi sono stati pubblicati i primi rapporti di resistenza negli animali destinati all'alimentazione umana (Starr e Reynolds, 1951; Barnes, 1958; Elliot e Narnes, 1959) e si sollevarono le prime preoccupazioni sullo sviluppo della antibiotico resistenza nei batteri patogeni umani (Swann, 1969). Al giorno d'oggi è provato il traferimento di geni di resistenza agli antibiotici dagli animali all'uomo (Greko, 2001). Ciò ha portato al bando di antibiotici promotori di crescita nella produzione animale all'interno dell'Unione Europea nel 2006.

Comunque, poichè la presenza di batteri ha un costo è necessario combattere la sfida batterica. In relazione al tratto gastrointestinale (GI) i batteri competono con l'organismo ospite per il nutrimento, possono secernere composti tossici e dare inizio alla risposta immunitaria, dare reazioni infiammatorie. Non solo la competizione per i nutrienti e la perdita di energia netta a favore della microflora intestinale porta alla riduzione dei risultati di crescita (Dibner e Richards, 2005), ma anche la alterazione di appetito e metabolismo durante le infezioni causate da batteri patogeni danno come risultato di perdita di peso e ridotto incremento (Beisel, 1988). Poichè gli acidi organici mostrano effetti antimicrobici sono stati posti al centro dell'attenzione per rimpiazzare gli AGPs (Vondruskova et al., 2010).

E' stato dimostrato che gli acidi organici hanno effetti antimicrobici (Freitag, 2007). Inoltre, l'aldeide cinnamica (AC) è un fitochimico (Michiels et al., 2007) che è stato dimostrato avere effetti antimicrobici, poichè ha come bersaglio la proteina FtsZ, che gioca un ruolo importante nella divisione batterica dei germi patogeni. La aldeide cinnamica si lega alla FtsZ, inibisce la sua riunione e scombussola la formazione dell'anello Z inibendo così il processo di divisione batterica (Domadia et al., 2007). Per cui non è sorprendente che la ricerca ha dimostrato un forte effetto antimicrobico dell'aldeide cinnamica a bassi livelli di concentrazione (Michielis et al., 2007).

Inoltre, benchè siano noti sostituti naturali per gli AGPs, è ancora una grossa sfida combattere i batteri Gram negativi. I Gram negativi hanno una membrana cellulare esterna addizionale, una barriera, che impedisce che composti tossici entrino nella cellula e possano distruggere le funzioni vitali (Cánovas et al., 2005). Questa membrana esterna può essere perturbata da sostanze permeabilizzanti (SP) che rendono la cellula batterica più suscettibile a composti tossici (Alakomi, 2001; Vaara, 1992).

L'ipotesi degli studi correnti era (1) poichè le SP indeboliscono la membrana esterna dei batteri Gram negativi rendendoli più suscettibili a sostanze che sono capaci di distruggere le funzioni cellulari vitali, gli effetti di una combinazione di acidi organici (AB) e AC potrebbero essere potenziati poichè molto probabilmente possono penetrare più facilmente all'interno della membrana batterica. Inoltre, se (2) gli effetti di inibizione dei batteri da parte di una combinazione di acidi organici, AC e SP possono essere rison-

trati in vitro, ciò può anche essere riscontrato in vivo dando aumento dei risultati di crescita quando la carica batterica entro il tratto gastrointestinale (GI) è diminuita e l'ospite non deve competere con i batteri per il nutrimento ad un tasso elevato nonché minor risposta immune dovuta alla presenza di batteri patogeni, che ha effetto negativo sui risultati di crescita.

MATERIALI E METODI

Sono stati testati in vitro tramite una piastra di microtitolazione gli effetti sull'inibizione di crescita dei batteri patogeni di una miscela antimicrobica (MA) consistente di una miscela di acidi (AB: acido formico, propionico ed acetico) e aldeide cinnamica (AC) sola ed in combinazione con una sostanza permeabilizzante (SP. Biotronic® Top3, Biomin Holding GmbH, Austria). I patogeni testati sono stati Salmonella enteritidis (DSM 9898), Salmonella typhimurium (DSM 554), E. coli O55:K59(B5):H (DSM 4779) and E. coli O128:H2 (DSM 8703). Il substrato Brodo Trypticase Soja (TSB, Oxoid) è stato preparato seguendo le istruzioni del produttore. Poi, il substrato è stato autoclavato a 121°C per 15 minuti per assicurare la sterilità. Ogni ceppo è stato coltivato da una crio-cultura usando 100 µl di sospensione batterica decongelata e 100 ml di substrato ed incubando per tutta la notte a 37°C. Il giorno dopo, la cultura principale è stata creata usando 100 µl della cultura incubata la notte e 100 ml di substrato. La cultura principale è stata incubata di nuovo per 4 ore assicurando completa vitalità. E' stata misurata la densità ottica (DO) della cultura principale a 690 nm usando un fotometro con lampada a tungsteno. Per la piastra di microtitolazione, le culture principali sono state diluite finché non hanno mostrato una DO di $0,1 \pm 0,015$, e poi aggiunte alla piastra di microtitolazione. Le due culture di Salmonella sono state diluite 1:10 e le due di E.coli 1:15, rispettivamente. I pozzetti delle piastre di microtitolazione sono stati riempiti fino a 200 µl, usando perciò 100 µl di sospensione batterica diluita della cultura principale eccetto che per il controllo del substrato. La MA da sola e la combinazione con la SP è stata testata miscelando 100 µl della soluzione di lavoro con la sospensione batterica nei pozzetti della piastra di microtitolazione, risultando come concentrazione finale di 0,15% AB, 8,5 ppm AC e 0,034% SP nel substrato. Le piastre sono state incubate a 37°C. La DO ottica dei pozzetti delle piastre è stata misurata sia prima che dopo 24 ore di incubazione ad una lunghezza d'onda di 620 nm con un lettore di piastre. La variazione di densità ottica nei pozzetti del test sono stati confrontati con la variazione nei pozzetti il controllo di crescita. Ogni verifica delle piastre di microtitolazione è stata eseguita tre volte con quattro pozzetti per ogni sostanza testata, fornendo dodici dati per ceppo e verifica e le verifiche ed i valori dati nei risultati sono i valori medi di questi dodici dati per ogni ceppo.

L'esperimento in vivo è stato condotto per verificare gli effetti di una AB, AC ed una SP sulle prestazioni di crescita di suini allo svezzamento. I suini sono stati svezzati a $8,72 \pm 1,15$ Kg di peso vivo a 28 ± 2 giorni di età. In totale, sono stati usati 60 suini divisi in 6 gruppi (sessi misti) di 10 suinetti per gruppo e allevati per 56 giorni.

I suinetti sono stati assegnati col sistema random a due trattamenti con tre box di replicazione sulla base del peso corporeo. I suini erano su pavimento parzialmente grigliato e cemento con misure dei box 2,30 x 1,50 m (spazio per suino 0,35 m²), provvisti di abbeveratoi per garantire assunzione ad libitum di acqua ed un sistema di alimentazione computerizzato (Spotmix, Schauer, Austria). I suini erano alimentati una volta al giorno alle h. 09,00. Sono state fornite due diverse diete in sequenza durante la prova, con la dieta 1 alimentati dallo svezzamento fino al giorno 14 e la dieta 2 dal giorno 15 post-svezzamento fino alla fine della prova 56 giorno dopo lo svezzamento. La dieta starter è stata formulata per contenere 13,70

MJ/Kg di energia metabolizzabile (ME), 17,27% di proteina greggia (PG) e 1,37% Lisina (Lys). La dieta grower era formulata per contenere 12,47 MJ/Kg ME, 17,96% PG e 1,14% Lys (Tav. 1). Tutte le diete soddisfacevano o eccedevano le necessità nutrizionali secondo le raccomandazioni del NRC (1998).

Tabella Ingredienti e composizione chimica delle diete sperimentali (g/kg)

	Dieta Starter	Dieta Grower
Orzo	400	140
Frumento	100	358
Mais	220	-
Insilato integrale di mais	-	250
Soja Hi-Pro	-	190
Soya full fat	82.4	-
Proteina di patata	62.0	-
Destrosio	33.3	-
Lattosio	24.9	-
Siero di latte polvere	24.9	-
Semi di zucca	23.4	-
Fosfato monocalcico	11.7	9.0
Ca da rocce calc.	9.3	13.0
Sale	4.5	4.0
Olio di semi di colza	2.8	3.0
Magnesio fosfato	0.8	2.0
Radichette di malto d'orzo	-	30
Melasso di polpa di bietola da zuc.	-	1.0
Composizione chimica		
Sostanza secca	880	880
Proteina greggia	171	188
Lisina	13.5	12.0
Energia digeribile (MJ ME/kg)	13.5	13.0

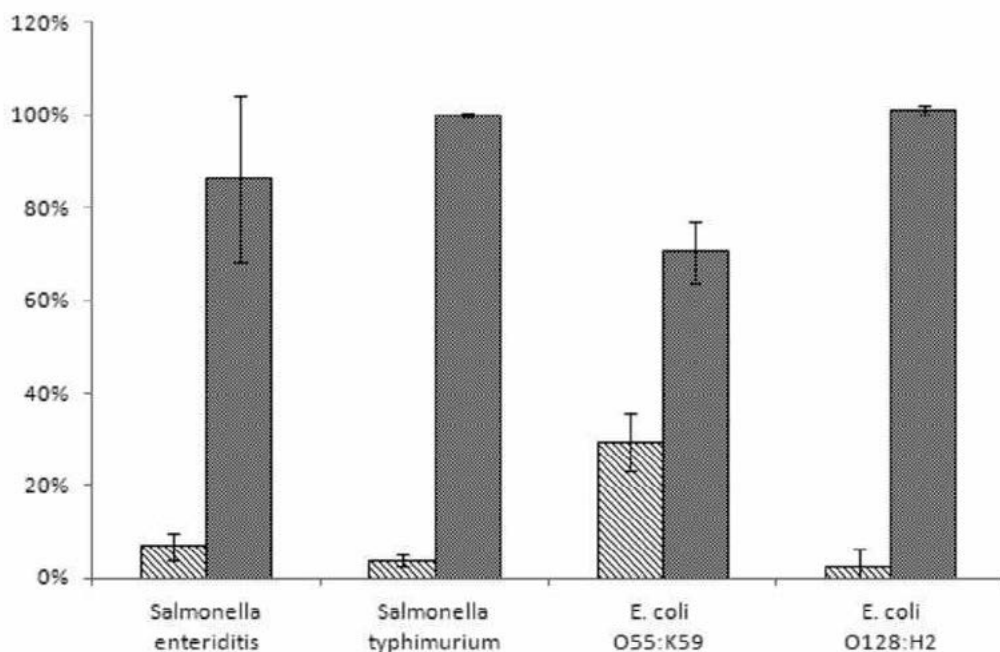
Ogni suino è stato pesato singolarmente allo svezzamento, a 14 giorni, al giorno 42 ed alla fine della prova a 56 giorni. Il consumo di mangime è stato registrato settimanalmente, ed è stata calcolata la conversione (ICA).

Il singolo box è stato considerato come l'unità sperimentale nell'analisi delle variabili. I risultati di prestazione sono stati analizzati tramite analisi di varianza (ANOVA) usando SPSS 15.0. Il modello includeva l'effetto del trattamento su accrescimento medio giornaliero (AMG), assunzione di cibo, ICA e peso finale. Il peso iniziale è stato usato come covariante. I dati sono stati analizzati per il periodo da 0 a 14 giorni post svezzamento, da 15 a 56 giorni post svezzamento e per i due periodi combinati. I dati sono espressi come "least square mean" (LSM, algoritmo del gradiente stocastico) ± errore standard (e.s.), ed il test dell'ordine multiplo di Duncan è stato usato per separare le difference di LSM. Gli effetti sono stati considerati come significanti se $P < 0.05$.

RISULTATI

La miscela di MA e AC combinate ha inibito la crescita di *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *E. coli* O55:K59 (B5):H and *E. coli* O128:H2 del 6,9; 3,9; 29,5 e 2,3% rispettivamente. L'aggiunta della SP alla miscela antimicrobica ha dato come risultato una inibizione di crescita di *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *E. coli* O55:K59 (B5):H and *E. coli* O128:H2 del 86,2; 100,0; 70,5 e 100,0 % rispettivamente.

Figura 1: inibizione di *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *E. coli* O55:K59 (B5):H and *E. coli* O128:H2 da una (▨) miscela di acido formico, propionico ed acetico combinati con aldeide cinnamica (miscela antimicrobica) e (■) la miscela antimicrobica combinata con la sostanza permeabilizzante.



Come si vede nella Tav. 2, peso al giorno 42 ($p < 0.01$) e peso finale ($p < 0.05$) erano significativamente più alti nei suini alimentati con la dieta sperimentale in confronto ai suini alimentati con la dieta di controllo, dieta senza additivi aggiunti (25,7 vs. 27,24 e 35,5 vs. 37,7, rispettivamente).

Per il periodo intero, l'AMG era aumentato significativamente ($p < 0.05$) nel gruppo sperimentale in confronto al gruppo di controllo (517 vs. 481 g/d).

Tavola 2: Effetti della somministrazione di una miscela di acidi organici, aldeide cinnamica ed una sostanza permeabilizzante su sviluppo del peso e risultato di crescita di suini in svezzamento (least square mean, e.s.)

		Controllo gruppo	Sperimentale gruppo	e.s.	Sig. †
Sviluppo del peso	Peso iniziale	8.71	8.76	0.12	
	Peso giorno 14	10.81	11.10	0.16	
	Peso giorno 42	25.68	27.24	0.35	*
	Peso finale	35.54	37.71	0.42	**
Risultati giorno 0 a 14	Incr. Medio/die(g/die)	156	174	7.01	
	Consumo (g/die)	292	284	13.6	
	Conversione	1.87	1.63	0.06	
Risultati giorno 15 a 42	Incr. medio/die (g/die)	535	573	9.67	
	Consumo (g/day)	1 028	1 054	36.7	
	Conversione	1.93	1.87	0.05	
Risultati giorno 43 a 56	Incr. medio/die (g/die)	842	878	12.9	
	Consumo (g/die)	1 650	1 671	58.8	
	Conversione	1.95	1.93	0.01	
Risultati totali (giorno 0 a 56)	Incr. medio/die (g/die)	483	516	6.7	*
	Consumo (g/day)	976	1 028	32.0	
	Conversione	2.04	1.99	0.05	

† Sig. = Significatività; *p<0.05; **p<0.01

DISCUSSIONE

Gli acidi organici sono ben noti per l'effetto di incremento dell'accrescimento e di modulazione della flora microbica intestinale nei suini (PIVA et al., 2002). Inizialmente la supplementazione con acidi organici nella dieta dei suini aveva come target lo svezzamento, ma ci sono prove che l'acidificazione è benefica anche per suini in stadi più avanzati della crescita in termini di incremento della digeribilità ileale apparente di proteine e aminoacidi e aumento dell'assorbimento dei minerali (Mroz et al., 1997; Jongbloed e Jongbloed, 1996). Comunque, specialmente in suini allo svezzamento l'uso di acidi organici è benefico poiché riducono il pH che ha a sua volta un effetto benefico sulla produzione di enzimi e che è insufficiente nei suinetti appena svezzati (Freitag, 2007). E' dimostrato in letteratura che usando miscele invece di singoli acidi è più benefico come risultato di uno spettro di attività più ampio (Namkung et al., 2003). Inoltre, è stato ipotizzato che anche combinando acidi organici con olii essenziali può essere benefico grazie ai loro effetti in differenti parti del tratto gastroenterico. Gli acidi organici eserciterebbero la loro attività nel mangime e alto intestino e gli olii essenziali più nella parte distale del tratto intestinale (Langhout, 2000). Perciò effetti benefici deriverebbero da effetti sui batteri e potrebbero essere visti su un vasto tratto del tubo gastroenterico. I fitochimici come l'AC sono definiti sostanze chimiche caratterizzate come molecole organiche trovate ed isolate da diversi prodotti derivati dalle piante, come gli olii essenziali (de Souza et al., 2005) a maggior ragione si dovrebbe aspettare effetto combinando acidi organici e AC.

Inoltre Kwon et al. (2003) hanno trovato una forte inibizione sulla separazione cellulare. Il meccanismo che sta dietro l'inibizione della separazione cellulare è stato descritto in dettaglio da Domadia et al. (2007). La separazione cellulare dei batteri viene regolata dalla FtsZ, una proteina che si raccoglie nell'anello Z nella zona di divisione cellulare. La AC lega FtsZ, perturba la formazione citocinetica dell'anello Z ed inibisce le sue dinamiche di assemblaggio. Questo meccanismo porta in generale ad una riduzione di carica batterica.

E' noto che la SP indebolisce la membrana esterna dei germi Gram negativi. Questo rende i batteri più suscettibili agli antimicrobici idrofobici. Il modo d'azione della SP che riguarda il danneggiamento della membrana esterna dei batteri Gram negativi viene descritto in dettaglio da Alakomi (2001). Comunque, si può presupporre che se i batteri gram negativi sono più suscettibili agli antimicrobici idrofobici quando la loro membrana esterna è danneggiata da una SP, potrebbe essere possibile aumentare anche l'effetto antimicrobico di acidi organici miscelati (MA) e AC. Ciò può essere concluso a seguito della prova in vitro nella quale si è testato l'inibizione dei batteri della MA consistente della AB combinata con AC e la MA in aggiunta alla SP, così come l'effetto inibitorio della MA sui batteri testati è stata aumentata quando si è aggiunta SP.

Comunque deve essere considerato che, specialmente attorno allo svezzamento, i suini hanno un basso stato immunitario poiché l'immunità passiva acquisita dal colostro materno non viene più fornita e l'immunità attiva comincia solo a svilupparsi (Gaskin and Kelley, 1995). Ciò rende il suinetto estremamente vulnerabile contro i batteri patogeni. Il calo repentino dei lattobacilli causati dal drastico cambio di dieta priva il suinetto di buona parte del benefico effetto competitivo. Anche in altri stadi della crescita comunque la sfida batterica deve essere fronteggiata. Accade che come da un lato la flora microbica intestinale entro il tratto GI procura reale beneficio all'ospite come nutrizione e protezione procurando prodotti della fermentazione e la prevenzione della colonizzazione da parte dei patogeni. Dall'altra parte la microflora (1) compete con l'animale ospite per i nutrienti, (2) produce come cataboliti aminoacidi tossici, (3) diminuisce la digeribilità dei grassi, (4) stimola il ricambio veloce delle cellule epiteliali di assorbimento, (5) richiede un'aggiunta di secrezione di muco dalle cellule mucipare caliciformi, e (6) stimola lo sviluppo del sistema immunitario e della risposta infiammatoria (Dibner e Richers, 2005). Tutto questo può condurre a diminuita capacità di crescita. Si può perciò presupporre che la combinazione di acidi organici con AC ed un SP potrebbe essere benefica in vivo poiché i batteri possono essere combattuti più efficacemente. Così un miglioramento del risultato di crescita del suino alimentato AB, AC e SP può essere atteso, poiché sono disponibili più nutrienti per l'ospite e meno energia viene persa a favore della microflora. Questo viene anche mostrato nei risultati della prova descritta.

Nel periodo totale il consumo di mangime non ha mostrato differenze significative tra gruppo di controllo e quello sperimentale. Ma l'AMG è stato significativamente più alto nel gruppo sperimentale ($p < 0.05$). In generale si sa che il suino mangia per soddisfare il fabbisogno di energia (Nam e Aherne, 1994) Il fatto che con uguale consumo di mangime si è ottenuto un più alto AMG porta alla conclusione che più nutrienti erano disponibili per l'ospite a seguito di ridotto carico batterico, con risultato di aumentato incremento di peso.

Conclusioni

In conclusione, i risultati della prova in vitro indicano che l'effetto degli acidi organici e AC sulla inibizione dei batteri può essere significativamente incrementato dall'inclusione di SP. Nella prova in vivo supportata dall'ipotesi che alimentando un AB, AC ed una SP aumenta il risultato di crescita. Non si può concludere se l'inclusione di SP può ulteriormente incrementare l'effetto di acidi organici e AC in vivo, poiché il gruppo di controllo era un gruppo negativo senza additivi aggiunti alla dieta. Perciò ulteriori prove devono essere eseguite per

provare se l'aggiunta di una SP alla MA può aumentare il loro effetto sui risultati zootecnici. E' stato presupposto che il miglioramento nel risultato di crescita deriva da una riduzione del carico batterico entro il tratto GI. Questo può solo essere ipotetizzato, poiché anche per comprovare questa ipotesi è necessaria ulteriore ricerca.

BIBLIOGRAFIA

- Alakomi H.-L. (2001) "Weakening of the Gram-negative bacterial outer membrane". PhD, Helsinki Univ.
- Barnes E.M. (1958) "The effect of antibiotic supplements on the faecal streptococci (Lancefield group D) of poultry". *Brit Vet J.* 114, 333-344.
- Beisel W.R. (1988) "The effects of infections on growth" in: Steffens G.L., Rumsey T.S. "Biomechanisms regulating growth and development" Kulwer, Boston, 395-408.
- Cánovas, M., Torroglosa T., Iborra J.L. (2005) "Permeabilization of *Escherichia coli* cells in the biotransformation of trimethylammonium compounds into L-carnitine". *Enzyme Microb Tech.* 37, 300-308.
- de Souza E.L., de Oliveira Lima E., de Luna Freire K.R., Paiva de Sousa C. (2005) "Inhibitory action of some essential oils and phytochemicals on the growth of various moulds isolated from foods". *Braz Arch Biol Techn.* 48, 245-250.
- Dibner J.J., Richards J.D. (2005) "Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action". *Poultry Sci.* 84, 634-643.
- Domadia P., Swarup S., Bhunia A., Sivaraman J., Dasgupta D. (2007) "Inhibition of bacterial cell division protein FtsZ by cinnamaldehyde". *Biochem Pharmacol.* 74, 831-840.
- Elliot S.D., Barnes E.M. (1959) "Changes in serological type and antibiotic resistance on Lancefield group D streptococci in chickens receiving dietary chlortetracycline". *J Gen Microbiol.* 20, 426-433.
- Freitag M. (2007) "Organic acid and salts promote performance and health in animal husbandry" in: Lückstädt C. "Acidifiers in animal nutrition" Nottingham University Press, Nottingham, 1-11.
- Gaskins H.R., Kelley K.W. (1995) "Immunology and neonatal mortality" in: Varley M.A. "The neonatal pig: development and survival" CAB International, Wallingford, Oxon, 39-55.
- Greko C. (2001) "Safety aspects on non-use of antimicrobials as growth promoters" in Piva A., Bach Knudsen K.E., Lindberg J.E. "Gut environment of pigs" Nottingham University Press, Nottingham 219-230.
- Jongbloed A.W., Jongbloed R. (1996) "The effect of organic acids in diets for growing pigs on enhancement of microbial phytase efficacy". ID-DLO Report no. 96009. Lelystad, The Netherlands: Institute for Animal Science and Health
- Jukes T.H., Stokstad E.L.R., Taylor R.R., Combs T.J., Edwards H.M., Meadows G.B. (1950) "Growth promoting effect of aureomycin on pigs". *Arch Biochem.* 26, 324-330.
- Kwon J.A., Yu C.B., Park H.D. (2003) "Bacteriocidal effects and inhibition of cell separation of cinnamic aldehyde on *Bacillus cereus*". *Lett Appl Microbiol.* 37, 61-65.
- Michiels J., Missotten J., Fremaut D., De Smet S., Dierick N. (2007) "In vitro dose-response of carvacrol, thymol, eugenol and trans-cinnamaldehyde and interaction of combinations for the antimicrobial activity against the pig gut flora". *Livest Sci.* 109, 157-160.
- Moore P.R., Evenson A., Luckey T.D., McCoy E., Elvehjem E.A., Hart E.B. (1946) "Use of sulphasuccidine, streptothricin and streptomycin in nutrition studies with the chick". *J Biol Chem.* 165, 437-441.
- Mroz Z., Jongbloed A.W., Partanen K., van Diepen J.T.M., Kemme P.A., Kogut J. (1997) "Apparent digestibility of amino acids and balance of nitrogen and minerals as influenced by

- buffering capacity and organic acids in diets for growing swine". *J Anim Sci.* 75, (Suppl. 1), 185 (Abstr.).
- Nam D.S., Aherne F.X. (1994) "The effects of lysine: energy ratio on the performance of weanling pigs". *J Anim Sci.* 72, 1247-1256.
- Namkung H., Li M., Yu H., Cottrill M., Gong J., deLange C.F.M. (2003) "Impact of feeding blends of organic acid or herbal extracts on growth performance, gut microflora and digestive function in newly weaned pigs". in: Ball, R. (ed.) "Proceedings of the 9th International Symposium on Digestive Physiology in Pigs, Banff, Alberta, Canada, 14-17 May" University of Alberta, Department of Agriculture, Food, and Nutritional Science, Alberta, Canada 93-95
- National research council (NRC) 1998. Nutrient requirements of swine (10th ed.), National Academy Press, Washington D.C.
- Piva A., Casadei G., Biagi G. (2002) "An organic acid blend can moderate swine intestinal fermentation and reduce microbial proteolysis". *Can J Anim Sci.* 82, 527-537.
- Starr M.P., Reynolds D.M. (1951) "Streptomycin resistance of coliform bacteria from turkeys fed streptomycin". in: "Proceedings of the 51st General Meeting of the Society of American Bacteriology, Chicago, IL, USA, 27-31 May" Society of American Bacteriologists, 15-34.
- Swann M.M. (1969). Report of Joint Committee on the Use of Antibiotics in Animal Husbandry and Veterinary Medicine. HMSO, London.
- Vaara M. (1992) "Agents that increase the permeability of the outer membrane". *Microbiol Rev.* 56, 395-411.
- Vondruskova H., Slamova R., Trckova M., Zraly Z., Pavlik I. (2010) "Alternatives to antibiotic growth promoters in prevention of diarrhoea in weaned piglets: a review". *Vet Med Czech.* 55, 199-224.