



UNIwersytet PRZYRODNICZY WE WROCLAWIU

Wydział Biologii i Hodowli Zwierząt

Katedra Żywienia Zwierząt i Paszoznastwa

mgr inż. Marcin Gumowski

Rozprawa doktorska

Opracowanie i zastosowanie preparatu opartego o naturalne składniki roślinne w profilaktyce odchowu brojlera kurzego

Development and application of a preparation based on
natural plant ingredients in the prevention of broiler
chicken rearing.

Promotor:

dr hab. inż. Mariusz Korczyński, prof. uczelni

Promotor pomocniczy:

dr Henryk Różański

Wrocław, 2023 r.

Składam serdecznie podziękowania mojemu promotorowi dr hab. inż. Mariuszowi Korczyńskiemu prof. UPWr za pełnienie roli przewodnika po fascynującej drodze nauki i prawdy.

Dziękuję serdecznie dr inż. Witoldowi Nowakowi prezesowi zarządu Adifeed sp. z o.o. za pomoc i umożliwienie przeprowadzenia kompleksowych badań, których owoc zostanie wykorzystany w rozwoju polskiego drobiarstwa. Dziękuję dr Henrykowi Różańskiemu za inspirację i cenne porady z dziedziny praktycznego wykorzystania ziół i ich preparatów.

Dziękuję mgr inż. Mateuszowi Wocka, prezesowi zarządu Modernfeed sp. z o.o. za umożliwienie wykorzystania infrastruktury jednej z najnowszych wytwórni pasz w Polsce oraz dyrektorowi tego zakładu, mgr inż. Mateuszowi Ćwikowi za cierpliwość i godną podziwu skrupulatność podczas produkcji mieszanek testowych.

Dziękuję koledze z katedry - dr inż. Damianowi Konkolowi za wsparcie merytoryczne i krytyczne spojrzenie oraz statystycznie istotne uwagi do treści.

Dziękuję ekipie Gumpaszu – mgr inż. Magdalenie Słomce za wsparcie techniczne na fermie doświadczalnej i mgr Ewie Okołotowicz za walkę z biurokracją.

Najszczególniejsze jednak podziękowania chciałbym złożyć na ręce dr inż. Waldemara Drymła za inspirację, za wsparcie, za nieocenioną pomoc, za mentoring zarówno w pracy naukowej jak i zawodowej.

Niniejszą pracę dedykuję osobom, które pełniły najważniejsze, choć nietytularne funkcje – Rodzicom.

Streszczenie

Celem niniejszej pracy było opracowanie i sprawdzenie skuteczności preparatu opartego o naturalne składniki roślinne o działaniu fitobiotycznym w profilaktyce odchowu kurcząt brojlerów.

Wykonano dwa prototypy preparatów fitobiotycznych stanowiących kompozycję mikronizowanych ziół lub ich wyciągów i peroklatów. Prototyp 1 został wytworzony z zastosowaniem opatentowanej technologii adiPHAG, która pozwala na uzyskanie stabilnej i bardzo skutecznej emulsji micelarnej w dwunastnicy, a jego składnikami były: salicylan metylu, mentol, olejek anyżowy i olejek eukaliptusowy. Prototyp 2 preparatu został opracowany na bazie produktów przetwarzania przypraw korzennych i ziołowych takich jak *Sinapis alba L.*, *Acorus calamus L.*, *Hedera helix L.*, *Curcuma longa L.* w połączeniu z tymolem i mentolem.

Przygotowane preparaty dodano do mieszanek paszowych pełnoporcjowych w ilości: 0,01% i 0,02%. Przygotowane mieszanki paszowe miały formę sypką i zostały wytworzone w komercyjnej wytwórni pasz.

Badania przeprowadzono w Stacji Badawczo-Dydaktycznej w Swojczycach (Wrocław, Polska) na 1280 kogutach brojlerach komercyjnej linii Ross 308. Ptaki utrzymywano w hali odchowu ściółowego w 40 boksach podzielonych na 5 grup doświadczalnych po 8 powtórzeń. W trzech grupach testowano prototypowe preparaty: grupa A - prototyp 1 0,01%, B - prototyp 1 0,02%, C - prototyp 2 0,01%. Dwie grupy stanowiły grupy kontrolne: kontrolę negatywną K oraz kontrolę pozytywną N zawierającą w swoim składzie 0,01% dodatek istniejącego na rynku komercyjnego produktu fitobiotycznego. Kurczęta brojlery utrzymywane były do 35 dnia życia.

W badaniu wykazano różnice istotne statystycznie ($P \leq 0,05$) w masie ciała uzyskanej przez ptaki w pierwszym tygodniu życia pomiędzy grupami B i N, a C. W 35 dobie życia ptaki różniły się istotnie statystycznie ($P \leq 0,05$) masą ciała pomiędzy grupami A (2611,2 g) i B (2629,5 g), a grupami kontrolnymi K (2530,0 g) i N (2518,7 g). Masa ciała w grupie C (2574,4 g) była na poziomie pomiędzy masami grup A i B, a K i N. Grupa C wykazywała najniższą masę ciała od 7 do 21 dnia, by następnie dorównać grupom kontrolnym.

Różnice istotne statystycznie ($P \leq 0,05$) wykazano w przyrostach dobowych w 7 dniu pomiędzy kurczętami z grup B (22,65 g) i N (22,47 g) oraz C (20,95 g). W przypadku pozostałych pomiarów nie wykazano różnic istotnych statystycznie. W przypadku

zużycia paszy zaobserwowano, że jest ono istotnie niższe ($P \leq 0,05$) pomiędzy grupą B (0,888), a pozostałymi grupami.

Pobranie paszy było w 21 dniu istotnie różne ($P \leq 0,05$) pomiędzy grupami C (1192,3 g), a K (1222,7 g) oraz w 35 dniu pomiędzy grupami B (3719,4 g), a K (3581,6 g) i N (3571,3 g).

Syntetyczny współczynnik EWW nie różnił się statystycznie pomiędzy grupami, choć w przypadku grup A i B wyniósł ponad 500 punktów, co wskazuje na bardzo wysoki wynik efektywności chowu.

Wyniki analizy sensorycznej mięsa wykazały istotne różnice ($P \leq 0,05$) w czerwoności (a^*) mięśni nóg pomiędzy grupami K (3,44), a N (4,526) oraz żółtości (b^*) dla mięśni piersiowych pomiędzy grupami K (0,835), a N (1,860), a także w parametrze jasności (L^*) dla mięśni nóg pomiędzy grupą C (54,22), a grupami A (50,59) i B (50,62) i N (50,49). Wykazano, że testowane preparaty nie wpływają na barwę mięsa, prototyp 2 wpłynął na współczynnik jasności. Zaobserwowano wpływ preparatu z grupy kontroli pozytywnej na poprawę czerwoności (a^*) oraz żółtości (b^*) próbek.

Parametr wycieku termicznego mięśni piersiowych różnił się istotnie ($P \leq 0,05$) pomiędzy grupami A (30,06) i B (22,06) wskazując na pozytywny i dawkozależny efekt preparatu. Wyciek termiczny mięśni nóg istotnie różnił się ($P \leq 0,05$) pomiędzy grupą B (30,96) i grupami K (23,83) i N (23,18).

Nie wykazano różnic w wartości pH, TBARS oraz siły cięcia pomiędzy testowanymi grupami.

Wyniki ankiet respondentów oceniających parametry mięsa wskazały na różnice ($P \leq 0,05$) w barwie mięśni piersiowych między grupami A (4,666), a B (4,000) oraz w wyglądzie mięśni piersiowych pomiędzy grupami B (4,111) i C (4,111), a N (4,666). Zaobserwowano także różnice w zapachu i barwie mięśni nóg pomiędzy grupami A (3,888) i K (4,638) oraz różnice w ocenie smaku mięśni nóg między grupą C (4,111) i N (4,638).

Przebadano aktywność przeciwutleniającą zastosowanych prototypów preparatów. Była ona niższa niż Troloxu, w przypadku prototypu 2 oraz preparatu z grupy kontroli pozytywnej były one na porównywalnym, stosunkowo niskim poziomie natomiast najniższą aktywność w obrębie testów wykazał prototyp 1.

Badanie histologiczne jelit wykazało stosunek kosmków jelitowych do głębokości krypt w zakresie 1,39 (grupa B) – 21,6 (grupa A), przy czym wartość minimalna osiągnięta została w grupie B. Powierzchnia kosmków jelitowych mieściła się w zakresie

207918 μm^2 (grupa K) – 15630587 μm^2 (grupa A). Głębokość krypt mieściła się w zakresie 72 μm (grupa A) – 448 μm (grupa C). Długość kosmków jelitowych osiągnęła wartości 516 μm (grupa B) – 2154 μm (grupa A). Na podstawie analizy ilościowej zwiększenie powierzchni chłonnej jelita wystąpiło w grupie A, najmniejsze w grupie C. Dwunastnica grupy A wykazywała najsilniejszy stopień przebudowy i zwiększoną powierzchnię resorbcyjną jelita. Znaczne pogłębienie krypt odnotowano w grupie C, grupa B wykazywała cechy pośrednie pomiędzy grupami A i C. Grupa N wykazywała silne pobudzenie jelit do odnowy i tworzenia nowych kosmków jelitowych.

Ocena immunohistematyczna wykazała, że zastosowanie zarówno prototyp 1 jak i prototyp 2 nie spowodowało immunostymulacji. Procent obszarów śledziony i migdałków jelitowych, które wykazywały obecność limfocytów Bu-1+, CD4+ i CD8+, nie wykazywał istotnych różnic w porównaniu z grupą kontrolną. Wyjątkiem była grupa C i kontrola pozytywna, które spowodowały wyższą liczbę komórek CD8+ w śledzionie w porównaniu z grupą kontrolną.

Na podstawie wyników badań rekomendowano do wprowadzenia komercyjnego prototyp 1 preparatu. Wykazał on efektywność we wdrożeniowej obserwacji terenowej gdzie kurczęta brojlery w grupie otrzymującej prototyp 1 charakteryzowały się istotnie mniejszym ($P \leq 0,05$) zużyciem paszy w stosunku do grupy referencyjnej.

Słowa kluczowe: fitobiotyki, fitoncydy, kurczęta brojlery, antybiotykowe stymulatory wzrostu, produkty ziołowe

Abstract

The aim of this study was to develop and evaluate the effectiveness of a preparation based on natural plant ingredients with phytobiotic properties in the prevention of broiler chicken rearing. Two prototypes of phytobiotic preparations were produced, consisting of a composition of micronized herbs or their extracts and peraclets. Prototype 1 was produced using the patented adiPHAG technology, which allows for the production of a stable and highly effective micellar emulsion in the duodenum. Its ingredients included methyl salicylate, menthol, anise oil, and eucalyptus oil. Prototype 2 of the preparation was developed based on processed spice and herbal products such as *Sinapis alba L.*, *Acorus calamus L.*, *Hedera helix L.*, *Curcuma longa L.* combined with thymol and menthol.

The prepared preparations were added to complete feed mixtures at quantities of 0.01% and 0.02%. The prepared feed mixtures were in powdered form and were produced in a commercial feed mill.

The study was conducted in an experimental chicken coop with 1280 commercial Ross 308 broilers. The birds were kept in a litter-based rearing hall in 40 pens divided into 5 experimental groups, each with 8 replicates. Three groups were tested with prototype preparations: group A with prototype 1 at 0.01%, group B with prototype 1 at 0.02%, and group C with prototype 2 at 0.01%. Two groups served as negative control (K) and positive control (N), containing a 0.01% additive of an existing commercial phytobiotic product on the market. The broiler chickens were kept until 35 days of age.

Statistically significant differences ($P \leq 0.05$) in body weight were observed between groups B and N and group C during the first week of life. At 35 days of age, birds in groups A (2611.2 g) and B (2629.5 g) differed significantly in body weight from control groups K (2530.0 g) and N (2518.7 g). The body weight in group C (2574.4 g) was between the weights of groups A and B, as well as K and N. Group C had the lowest body weight from day 7 to day 21, and then it caught up with the control groups.

Statistically significant differences ($P \leq 0.05$) in daily gains at 7 days were observed between chicks in groups B (22.65 g) and N (22.47 g) and C (20.95 g). In the remaining measurements, no statistically significant differences were found.

Regarding the FCR coefficient, it was significantly lower ($P \leq 0.05$) between group B (0.888) and the other groups.

Feed intake at 21 days was significantly different ($P \leq 0.05$) between groups C (1192.3 g) and K (1222.7 g), and at 35 days, between groups B (3719.4 g) and K (3581.6 g) and N (3571.3 g).

The synthetic EWW coefficient did not differ statistically between the groups, although it exceeded 500 points for groups A and B, indicating a very high efficiency in the growth.

Sensory analysis of the meat showed significant differences ($P \leq 0.05$) in redness (a^*) of leg muscles between groups K (3.44) and N (4.526) and yellowness (b^*) of breast muscles between groups K (0.835) and N (1.860), as well as brightness (L^*) for leg muscles between group C (54.22) and groups A (50.59) and B (50.62) and N (50.49). It was shown that the tested preparations did not affect the color of the meat, while prototype 2 affected the brightness coefficient. The prototype from the positive control group had a positive effect on redness (a^*) and yellowness (b^*) of the samples.

Thermal drip loss of breast muscles differed significantly ($P \leq 0.05$) between groups A (30.06) and B (22.06), indicating a positive dose-dependent effect of the preparation. Thermal drip loss of leg muscles differed significantly ($P \leq 0.05$) between group B (30.96) and groups K (23.83) and N (23.18).

There were no differences in pH, TBARS, or shear force values between the tested groups.

The results of the sensory evaluation of the meat parameters indicated differences ($P \leq 0.05$) in the color of breast muscles between groups A (4.666) and B (4.000), and in the appearance of breast muscles between groups B (4.111) and C (4.111) and N (4.666). Differences were also observed in the smell and color of leg muscles between groups A (3.888) and K (4.638), as well as differences in the taste evaluation of leg muscles between group C (4.111) and N (4.638).

Antioxidant activity of the prototype preparations was lower than that of Trolox, with prototype 2 and the positive control group showing relatively low activity, while prototype 1 had the lowest activity within the tests.

Histological examination of the intestines showed a ratio of villi to crypt depth ranging from 1.39 (group B) to 21.6 (group A), with the lowest value achieved in group B. The surface area of intestinal villi ranged from 207918 μm^2 (group K) to 15630587 μm^2 (group A). Crypt depth ranged from 72 μm (group A) to 448 μm (group C). Villus length reached values from 516 μm (group B) to 2154 μm (group A). Based on quantitative analysis, an increase in the absorptive surface area of the intestine was

observed in group A, with the smallest increase in group C. Duodenal tissue of group A showed the strongest degree of restructuring and increased surface area for intestinal absorption. A significant increase in crypt depth was observed in group C, while group B exhibited intermediate features between groups A and C. Group N showed strong stimulation of the intestine for regeneration and the formation of new intestinal villi.

Immunohistometric evaluation indicated that the use of both prototype 1 and prototype 2 did not cause immunostimulation. The percentage of areas of the spleen and gut-associated lymphoid tissue (GALT) showing the presence of Bu-1+, CD4+, and CD8+ lymphocytes did not differ significantly compared to the control group. An exception was group C and the positive control, which caused a higher number of CD8+ cells in the spleen compared to the control group.

Based on the research results, the introduction of commercial prototype 1 of the preparation was recommended. It demonstrated effectiveness in a field observation where broiler chickens in the group receiving prototype 1 showed significantly lower ($P \leq 0.05$) FCR values compared to the reference group.

Keywords: phytobiotics, phytoncides, broiler chickens, antibiotic growth promoters, herbal products.

Spis treści

Streszczenie.....	3
Abstract.....	6
1. Wprowadzenie.....	11
2. Wstęp.....	13
2.1. Specyfika chowu kurcząt brojlerów.....	13
2.2. Stresory środowiskowe.....	14
2.3. Presja mikrobiologiczna.....	17
2.4. Budowa histologiczna jelit.....	19
2.5. Immunologia przewodu pokarmowego.....	21
2.6. Antybiotykowe stymulatory wzrostu i kokcydiostatyki.....	22
2.7. Fitobiotyki i fitoncydy.....	25
3. Cel pracy.....	28
4. Materiały i metody.....	29
4.1. Formułacja prototypów preparatów fitobiotycznych.....	29
4.2. Badania na kurczętach brojlerach.....	31
4.2.1 Układ doświadczenia.....	31
4.2.2 Warunki zoohigieniczne.....	31
4.2.3 Żywienie.....	32
4.2.4 Ocena parametrów produkcyjnych kurcząt brojlerów.....	41
4.3. Analiza próbek mięsa.....	41
4.3.1. Analiza jakościowa mięsa.....	41
4.3.2. Analiza sensoryczna mięsa.....	42
4.4. Analiza poziomu aktywności przeciwutleniającej prototypów.....	43
4.5. Ocena histologiczna i histometryczna poszczególnych odcinków jelita cienkiego.....	43
4.6. Ocena immunohistochemiczna migdałków jelita ślepego.....	44
4.7. Statystyczna analiza wyników.....	46
5. Wyniki i dyskusja.....	46
5.1. Wyniki produkcyjne chowu kurcząt brojlerów.....	46
5.2. Wyniki analizy jakościowej i sensorycznej mięsa.....	50
5.3. Aktywność przeciwutleniająca badanych preparatów.....	58
5.4. Wyniki histologiczne i histometryczne jelita cienkiego.....	60

5.5. Wyniki oceny immunohistomatycznej.....	85
6. Wnioski	88
7. Obserwacje wdrożeniowe	89
8. Piśmiennictwo.....	92
9. Spis tabel.....	114
10. Spis fotografii i wykresów	115

1. Wprowadzenie

W Europie obserwowana jest coraz większa presja na ograniczenie, a nawet całkowite wycofanie antybiotyków z produkcji zwierzęcej. Według szacunków GIS zwierzęta spożywają 73% wszystkich podawanych antybiotyków. Polska jest na drugim miejscu wśród europejskich krajów stosujących w produkcji zwierzęcej Krytycznie Ważne Antybiotyki takie jak cefalosporyny, glikopeptydy, makrolidy, ketolidy, polimiksyny i chinolony. 25.10.2018 r. Parlament Europejski zatwierdził zakaz prewencyjnego stosowania antybiotyków w rolnictwie od 2022 roku. Nowe zapisy prawne mają na celu zakończenie metafilaktycznego podawania antybiotyków w produkcji zwierzęcej.

Duża presja na stosowanie antybiotyków powoduje konieczność posiadania alternatywnego rozwiązania. Wraz ze stopniowym ograniczaniem stosowania chemioterapeutyków wzrastać będzie zapotrzebowanie na alternatywne produkty o równie wysokiej skuteczności w walce z patogenami. Bez takich rozwiązań intensywna produkcja zwierzęca nie jest możliwa.

31 grudnia 2005 roku wycofano antybiotykowe stymulatory wzrostu (ASW), aktualnie zarejestrowanych jest w Unii Europejskiej tylko 11 kokcydiostatyków i od 15 lat nie zarejestrowano nowych. Mówi się o propozycji wycofania kokcydiostatyków, ich skuteczność pomimo programów rotacyjnych i przemiennych (jonofory/chemiczne) drastycznie spada.

Wprowadzenie nowego produktu fitoncydowego do portfolio firmy jest odpowiedzią na rosnące zapotrzebowanie rynku na skuteczne alternatywy dla antybiotyków. W najbliższym czasie produkt będzie wykorzystywany w chowie zwierząt wolnych od antybiotyków, stopniowo wkraczając na rynek jako preparat pierwszej reakcji na bakteryjne problemy zdrowotne w stadach brojlerów kurzych, indyckich czy kur niosek towarowych.

Produkt pozwoli firmie konkurować z zagranicznymi koncernami posiadającymi w swoich zasobach produkty używane do kontroli ryzyka mikrobiologicznego na fermach drobiu, oparte jednak na nieco innych rozwiązaniach.

Zastosowanie preparatu uzyskiwanego z roślin wyższych, głównie ziół, ma także dobry odbiór społeczny w aspekcie promowania produktów prozdrowotnych.

Zgodnie z założeniami produkt ma być złożony, ukierunkowany na działanie wobec pierwotniaków i bakterii bazując na efektach koergizmu, potencjalizacji,

dynamizacji, synergizmu, efekcie oligodynamicznym, działać w stosunkowo niewielkich dawkach (100-1000 g/tonę mieszanki pełnoporcjowej).

Proponowane rozwiązanie opiera się na fitoncydach oraz fitoaleksynach. Są to substancje o działaniu bakteriobójczym, pierwotniakobójczym oraz grzybobójczym wydzielane przez rośliny wyższe. Skuteczność działania tych związków jest porównywalna do skuteczności antybiotyków wytwarzanych przez grzyby, natomiast zapobiega powstawaniu oporności krzyżowej pomiędzy chemoterapeutykami stosowanymi w produkcji zwierzęcej oraz medycynie ludzkiej.

Substancje fitoncydowe wykazują niejednokrotnie szybsze działania przeciwko bakteriom gram+ i gram- w porównaniu stosowanych antybiotyków np. do bacytracyny czy neomycyny. Fakt, że nie były stosowane powszechnie sprawia, że występuje duża wrażliwość mikroorganizmów na ich działanie. Można je stosować bez okresu karencji, w szerokim dawkowaniu także w połączeniu ze szczepieniami. Dodatkowo działają jako naturalne stymulatory wzrostu, pobudzają układ immunologiczny zwierząt, wzmagają żółciopędność, żółciotwórczość. Często wykazują działanie rozkurczowe i przeciwzapalne

Skład produktu opierać się będzie na zmikronizowanych surowcach roślinnych, mineralnych (Zn, Fe), frakcji olejków eterycznych. Ma zawierać między innymi: saponiny trójterpenowe, tymol, karwakrol, ocymen, p-cymen, kuminaldehyd, 1,3; 1,4-p-menthadien-7-al, gamma-terpinen, laktony terpenowe typu germakranolidu, eudesmanolidu i gwajaju, germakren alkohol seskwiterpenowy tanacetol A i B, glikozydy monoterpene, kurkuminoidy, p-kumaroiloferuloilo-metan, furanodieny, beta-asaron, beta-farnezen, acoragermakron, octan geranylu, fenyloalkiloaminy (kapsacynoidy), alantalaktony (pochodna germakrenu i eudesmylu santonina 1880 r.), glikozydy siarkowe oraz metale: Zn, Fe (oligopleksy, zw. kompleksowe).

Nowum będzie także zastosowanie oligopleksu jako kluczowego rozwiązania w powstającym produkcie. Oligopleks to mieszanina co najmniej dwóch środków leczniczych dobranych w ten sposób, żeby wywierając podobny efekt działania, posiadały rozmaite punkty (receptory) zaczepu farmakologicznego. Dzięki takiemu doborowi składników występuje synergizm dawek, wskutek czego działania oligopleksu wielokrotnie przewyższa sumę działania poszczególnych składników. Możliwe jest to dzięki unikaniu konkurencji substancji o ten sam receptor oraz zastosowaniu reguły wieloreceptorowej.

2. Wstęp

2.1. Specyfika chowu kurcząt brojlerów

Chów kurcząt brojlerów może odbywać się w systemach: intensywnym, półintensywnym i ekstensywnym. W zależności od systemu w jakim prowadzony jest odchów zależą: czas tuczu, stosowana linia genetyczna, warunki w jakich utrzymywane są ptaki, sposób żywienia, wydajność produkcji oraz presja środowiskowa jakim są one poddawane (Mazanowski, 2011).

Typowo ekstensywny chów spotykany jest najczęściej w produkcji przydomowej i ma stosunkowo małe znaczenie gospodarcze. Tucz półintensywny ma pewne znaczenie na rynku europejskim, aczkolwiek jest on niszową gałęzią produkcji, szczególnie w krajach takich jak Francja czy Wielka Brytania, gdzie nie przekracza 11% całkowitej produkcji (Davies, 2019). Jest także obecny w Polsce jako kurczak wolnorosnący. Największe znaczenie gospodarcze ma chów intensywny, w którym ptaki utrzymywane są przez 5-6 tygodni i uzyskują finalnie masę ciała 2,20 – 3,00 kg.

Kurczęta brojlery są mieszańcami powstałymi z kojarzenia linii hodowlanych wyselekcjonowanych pod kątem parametrów użytkowych takich jak tempo wzrostu, wykorzystanie paszy na kilogram przyrostu masy ciała, przeżywalność oraz jakość mięsa i wydajność rzeźna (Aviagen, 2018).

Tempo wzrostu kurcząt brojlerów w latach 1957-2005 wzrosło ponad czterokrotnie (Tallentire i in., 2016) przy czym szacuje się, że 85-90% tej poprawy jest zasługą selekcji genetycznej, a pozostała część wynika ze zmian w żywieniu (Havenstein i in., 2003).

Należy jednak pamiętać, że programy hodowlane o wąskim ukierunkowaniu i selekcji pod kątem niewielkiej ilości cech, stwarzają duże ryzyko negatywnych konsekwencji dla cech nieselekcionowanych od dziesięcioleci (Julian, 1998). Programy hodowlane głównie koncentrują się na wskaźnikach ekonomicznych, ponieważ włączanie cech zdrowotnych i dobrostanowych do nich jest trudne do zmierzenia z powodu niskiej odziedziczalności tych cech (Hocking, 2014).

Pełne wykorzystanie potencjału genetycznego kurcząt brojlerów uwarunkowane jest zapewnieniem optymalnych warunków zoohigienicznych, właściwego żywienia, profilaktyki zdrowotnej oraz zarządzania stadem.

Obserwowana jest znaczna różnica pomiędzy potencjałem genetycznym ptaków, a rzeczywistą wydajnością osiąganą w warunkach produkcyjnych. Spowodowane jest to

wieloma zakaźnymi i niezakaźnymi czynnikami ryzyka, które powodują obniżoną wydajność i zwiększoną śmiertelność u kurcząt brojlerów (Jones i in., 2018).

Przemysłowy chów brojlerów odbywa się w ściśle kontrolowanych warunkach środowiskowych. Bardzo ważne jest wydajne i ekonomiczne zapewnienie komfortowego, zdrowego środowiska dla rosnących ptaków. Do kluczowych czynników, które należy wziąć pod uwagę należą: temperatura, jakość powietrza, wilgotność i światło.

Analiza 358 ferm kurcząt brojlerów w Europie wykazała, że na zdrowie i wydajność ptaków wpływa wiele czynników bezpośrednio związanych z zarządzaniem i utrzymaniem fermy. Pokazała ona także, że warunki utrzymania pomiędzy kurnikami mogą znacznie się różnić i wynikają z warunków technicznych i technologicznych, niejednokrotnie przestarzałych obiektów. Odbiegają one także od zaleceń produkcyjnych narażając ptaki na liczne czynniki ryzyka (van Limbegen i in., 2020).

2.2. Stresory środowiskowe

Ptaki należy utrzymywać w strefie ich komfortu termicznego tak aby nie były zmuszone zużywać energii na produkcję lub utratę ciepła w celu utrzymania optymalnej temperatury ciała. Kiedy są one utrzymywane w zbyt niskich lub zbyt wysokich temperaturach ich organizm potrzebuje dodatkowej energii w celu efektywnej termoregulacji, co wywołuje stres obniżający odporność oraz wywierający dodatkową presję.

Wysoka temperatura otoczenia jest jednym z najpoważniejszych stresorów środowiskowych dla drobiu i wiąże się ze znacznym pogorszeniem wydajności, nieefektywnym wykorzystaniem paszy oraz zwiększoną śmiertelnością (Azad i in., 2010; Azad i in. 2013; Quinteiro-Filho i in., 2010). Ptaki poddawane stresowi cieplnemu wykazywały mniejszą odpowiedź przeciwciał po immunizacji komercyjnymi szczepionkami, a ponad to miały zwiększoną podatność na infekcje bakteryjne z powodu zwiększonego udziału bakterii patogennych w jelitach i zwiększonemu poziomowi przepuszczalności jelit (Hirakawa i in., 2020). Nawet w regionach świata o klimacie umiarkowanym wysoka temperatura występująca w sezonie letnim powoduje znaczne straty w przemyśle drobiarskim. Na skutek tego przemysł produkcji zwierzęcej w USA ponosi straty w wysokości 1,69 – 2,36 mld dolarów amerykańskich (St-Pierre, Cobanov i Schnitkey, 2003).

Także zbyt niskie temperatury stanowią stresor, który negatywnie wpływa na dobrostan kurcząt brojlerów. Szczególnie wrażliwe na niskie temperatury są młode ptaki z powodu niedojrzałości ich organów termogenicznych (Mujahid i Furuse, 2009). Stres spowodowany zbyt niską temperaturą może doprowadzić do obniżenia odporności i podatności ptaków na infekcję *Escherichia coli* w pierwszym tygodniu ich życia (Huff i in., 2007), a także zmianę funkcji immunologicznych w jelitach 15 dniowych kurcząt (Zhao i in., 2013). Brojlery utrzymywane w zbyt niskiej temperaturze wykazywały objawy obrzęku, przekrwienia oraz uszkodzenia błony śluzowej jelit (Zhang i in., 2011). Badania wykazały, że stres związany ze zbyt niską temperaturą otoczenia znacznie wpływa na osłabienie funkcji bariery jelitowej, a co za tym idzie zwiększa narażenie na infekcje bakteryjne (Zhou i in., 2021).

Bardzo duże znaczenie dla uzyskiwania optymalnych wyników produkcyjnych ma zagęszczenie ptaków na metr kwadratowy obiektu. Pomimo, że jest ono ograniczone przez regulacje Unii Europejskiej (Dyrektywa Rady 2007/43/WE) do maksymalnie 42 kg masy żywej na metr kwadratowy, badania i praktyka wskazują, że tak duże zagęszczenie zwierząt stanowi sporą presję i prowadzi do pogorszenia uzyskiwanych wyników produkcyjnych, a także statusu zdrowotnego stada (Shynkaruk i in., 2023). Wysokie zagęszczenie ptaków powoduje podwyższenie wilgotności ściółki, to zaś sprzyja m.in. większej produkcji amoniaku (Ritz, Fairchild i Michael, 2009). Zbyt wilgotna ściółka, z którą ptaki pozostają w ciągłym kontakcie, może powodować zwiększone obciążenie bakteryjne, stany zapalne skóry oraz występowanie pęcherzy na mięśniach piersiowych (Wilkinson i in., 2011; Taira i in., 2014; Kaukonen, Norring i Valros, 2016). Mokra ściółka jest także silnie związana z występowaniem nekrotycznego zapalenia jelit (Hermans i Morgan, 2007).

Bardzo istotnym parametrem jest jakość powietrza występującego w kurniku. Kurczęta brojlery utrzymywane na ściółce narażone są na podwyższone poziomy amoniaku, który powstaje w procesach rozkładu kwasu moczowego w odchodach ptaków. Proces ten jest szczególnie nasilony w przypadku stosowania w żywieniu kurcząt paszy wysokobiałkowej, azot z organizmu wydalany jest wtedy w 80% w postaci kwasu moczowego, 10% amoniaku i 5% mocznika. Podwyższone stężenia tego gazu przekraczające 25 ppm w kurniku są poważnym stresorem oksydacyjnym i prowadzą do podrażnienia i stanów zapalnych śluzówki ptaków, a także upośledzają układ odpornościowy (Sheikh i in., 2018).

Kolejnym czynnikiem wywołującym presję na ptakach jest intensywne żywienie. Aby uzyskać tak szybki przyrost masy ciała oraz niską konwersję paszy wymagane jest zastosowanie mieszanek paszowych o bardzo wysokiej zawartości białka ogólnego oraz energii metabolicznej, która w dużej mierze uzyskiwana jest z tłuszczów.

Tab. 1 Aktualne zalecenia żywieniowe dla kurcząt brojlerów (Aviagen, 2022):

		Starter	Grower	Grower	Finiszer	Finiszer
			1	2	1	2
Wiek	Dni	0-10	11-22	23-33	34-44	Pow.44
Energia metaboliczna	kcal/kg	2975	3050	3075	3100	3125
Białko ogólne	g/kg	220	205	190	180	175
Lizyna strawna jelitowo	g/kg	12,6	11,4	10,6	10,2	9,8
Metionina strawna jelitowo	g/kg	5,3	4,9	4,7	4,5	4,3

W celu uzyskania tak skoncentrowanych parametrów mieszanek należy używać wysokobiałkowych oraz wysokoenergetycznych surowców paszowych takich jak oleje i tłuszcze zwierzęce oraz roślinne, śruty i makuchy roślinne, mączki rybne czy produkty pochodzące z krwi.

Z drugiej strony żywienie kurcząt brojlerów stanowi ponad 75% kosztów produkcji. Właściwa optymalizacja mieszanek paszowych wymaga zastosowania tańszych, często odpadowych surowców. Zastosowanie tłuszczów zwierzęcych, które okresowo są tańszą alternatywą dla olejów roślinnych może zwiększać liczbę *Clostridium perfringens* w jelitach ptaków (Knarreborg i in., 2002). Badania wskazują, że skarmianie suszonego gorzelnianego wywaru kukurydzianego (DDGS) zwiększa efekt negatywnego oddziaływania kokcydiozy oraz presji wywoływanej przez *C. perfringens* (Barekatin, 2013).

Wszystkie czynniki powodujące podrażnienie jelit, zwiększone wydzielanie śluzu lub zmniejszone trawienie i wchłanianie białka takie jak: przerwy w dostępie do paszy, nagłe zmiany składu mieszanek paszowych, obecność mykotoksyn, czy niewłaściwa

obróbka termiczna śruty sojowej predysponują do występowania nekrotycznego zapalenia jelit (Timbermont, 2011).

Zawartość oraz rodzaj białka w diecie ptaków mogą być bezpośrednio związane z chorobami przewodu pokarmowego u drobiu (Quaisrani, 2015). Fermentacja białek w dalszej części jelita cienkiego może prowadzić do powstawania toksycznych związków takich jak amoniak, poliaminy, indol i skatol (Barnes, Kirby i Olivier, 2001). Istnieją także dowody wskazujące, że poszczególne źródła białka w diecie mogą wpływać na populację bakterii chorobotwórczych w przewodzie pokarmowym drobiu (Drew i in., 2004). Niestrawione białko może też zwiększać poziom poszczególnych aminokwasów w dystalnej części przewodu pokarmowego, co może wpływać na jego mikroflorę i podatność kurcząt na choroby jelit (Dahiya i in., 2007). Niektóre ze źródeł białka takie jak np. mączka rybna mogą negatywnie wpływać na mikroflorę w obecności kokcydiozy, co z kolei może prowadzić do nekrotycznego zapalenia jelit (Rodgers i in., 2015). Słabo strawione białka pokarmowe mogą negatywnie wpływać na produktywność zwierząt oraz ich stan zdrowia (Quaisrani i in., 2015).

2.3. Presja mikrobiologiczna

Z intensyfikacją produkcji, dużym zagęszczeniem i skoncentrowanym żywieniem zdecydowanie łączy się także problem występowania kokcydiozy. Jest ona uznawana za główną chorobę pasożytniczą drobiu, która powoduje poważne konsekwencje ekonomiczne (Allen i Fetterer, 2002). Jest to choroba wywoływana przez pierwotniaki z rodzaju *Eimeria* spp.. Rozwijają się one w jelitach zwierząt wykazują się dużą specyficznością względem żywiciela. U drobiu rozpoznano siedem gatunków *Eimeria* spp., każdy z nich atakuje inny odcinek jelit oraz ma odmienną charakterystykę patogenności (Vrba, Blake i Poplstein, 2010).

Zakażenie następuje poprzez spożycie wysporulowanych oocyst, które następnie przechodzą cykl rozwojowy w poszczególnych, określonych dla rodzaju, odcinkach przewodu pokarmowego. Do najczęściej występujących objawów zaliczyć można biegunkę z występującym śluzem oraz domieszką krwi w kałomoczu, brak apetytu, utratę masy ciała, apatię, obniżenie wchłaniania składników pokarmowych, wzrost śmiertelności oraz zróżnicowanie osobników w stadzie (Chapman, 2014).

Kokcydia atakują błonę śluzową jelita wywołując stan zapalny oraz uszkodzenie komórek nabłonka jelitowego. Obserwowane są zmiany histologiczne komórek nabłonka jelitowego ptaka, w tym zniekształcenia, pęknięcia, oddzielenia się od sąsiednich

komórek i złuszczenia (Yun, Lillehoy H., Lillehoy E, 2000). Zmniejsza się spożycie paszy i wody, odchody mogą być wodniste, białawe i czasem krwawe (Ali, Naqvi i Tariq, 2014). Następuje zmniejszone wchłanianie składników pokarmowych spowodowane zmniejszoną aktywnością enzymu rąbka szczoteczkowego (Adams, Vahl i Veldman, 1996). Infekcja oocystami *Eimeria acervulina* i *Eimeria maxima* zwiększała wielkość oraz ilość komórek kubkowych wzdłuż krypt jelita krętego i stymulowała wydzielanie mucyny. Analogicznie infekcja *Eimeria tenella* powodowała zwiększone wydzielanie śluzu w jelicie ślepych (Collier i in., 2008; Sharma i Schumacher, 1995). Wzrost ten jest reakcją immunologiczną skierowaną przeciw pierwotniakom, jednak może on powodować powikłania sprzyjając kolonizacji jelit przez patogeny takie jak *C. perfringens* (Adhikari i in., 2020), salmonella czy sprzyja zakażeniu wirusem choroby Mareka lub zakaźnej choroby torby Fabrycjusza (Cervantes, McDougal i Jenkins, 2020).

Kokcydioza uznawana jest za główny czynnik chorobowy limitujący wzrost ptaków oraz wykorzystanie paszy (Williams, 1999). Szacowany koszt kokcydiozy w skali całego świata w 2016 roku wynosił 10,360 mld funtów brytyjskich. Według innych źródeł aktualnie jest to przedział od 7 do 13 mld dolarów amerykańskich (Blake i in., 2020), zaś w Polsce w tym samym czasie szacowano go na 51 mln euro (Szeleszczuk, Doner i Nerc, 2016). W wyniku powstałej lekooporności, zwiększonej śmiertelności oraz obniżonej wydajności produkcji, kokcydioza została zaliczona do jednej z najważniejszych ekonomicznie chorób drobiu (Williams, 1999).

Istotnym czynnikiem pogarszającym uzyskiwane wyniki produkcyjne jest nekrotyczne zapalenie jelit (necrotic enteritis, NE) występujące w postaci klinicznej lub subklinicznej. Jest to choroba o stosunkowo krótkim przebiegu, której często objawami są depresja przyrostów masy ciała, spadek pobrania paszy, nagła biegunka powiązana z martwicą śluzówki oraz nagły wzrost śmiertelności stada. Ta jednostka chorobowa dotyczy głównie kurcząt brojlerów w wieku 14 – 35 dni oraz indyków rzeźnych w wieku 7 – 12 tygodni. Wywoływana jest przez *C. perfringens* będącą beztlenową, gram-dodatnią, nieruchliwą bakterią tworzącą przetrwalniki, które z kolei umożliwiają jej przeżycie w niekorzystnych warunkach środowiskowych m.in. w glebie oraz w rozkładającej się materii organicznej (Novak, Juneja i McClane, 2003). Poprzez przyleganie do kosmków jelita cienkiego, namnażanie się i uwalnianie toksyn wywołujących martwicę, bakterie te powodują objawy nekrotycznego zapalenia jelit (Shimitzu i in., 2002). Należy nadmienić, że jest ona związana z infekcjami *E. acervulina* i *E. maxima*, a także wszelkimi zaburzeniami mikroflory jelitowej (Hargis, 2023). Biorąc

pod uwagę wszechobecność tych patogenów głównym źródłem *C. perfringens* jest środowisko (Petit, Gilbert i Popoff, 1999). Skażenie może pochodzić z kurników, ptaki narażone są poprzez spożycie ściółki, pobranie zakażonej wody, kontakt z owadami. Wektorem zakażenia może też być obsługa lub dzikie ptaki i ssaki (Craven i in., 2001). Roczne straty spowodowane występowaniem tej jednostki chorobowej na świecie oszacowano na 6 mld dolarów amerykańskich (Li i in., 2017).

Duża część wieloczynnikowych problemów zdrowotnych jelit ptaków określana jest przez lekarzy jako dysbakterioza (Fabri, 2000). Została ona zdefiniowana jako obecność jakościowo i/lub ilościowo nieprawidłowej mikroflory w proksymalnych odcinkach jelita cienkiego, która wywołuje kaskadę reakcji w przewodzie pokarmowym zmniejszając strawność składników pokarmowych, upośledzając funkcje bariery jelitowej, powodując stany zapalne i zwiększając ryzyko translokacji bakteryjnej (van der Klis i Lensing, 2007).

Główne objawy kliniczne obserwowane są pomiędzy 20 – 30 (Pattison, 2002) dniem życia i należą do nich: blade, błyszczące lub pomarańczowe odchody zawierające niestrawione cząstki paszy, mokre i tłuste odchody oraz spienione odchody pochodzące z jelita ślepego. Skutkiem tego jest także zmniejszone spożycie paszy, zmniejszone dobowe przyrosty masy ciała i zwiększona konwersja paszy (Wilson i in., 2005). Czynnikiem zakaźnymi, które odgrywają rolę przy dysbakteriozie jest występowanie kokcydiów, *C. perfringens* oraz innych bakterii wytwarzających toksyczne metabolity (De Gussem, 2007). W przypadku terenowej dysbakteriozy u kurcząt brojlerów zaobserwowano zanik lub upośledzenie kosmków jelitowych, zmniejszenie grubości błony mięśniowej i wzrost nacieku limfocytów T w bonie śluzowej jelit (Teirlynck i in., 2011).

2.4. Budowa histologiczna jelit

W większości przypadku długość przewodu pokarmowego ptaków jest krótsza od przewodu pokarmowego ssaków, co jest rekompensowane zwiększonym pobraniem paszy oraz zwiększoną absorpcją składników pokarmowych. Jelito cienkie dzieli się na: dwunastnicę, jelito czcze i jelito kręte. Długość jelit jest także zróżnicowana ze względu na rodzaj pobieranego pokarmu i jest dłuższa u ziarnojadów niż u owadożerców.

Ściana błony śluzowej jelit drobiu zawiera kosmki, których długość zmienia się w zakresie od 1,5 mm w dwunastnicy do 0,4 mm w jelicie krętym. Mają one układ zygzakowaty co ma spowalniać przepływ treści jelitowej. Zarówno kosmki jelitowe jak i

krypty są w pełni ukształtowane w momencie wyklucia, co sprawia, że ptaki są zdolne do samodzielnego pobierania pokarmu już od pierwszych chwil po opuszczeniu jaja (Uni i in., 2003). Ich ilość ulega zmianie wraz z wiekiem, zmniejsza się od 1 do 10 dnia po czym pozostaje na stałym poziomie. U kurcząt brojlerów kosmki jelitowe są większe i mają więcej wypustek komórek nabłonkowych zlokalizowanych pomiędzy wierzchołkową powierzchnią kosmków dwunastnicy niż u kur nieśnych (Yamauchi i Isshiki, 1991).

W budowie nabłonka jelitowego można wyróżnić krypty jelitowe utworzone wewnątrz jego pofałdowań oraz kosmki jelitowe stanowiące jego wybrzuszenia. Są one skierowane bezpośrednio do światła jelita i wyeksponowane na działanie czynników zewnętrznych (Crosnier, Stamataki i Lewis, 2006). Komórki macierzyste znajdujące się w kryptach oraz u drobiu także wzdłuż kosmków (Uni, Platin i Sklan, 1998), namnażają się i różnicują wzdłuż osi krypta-kosmek tworząc dojrzałe komórki pełniące funkcje absorpcyjne i sekrecyjne (Hans, 2013).

Stosunek wysokości kosmków jelitowych do głębokości krypt uważany jest za wskaźnik zdrowotności jelit (Pluske i in., 1996). Wzrost długości kosmków jelitowych związany jest z poprawą zdolności trawiennych oraz absorpcyjnych ptaka oraz zwiększoną aktywnością enzymów rąbka szczoteczkowego jelit (Prakatur i in., 2019). Zmniejszenie głębokości krypt poprawia aktywność enzymatyczną w jelitach, co wpływa na zwiększoną dostępność składników odżywczych (Kelly, Smyth i McCracken, 1991).

Najliczniejszą grupą budującą nabłonek jelitowy są enterocyty, które biorą udział w trawieniu i wchłanianiu składników pokarmowych, mają one także możliwość różnicowania antygenów od składników pokarmowych (Cheng i Leblond, 1974). Komórki kubkowe są z kolei odpowiedzialne za wydzielanie mucyn i innych produktów, które tworzą chroniącą jelita warstwę śluzu (Specian i Olivier, 2017). Najmniejszą, przeszło 1%, grupę komórek stanowią komórki enteroendokryne, które odgrywają rolę w regulacji wydzielania hormonów oraz aktywności enzymatycznej przewodu pokarmowego (Rehfeld, 2004).

W miejscu połączenia jelita krętego i jelita grubego znajdują się parzyste jelita ślepe, które u kurcząt brojlerów dzielą się morfologicznie na trzy części: podstawa z dobrze rozwiniętymi kosmkami, część przyśrodkowa z podłużnymi fałdami i małymi kosmkami oraz część dystalna zawierająca małe kosmki i podłużne oraz poprzeczne fałdy (Ferrando i in., 1987). Na proksymalnym końcu każdej z kieszonek jelita ślepego

znajdują się migdałki jelita ślepego pełniące kluczową rolę w procesach immunologicznych (GALT) (Schat, Kaspers i Kaiser, 2014).

2.5. Immunologia przewodu pokarmowego

Przewód pokarmowy ma bezpośrednie połączenie ze środowiskiem zewnętrznym. Jego rolą jest transport pobranej treści pokarmowej, trawienie i wchłanianie składników odżywczych, sekrecja enzymów endogennych, wydalanie niestrawionych składników paszy oraz odpadów metabolicznych. Jest on również środowiskiem życia mikrobiomu jelit oraz stanowi barierę przed czynnikami zakaźnymi i niezakaźnymi (Yegani i Korver, 2008). Jedynie zdrowy przewód pokarmowy będzie w stanie prawidłowo wykonywać te funkcje. Duży wpływ na integralność przewodu pokarmowego mają czas podania pokarmu, jego skład, struktura i jakość (Potturi, Patterson i Applegate, 2005), stres związany z zarządzaniem żywieniem, brakiem wody oraz nieodpowiednie warunki zoohigieniczne (Quinteiro-Filho i in., 2010). Bardzo duży wpływ mają też bakteryjne czynniki zakaźne (*E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *C. perfringens*, *Campylobacter*) oraz pasożyty jelitowe takie jak *Eimeria* spp. oraz robaki (Burkholder i in., 2008; Timbermont i in., 2010).

Skoro przewód pokarmowy jest główną drogą, przez którą patogenne mikroorganizmy wnikają do tkanek, niezbędny jest skuteczny mechanizm ochrony organizmu przed nimi. U ssaków te rolę przejmują w dużej mierze układ limfatyczny z rozbudowanymi węzłami chłonnymi. U ptaków typowe węzły chłonne występują tylko u niektórych gatunków wodnych takich jak gęsi, łabędzie i kaczki (Hodges, 1974). Dobrze rozwinięta jest tkanka limfatyczna związana z błoną śluzową (MALT) (Matsumoto i Hashimoto, 2000). Składa się ona z komórek limfoidalnych zlokalizowanych głównie w błonie śluzowej blaszki właściwej i błonie podśluzowej dróg jelitowych i oddechowych (Schummer, 1973). Jest to pierwsza linia obrony przed antygenami, które wnikają do organizmu podczas procesów oddychania oraz pobierania pokarmu (Brandtzaeg, 1984). MALT obejmuje gruczoły Hardera, tkankę limfatyczną związaną z oskrzelami, tkankę limfatyczną nosogardzieli i tkankę limfatyczną związaną z jelitami (GALT). U drobiu GALT obejmuje migdałki przełyku, migdałki odźwiernika, uchylek Meckela, kępki Peyera i dwa migdałki jelita ślepego. Anatomicznie i funkcjonalnie najważniejszymi narządami GALT są migdałki jelita ślepego natomiast sam GALT jest kluczową tkanką immunologiczną układu odpornościowego błony śluzowej, która koordynuje reakcję humoralną (Perlata, Danelli i Vivas, 2016; Perlata i in., 2017).

Układ odpornościowy jelit młodych kurcząt brojlerów jest słabo rozwinięty w odniesieniu do starszych ptaków, a jego pełny rozwój następuje około 4-6 tygodni po wykluciu. W pełni dojrzałe migdałki jelita ślepego stanowią jeden z głównych elementów GALT u ptaków (Janardhana i in., 2009). Podczas badania modulacji immunologicznej ptaków są one wykorzystane ze względu na ich względnie duży rozmiar (Haghighi i in., 2008). Wytwarzają one prekursory efektorowych komórek odpornościowych, które skierowane zostają do powierzchni błony śluzowej jelita (Befus i in., 1980).

Immunomodulacja jest to dowolny proces wyzwalany przez immunomodulator, który stymuluje układ odpornościowy lub odpowiedzi immunologiczne. Może on polegać na wzmacnianiu odporności lub też jej osłabianiu w przypadku nadmiernej reakcji immunologicznej. Odpowiedź immunologiczną można wzmocnić immunostymulatorami do których zalicza się zarówno środki farmakologiczne jak i związki naturalne lub mikroorganizmy (Gea-Banacloche, 2006).

Główną rolę w odpowiedzi immunologicznej układu pokarmowego odgrywa GALT, który uruchamia całe spektrum wrodzonych i adaptacyjnych odpowiedzi immunologicznych różniących się w zależności od charakteru stresora. Ma ona na celu ograniczenie infekcji między innymi poprzez wydzielanie mucyny. Śluz jest integralnym elementem strukturalnym jelita, nawilża on błonę śluzową, stanowi on system transportu pomiędzy treścią jelita, a jego nabłonkiem, a także odpowiada za fizyczne unieruchomienie patogenów. Zapewnia on także miejsce kolonizacji i składniki odżywcze dla bakterii komensalnych. Oligosacharydy mucyny stanowią dla tych mikroorganizmów źródło peptydów i węglowodanów, a jego struktura fizyczna pozwala bakteriom uniknąć szybkiego wydalenia z organizmu (Zhang i in., 2015).

Mikroflora przewodu pokarmowego ma zasadniczy wpływ na skład i ilość śluzu występującego w jelitach, co udowodniono badając ilość mucyny u zwierząt wolnych od zarazków (Szentkuti i in., 1990). W zależności od sytuacji mucyny mogą mieć odczyn zasadowy lub kwaśny, przy czym te drugie stanowią ochronę przed translokacją bakteryjną (Sharma i Schumacher, 1995).

2.6. Antybiotykowe stymulatory wzrostu i kokcydiostatyki

W latach czterdziestych XX wieku zaobserwowano poprawę przyrostów u zwierząt karmionych suszoną grzybnią *Streptomyces aureofaciens*, która zawierała pozostałości chlorotetracykliny. Dzięki temu opisano efekt działania antybiotykowego stymulatora wzrostu (ASW) (Dibner i Richards, 2005).

Działanie antybiotykowych stymulatorów wzrostu jest złożone. Opisano co najmniej cztery główne mechanizmy działania ASW (Gaskins, Collier i Anderson, 2002) takie jak:

- 1) Zahamowanie endemicznej subklinicznej infekcji, co redukuje koszty metaboliczne funkcjonowania układu odpornościowego.
- 2) Zmniejszenie produkcji metabolitów bakteryjnych hamujących wzrost, takich jak amoniak i produkty degradacji żółci.
- 3) Ograniczenie wykorzystania składników pokarmowych przez mikroorganizmy.
- 4) Ściana zwierząt karmionych ASW jest cieńsza przez co następuje poprawa wchłaniania i wykorzystania składników pokarmowych.

Dodatkowo określono, że modyfikacja niektórych cech jelit w pierwszym tygodniu życia kurcząt, w tym pogłębienie krypt w jelicie krętym może wpływać pozytywnie na przyrosty masy ciała (Miles i in., 2006). Substancje te mają także zdolność do zmniejszania wczesnego namnażania się drobnoustrojów w okresie pierwszych 9 dni życia, co znacząco przekłada się na mniejsze ich współzawodnictwo o składniki odżywcze (Geyra, Uni i Sklan, 2001).

Ciągły kontakt śluzówki przewodu pokarmowego z występującymi w nim bakteriami powoduje przewlekłe stany zapalne (Biancone, 2002). Udowodniono, że antybiotykowe stymulatory wzrostu gromadzą się w komórkach zapalnych i działając bakteriostatycznie hamują wrodzoną odpowiedź immunologiczną (Labro, 2000), co z kolei zmniejsza kataboliczne koszty utrzymania odpowiedzi immunologicznej.

Najlepsze efekty zastosowania antybiotykowych stymulatorów wzrostu obserwuje się u zwierząt znajdujących się pod dużą presją zakaźną (Page, 2006). Istnieją jednak badania, które nie wykazują różnic w przyroście masy ciała kurcząt brojlerów żywionych paszami zawierającym ASW w przypadku braku problemów zdrowotnych (Naveenkumar i in., 2017).

Przed wycofaniem na terenie Unii Europejskiej ASW (Rozporządzenie RE nr 1831/2003) takich jak awoparycyna, linkomycyna, amoksycylina, tylozyna, wirginiamicyna i bacytracyna były one z powodzeniem stosowane jako prewencja przeciwko martwiczemu zapaleniu jelit (McDevitt i in., 2006). Po wycofaniu tych substancji z pasz w Norwegii zaobserwowano znaczny wzrost przypadków NE z prawie nieobserwowalnych do 27% stad z klinicznymi objawami choroby i 49% subklinicznymi (Gaucher i in., 2015). Szacuje się, że koszt, który ponoszą producenci kurcząt brojlerów to 0,05 USD w przeliczeniu na ptaka (Wade i Keyburn, 2015).

Zakłada się, że w przypadku stosowania ASW ryzyko występowania pozostałości antybiotyków w tkankach i produktach zwierzęcych, które mogłyby wywołać reakcje alergiczne lub toksyczne, jest znikome, ponieważ antybiotykowe stymulatory wzrostu pozostają niewchłaniane z przewodu pokarmowego (Donoghue, 2003). Twierdzenie to może być prawdziwe, jeśli mamy do czynienia ze zdrowym przewodem pokarmowym, natomiast przypadki zwiększonej przepuszczalności jelit u ptaków nie są rzadkie (Niewold i in., 2000), a jedną z występujących konsekwencji zapalenia jelit jest zwiększona przepuszczalność makrocząsteczkowa (MacDonald i Monteleone, 2005).

Stosowane jednak w dłuższej perspektywie prowadzą do ewolucji mikroorganizmów i powstawania patogenów lekoopornych (Pokharel, Raut i Adhikari, 2019). Nadużywanie i niewłaściwe stosowanie antybiotyków w rolnictwie oraz medycynie weterynaryjnej doprowadziło do pojawienia się antybioopornych szczepów bakterii i rozprzestrzenienia się odporności na antybiotyki. Obserwuje się, że zakażenia bakteriami opornymi na antybiotyki powodują 0,7 miliona zgonów rocznie na całym świecie, a szacunki podają, że liczba ta może wzrosnąć do nawet 10 milionów w 2050 roku (Abadi i in., 2019; Djordjevic i Morgan, 2019).

Jednym ze sposobów profilaktyki kokcydiozy jest stosowanie kokcydiostatyków. Kokcydiostatyki są to produkty powstałe w procesie syntezy chemicznej lub wyprodukowane przez mikroorganizmy, które inhibują lub niszczą kokcydia (Rybicki, 2020). W krajach Unii Europejskiej dopuszczonych do stosowania jako dodatki do pasz jest jedenaście kokcydiostatyków w tym oparte o jonofory polieterowe, będące produktem fermentacji bakteryjnej *Streptomyces spp.* i *Acinomadura spp.* (lasalocid, monenzyna, maduramycyna, narazyna, salinomycyna, semduamycyna) oraz syntetyczne (dekokwinat, diklazuril, halufuginon, nikarbazyna, robenidyna) (Rozporządzenie Rady WE nr 1831/2003).

Oprócz działania przeciw pierwotniakom jonofory polieterowe wykazują działanie antybiotyczne przeciwko bakteriom gram dodatnim w tym mycobacteria pełniąc zarazem rolę antybiotykowego stymulatora wzrostu (Kevin, Meujo i Hamann, 2019).

Niestety nieprawidłowe stosowanie substancji kokcydiostatycznych doprowadziły do powstania lekoopornych odmian Eimerii, a także do pojawienia się w produktach mięsnych toksycznych dla ludzi pozostałości tych substancji (Kostadnović i in., 2015). Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA) określił, że 5% poziom maksymalnego dozwolonego stężenia kokcydiostatyku w paszy nie jest

toksyczny dla konsumentów (Olejnik, Szprengier-Juszkiewicz i Jedziniak, 2014). Mimo to długotrwałe narażenie konsumenta na niskie poziomy tych substancji w diecie może powodować reakcje nadwrażliwości związane z zaburzeniem dynamiki przewodu pokarmowego oraz jego mikrobiomu, a także rozwój odporności drobnoustrojów na antybiotyki (Sobral i in., 2020). Ponadto wieloletnie doświadczenia z zastosowania jonoforów u drobiu w Norwegii wykazało, że dodatek narazyny do paszy powoduje wzrost liczny enterokoków odpornych na stosowaną w medycynie ludzkiej wankomycynę (Norwegian Scientific Cmittee, 2015).

Na podstawie danych naukowych można stwierdzić, że konieczne wydaje się być wyeliminowanie kokcydiostatyków, aby zapobiegać przewlekłej toksyczności spowodowanej długotrwałym narażeniem konsumentów na niskie poziomy tych substancji, a także zachowanie skuteczności obecnie dostępnych substancji kokcydiostatycznych (Martins i in., 2022).

Alternatywą dla kokcydiostatyków są produkty naturalne takie jak prebiotyki i probiotyki, ekstrakty roślinne, ekstrakty z grzybów i olejki eteryczne. W większości przypadków nie porażają one bezpośrednio pasożyta raczej stymulując układ odpornościowy ptaków oraz wpływają pozytywnie na mikroflorę przewodu pokarmowego (Chapman i Jeffers, 2014).

2.7. Fitobiotyki i fitoncydy

Fitobiotyki są to fitogeniczne dodatki paszowe uzyskiwane z roślin wyższych (korzeni, nasion, liści, kwiatów, pąków, kory lub ich ekstraktów). Ich zadaniem jest chronić roślinę przed infekcjami. Podane do pasz mają na celu poprawę produktywności zwierząt oraz jakości żywności z nich pochodzącej. Zawartość oraz rodzaj bioaktywnych związków występujących w fitobiotykach jest różny w zależności od: stadium dojrzałości rośliny, organów roślinnych, z których są pozyskiwane, a także położenia geograficznego czy warunków glebowo-klimatycznych w których dane rośliny bytowały (Windisch i in., 2008).

W literaturze można znaleźć także pojęcie fitoncydów, które zostało po raz pierwszy wprowadzone pod koniec lat 20 XX wieku przez Borysa Pietrowicza Tokina. Uczestniczył on w pracach dotyczących leczenia trudno gojących się zakażonych ran oraz chorób układu pokarmowego wywoływanych przez bakterie i pierwotniaki za pomocą wyciągów roślinnych (Найка в Сибири, 2015). Pojęcia te występują w literaturze zamiennie i można uznać, że są one tożsame ze sobą.

Fitoncydy są substancjami wydzielanymi przez rośliny wyższe do ich ochrony przed patogenami środowiska. Działają bójczo lub osłabiają aktywność życiową bakterii, pierwotniaków i grzybów, bywają także wykorzystywane do produkcji leków. Są one syntetyzowane przez rośliny w celu zapewnienia im ochrony przed patogenami mają one także działanie przeciwutleniające chroniące rośliny przed działaniem stresu oksydacyjnego (Tsao i Deng, 2004).

Rośliny wyższe jako ewolucyjnie młodsze o 80-100 mln lat od grzybów, cechują się wytworzeniem doskonalszych mechanizmów obronnych i szeregiem dodatkowych cech mogących oddziaływać na produktywność i poprawę zdrowotności zwierząt.

Fitobiotyki można podzielić na sześć kategorii: związki fenolowe, alkaloidy, fitosterole, karotenoidy, związki zawierające azot i związki siarkoorganiczne (Liu, 2004).

Zaobserwowano szerokie spektrum działania substancji fitobiotycznych, które można podzielić na działanie przeciwdrobnoustrojowe, stymulujące działanie układu pokarmowego, działanie przeciwutleniające i przeciwzapalne (Rafeeq i in., 2023).

W licznych badaniach udowodniono działanie bójcze substancji fenolowych i siarkoorganicznych na bakterie. Wykazano, że mieszaniny ziół i ekstraktów ziołowych skutecznie redukują ilość *C. perfringens*, *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni*, *E. coli* i *Staphylococcus aureus* (Hussein i in., 2020; Iwiński i in., 2022; Mehdizageh i in., 2022; Senthamil Padian i in., 2021), przy czym działanie przeciwdrobnoustrojowe jest zależne od lokalizacji funkcyjnych grup alkilowych i hydroksylowych (Yang i in., 2015). Niektóre z powszechnie występujących terpenoidów takie jak karwakol czy tymol mają podobne działanie na drobnoustroje, ale ich działanie na bakterie gram dodatnie i gram ujemne różni się w zależności od lokalizacji jednej lub więcej grup funkcyjnych w ich cząsteczkach (Lambert i in., 2001). Jednym z sugerowanych mechanizmów działania przeciwbakteryjnego jest przenikanie przez błonę komórkową patogenów hydrofobowych olejków eterycznych, co prowadzi do dezintegracji struktur błonowych i wycieku jonów na zewnątrz komórki (Burt, 2004). Ich wysoką skuteczność przeciwbakteryjną *in vivo* przeciwko *E. coli* oraz *C. perfringens* wykazały badania przeprowadzone na kurczętach brojlerach (Mitsch i in., 2004).

Wyciągi roślinne wykazują także skuteczne działanie przeciwko pierwotniakom *Eimeria* powodującym u kurcząt brojlerów występowanie kokcydiozy (Habibi i in., 2016). W badaniach *in vitro* mieszaniny kurkuminy, karwakolu i ekstraktu z *Echinacea purpurea* wykazano znaczne wyhamowanie inwazji komórek nabłonka jelitowego przez sporozycy *E. tenella* (Burt i in., 2013), także silne działanie przeciwko temu

pierwotniakowi miało zastosowanie allicyny (Alnassan i in., 2015), która jest siarkoorganicznym związkiem występującym min. w *Allium sativum* i *Allium cepa*. Zarówno mieszanina tymolu, karwakuolu i saponin (Felici i in., 2020) jak i olejków eterycznych czosnku i oregano (Sidiropoulou i in., 2020), miały silny efekt przeciwkokcydiozowy, co pokazuje dużą efektywność stosowania mieszanin substancji pochodzących z różnych źródeł roślinnych.

Substancje fitobiotyczne mają działanie przeciwutleniające, które następuje poprzez wychwytywanie wolnych rodników, zapobieganie peroksydacji lipidów i z rzadka chelatowanie jonów metali (Miguel, 2010). Zastosowanie produktów z ziół zawierających substancje fenolowe oraz olejki eteryczne wpływa na poprawę stabilności oksydacyjnej mięsa drobiowego (Giannenas i in., 2005), efekt ten działa prawdopodobnie synergistycznie z zastosowaniem organicznych form selenu (Konkol i in., 2021).

Niektóre z substancji fitobiotycznych były stosowane już od wieków jako środki przeciwzapalne. Przykładem takiej substancji jest olejek eteryczny z rumianku, który miał łagodzić objawy związane z egzemą, zapaleniem skóry i podrażnieniami (Kamatou i Viljoen, 2010). Silne działanie przeciwzapalne mają także występujące w *Origanum* spp. kwas rozmarynowy, kwas oleanolowy i kwas ursolowy (Shen i in., 2010). Także olejki eteryczne innych roślin takich jak rozmaryn, lawenda czy eukaliptus oraz części roślin takich jak mirra, goździk czy sosna są stosowane w preparatach przeciwzapalnych (Darsham i Doreswamug, 2004).

Produkty fitobiotyczne mają korzystne działanie na funkcjonowanie przewodu pokarmowego. Część wyciągów roślinnych i ich ekstraktów ma działanie spazmolityczne i przeczyszczające (Chrubasik, Pittler i Roufogalis, 2005) inne z kolei stymulują wydzielanie śliny czy żółci oraz poprawiają aktywność enzymatyczną (Platel i Srinivasan, 2004). Wykazano, że aktywność *in vitro* lipazy oraz amylazy trzustkowej jest podwyższona w przypadku kontaktu z ekstraktami pochodzenia roślinnego (Rao, Platel i Srinivasan, 2003). Wzbogacenie diety kurcząt brojlerów w olejki eteryczne zwiększa aktywność trypsyny, maltazy i amylazy trzustkowej (Jang i in., 2007). Poprawa funkcjonowania przewodu pokarmowego ma pozytywny wpływ na przyrosty uzyskiwane przez ptaki.

3. Cel pracy

Celem niniejszej pracy było opracowanie i sprawdzenie skuteczności preparatu opartego o naturalne składniki roślinne o działaniu fitobiotycznym w profilaktyce odchowu kurcząt brojlerów.

Hipotezy:

1. zastosowanie preparatu powinno wpłynąć korzystnie na budowę morfologiczną jelita cienkiego - zwiększenie powierzchni i długości kosmków błony śluzowej jelita cienkiego;
2. zoptymalizowany prototyp preparatu powinien wykazać się korzystnym wpływem na status immunologiczny migdałka jelitowego ptaków;
3. zastosowanie opracowanego preparatu w żywieniu kurcząt brojlerów powinno istotny sposób poprawić wynik produkcyjne uzyskiwane podczas odchowu.
4. Preparat ten nie będzie miał negatywnego wpływu na cechy sensoryczne mięsa pozyskiwanego od kurcząt.

4. Materiały i metody

4.1. Formulacja prototypów preparatów fitobiotycznych

Zastosowane preparaty fitnocydowe stanowią kompozycję mikronizowanych ziół lub ich wyciągów i perkolatów. Dobór surowców i ich proporcja, został przeprowadzony w oparciu o dostępną literaturę oraz doświadczenia własne firmy Adifeed.

Wysuszone surowce zielone zostały poddane procesowi redukcji średnicy cząstek materiału do wielkości kilku mikrometrów. Ma to na celu poprawę rozpuszczalności i przyswajalności substancji zawartych w roślinach. Mikronizacja surowców roślinnych umożliwia rozerwanie ścian komórkowych, co z kolei ułatwia uwalnianie substancji aktywnych podczas hydrolizy przez enzymy trawienne. Jest to szczególnie istotne dla zwierząt monogastycznych, które nie posiadają zdolności trawienia celulozy znajdującej się w ścianach komórkowych. W miarę trawienia składników tłuszczowych, lipofilne substancje roślinne będą stopniowo uwalniane w różnych częściach przewodu pokarmowego.

Prototyp 1 został wytworzony z zastosowaniem opatentowanej technologii adiPHAG, która pozwala na uzyskanie stabilnej i bardzo skutecznej emulsji micelarnej w dwunastnicy. Dzięki temu możliwe jest tworzenie kompleksowych fitoncydów metaloorganicznych. W wyniku fotodynamizacji i wiązania aktywnych form tlenu, fitoncydy otrzymują postać estrów, oksydów terpenoidowych, epitenków oraz ozonianów. Jednorodna struktura fizykochemiczne podłoża ma na celu równomierne rozprowadzenie aktywnych substancji w mieszanka w których zostanie zastosowany preparat dodatkowo zapewniając stabilizację oraz ochronę składników aktywnych, a także stopniowe uwalnianie ich w przewodzie pokarmowym.

Zarówno prototyp 2, jak i preparat będący już w komercyjnym użyciu, zostały opracowane na bazie składników roślinnych, które zostały zmikronizowane i naniesione na lipidowe podłoże, co zapewnia stabilność tych składników i stopniowe uwalnianie substancji roślinnych w różnych częściach układu pokarmowego. Zastosowanie oleju palmowego w połączeniu z siarczanem żelaza pomaga w utrzymaniu stabilności składników lipofilowych.

Zastosowano następujące składy preparatów:

Grupa N:

Komercyjny preparat dostępny na rynku użyty w grupie kontroli pozytywnej.

Skład:

Produkty przetwarzania przypraw korzennych i ziołowych:

Capsicum annuum L. var. Minimum (Miller) Heiser, Sinapis alba L., Curcuma longa L., Saponaria officinalis L., Acorus calamus L.

Materiały paszowe: olej i tłuszcz palmowy (utwardzony), siarczan żelaza jednowodny w przeliczeniu na Fe 690 mg/kg

Dodatki sensoryczne: tymol

Grupa A i B:

Prototyp 1 preparatu fitoncydowego

W skład preparatu wchodziły 4 składniki fitoncydowe.

Skład:

Salicylan metylu, mentol, olejek anyżowy, olejek eukaliptusowy

Substancje te występowały w formie schelatowanej, następnie poddawano je ozonowaniu. Pod wpływem procesu ozonowania powstały nadtlenki, tlenki, ozonki, alkaloidy terpenowe o silnych właściwościach bakteriobójczych.

Grupa C:

Prototyp 2 preparatu fitoncydowego

Skład:

Produkty przetwarzania przypraw korzennych i ziołowych:

Sinapis alba L., Acorus calamus L., Hedera helix L., Curcuma longa L.

Materiały paszowe: olej i tłuszcz roślinny palmowy (utwardzony), siarczan żelaza jednowodny w przeliczeniu na Fe 4125 mg/kg, octan cynku dwuwodny w przeliczeniu na Zn 4000 mg/kg

Dodatki sensoryczne: tymol i mentol.

4.2. Badania na kurczętach brojlerach

4.2.1. Układ doświadczenia

Badania przeprowadzono w Stacji Badawczo-Dydaktycznej w Swojczycach we Wrocławiu, na 1280 kogutach brojlerach komercyjnej linii Ross 308 (Aviagen Group). Zostały one dostarczone z wylęgarni w dniu wyklucia, gdzie zostały zaszczepione szczepionką BRON w formie sprayu przeciwko IB.

Po dostarczeniu na obiekt doświadczalny kurczęta zostały dodatkowo zaszczepione szczepionką przeciwko kokcydiozie Evant (Laboratorios Hipra S.A.) w formie oprysku „grubą kroplą”.

Ptaki utrzymywano w hali odchowu ściółowego w 40 boksach o powierzchni 4 m² każdy, w każdym z boksów znajdowały się 32 ptaki.

Kurczęta podzielono na 5 grup doświadczalnych, po 8 powtórzeń, 32 ptaki w każdym powtórzeniu co stanowiło 256 ptaków w każdej grupie.

Grupa K – grupa kontrola negatywna,

Grupa N - grupa kontrola pozytywna, otrzymująca istniejący na rynku preparat ziołowy w ilości 100 g/tonę mieszanki pełnoporcjowej

Grupa A - grupa doświadczalna otrzymująca prototyp 1 preparatu w ilości 100 g/tonę mieszanki pełnoporcjowej

Grupa B - grupa doświadczalna otrzymująca prototyp 1 preparatu w ilości 200 g/tonę mieszanki pełnoporcjowej

Grupa C - grupa doświadczalna otrzymująca prototyp 2 preparatu w ilości 100 g/tonę mieszanki pełnoporcjowej

Doświadczenie trwało 35 dni.

4.2.2. Warunki zoohigieniczne

Ptaki utrzymywane były w warunkach ścisłej kontroli mikroklimatu. Temperatura w hali doświadczalnej regulowana była automatycznie zgodnie z zaleceniami dobrostanu. System grzewczy stanowiły nagrzewnice gazowe.

W celu odpowiedniego przygotowania obiektu jego nagrzewanie rozpoczęto 24 godziny przed przybyciem piskląt. W założonym czasie osiągnięto temperaturę powietrza 30°C (mierzona na wysokości pisklęcia w okolicy poidła), temperatura posadzki wynosiła 28°C. przy wilgotności względnej 71%. Następnie temperatura była obniżana według zaleceń firmy genetycznej:

Tabela 2. Zadana temperatura powietrza w okresie odchowu

Wiek (dni)	Temperatura powietrza (°C)
1	30
3	28
6	27
9	26
12	25
15	24
18	23
21	22
24	21
27	20

Różnica temperatury w obiekcie wynosiła $\pm 1^{\circ}\text{C}$ natomiast wilgotność utrzymywana była w przedziale 60-70% w okresie pierwszych 3 dób oraz 50-60% w pozostałym okresie.

Zastosowano rekomendowany przez Aviagen EPI program świetlny uwzględniając regulacje UE w dyrektywie 2007/43/EC.

Przez pierwsze 7 dni życia ptaki utrzymywane były w 6 godzinnym cyklu ciągłego światła z jednym 10 minutowym okresem ciemności na każdy cykl. Natężenie światła mierzone na wysokości ptaków wynosiło średnio 36 luksów.

W ósmej dobie do końca cyklu produkcyjnego zmieniono cykl na 18 godzin światła i 6 godzin ciemności przy średnim natężeniu światła 20 luksów mierzonym na wysokości ptaków.

4.2.3. Żywienie

Ptaki żywiono ad libitum mieszankami pełnoporcjowymi wyprodukowanymi w komercyjnej mieszalni pasz w oparciu o zalecenia żywieniowe producenta linii Ross 308 (Ross Nutrition Specifications, 2019) dla żywienia trzyfazowego oraz tabele chemicznego składu surowców oraz wartości odżywczych CVB Feed Table 2021.

Mieszanka paszowa miała formę sypką, jako urządzenie rozdrabniające użyty został młyn ośmiowalcowy. Strukturę fizyczną paszy dostosowano do wieku ptaków i została ona sprawdzona za pomocą wytrząsarki laboratoryjnej LPzE-2e (Multiserw) za pomocą sit o średnicy 200 mm oraz wielkości oczek: 1 mm, 2 mm, 3 mm, 4 mm.

Tabela 3. Procentowa zawartość frakcji sypkich w mieszankach paszowych

Mieszanka	<1 mm	1-2 mm	2-3 mm	3-4 mm	>4 mm
Starter	24,2%	58,6%	16,0%	1,1%	
Grower	23,2%	39,2%	33,0%	4,0%	0,5%
Finiszer	22,0%	34,1%	34,7%	7,6%	1,5%

Zawartość składników pokarmowych w surowcach paszowych oznaczono za pomocą analizy Weendeńskiej według standardowych metod (AOAC, 2016).

Zawartość energii metabolicznej w poszczególnych surowcach wyliczono ze wzoru

$$ME_{po} \text{ (kcal/kg)} = 4,31 \times DCP + 9,28 \times DCFAT + 4,14 \times DNFE$$

(zawartość DCP, DCFAT, DNFE podana w gramach na kilogram)

Gdzie:

DCP = białko ogólne x współczynnik strawności DCCP podany w tabelach CVB

DCFAT = tłuszcz surowy x współczynnik strawności DCCFAT podany w tabelach CVB

DNFE = bezazotowe związki wyciągowe x współczynnik strawności DCNFE podany w tabelach CVB

Zawartość bezazotowych związków wyciągowych policzono ze wzoru:

$$BZW = 1000 - (\text{wilgotność} + \text{popiół surowy} + \text{białko ogólne} + \text{tłuszcz surowy} + \text{włókno surowe})$$

(zawartość: wilgotności, popiołu surowego, białka ogólnego, tłuszczu surowego i włókna surowego podana w gramach na kilogram)

Zawartość skrobi oznaczono analitycznie zgodnie z Rozporządzeniem Komisji (WE) nr 121/2008 metodą polarymetryczną (zmodyfikowana metoda Ewersa).

Zawartość lizyny i metioniny oznaczono za pomocą analizatora aminokwasów po 22 godzinnej hydrolizie 6 molowym kwasem solnym w temperaturze 160°C. Dodatkowo próbki do analizy poziomu metioniny zostały przed hydrolizą utlenione nadtlakiem wodoru oraz kwasem nadmanganowym, zgodnie z metodyką określoną w Rozporządzeniu Komisji (WE) nr 152/2009 z dn. 27.01.2009 r.

Zawartość aminokwasów strawnych jelitowo wyliczono na podstawie iloczynu zawartości aminokwasów brutto i współczynnika strawności DC określonego w tabelach CVB.

Tabela 4. Skład surowcowy mieszanki paszowej typu starter

Surowiec	Udział [%]				
	Grupa K	Grupa N	Grupa A	Grupa B	Grupa C
Pszenica 12,5% b.o.	40,54	40,53	40,53	40,52	40,53
Poekstrakcyjna śruta sojowa 46% b.o.	31,00	31,00	31,00	31,00	31,00
Kukurydza 8% b.o.	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00
Olej sojowy	3,70	3,70	3,70	3,70	3,70
Kreda pastewna 37%	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50
Fosforan jednowapniowy	1,30	1,30	1,30	1,30	1,30
Siarczan lizyny	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45
Premiks mineralno-witaminowy	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40
Zakwaszacz płynny	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30
Sól paszowa	0,28	0,28	0,28	0,28	0,28
DL-Metionina 99%	0,26	0,26	0,26	0,26	0,26
Wodorowęglan sodu	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
L-Treonina 98%	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07
L-Walina 96%	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
Rovabio Advance Phy T	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Prototyp preparatu 1	-	-	0,01	0,02	-
Prototyp preparatu 2	-	-	-	-	0,01
Preparat komercyjny*	-	0,01	-	-	-

* Komercyjny preparat fitoncydowy Adicox AP firmy Adifeed

Tabela 5. Zawartość składników pokarmowych mieszanki paszowej typu starter

Surowiec		Udział [%]				
		Grupa K	Grupa N	Grupa A	Grupa B	Grupa C
Wilgotność	%	11,96	11,85	11,83	11,81	11,88
Popiół surowy	%	5,29	5,21	5,26	5,32	5,27
Tłuszcz surowy	%	5,34	5,40	5,32	5,37	5,40
Włókno surowe	%	2,51	2,59	2,48	2,39	2,44
Białko surowe	%	21,71	21,56	21,83	21,66	21,78
Skrobia	%	41,15	41,29	41,22	40,99	41,25
Lizyna	%	1,32	1,31	1,31	1,32	1,32
Metionina	%	0,57	0,57	0,57	0,58	0,57

Tabela 6. Skład surowcowy mieszanki paszowej typu grower

Surowiec	Udział [%]				
	Grupa K	Grupa N	Grupa A	Grupa B	Grupa C
Pszenica 12,5% b.o.	48,62	48,61	48,61	48,60	48,61
Poekstrakcyjna śruta sojowa 46% b.o.	27,40	27,40	27,40	27,40	27,40
Kukurydza 8% b.o.	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00
Olej sojowy	4,90	4,90	4,90	4,90	4,90
Kreda pastewna 37%	1,40	1,40	1,40	1,40	1,40
Fosforan jednowapniowy	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70
Siarczan lizyny	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44
Premiks mineralno-witaminowy	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40
Zakwaszacz płynny	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30
Sól paszowa	0,28	0,28	0,28	0,28	0,28
DL-Metionina 99%	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Wodorowęglan sodu	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
L-Treonina 98%	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09
L-Walina 96%	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
L-Arginina 98%	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Rovabio Advance Phy T	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Prototyp preparatu 1	-	-	0,01	0,02	-
Prototyp preparatu 2	-	-	-	-	0,01
Preparat komercyjny*	-	0,01	-	-	-

* Komercyjny preparat fitoncydowy Adicox AP firmy Adifeed

Tabela 7. Zawartość składników pokarmowych mieszanki paszowej typu grower

Surowiec		Udział [%]				
		Grupa K	Grupa N	Grupa A	Grupa B	Grupa C
Wilgotność	%	12,09	12,01	12,17	12,11	12,26
Popiół surowy	%	4,45	4,40	4,38	4,31	4,32
Tłuszcz surowy	%	6,26	6,31	6,35	6,19	6,28
Włókno surowe	%	3,16	3,11	3,08	3,10	3,09
Białko surowe	%	20,86	20,61	20,55	20,66	20,80
Skrobia	%	41,52	41,50	41,29	42,00	41,61
Lizyna	%	1,23	1,22	1,22	1,22	1,23
Metionina	%	0,55	0,54	0,54	0,54	0,55

Tabela 8. Skład surowcowy mieszanki paszowej typu finiszera

Surowiec	Udział [%]				
	Grupa K	Grupa N	Grupa A	Grupa B	Grupa C
Pszenvica 12,5% b.o.	53,49	53,48	53,48	53,47	53,48
Poekstrakcyjna śruta sojowa 46% b.o.	23,10	23,10	23,10	23,10	23,10
Kukurydza 8% b.o.	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00
Olej sojowy	5,10	5,10	5,10	5,10	5,10
Kreda pastewna 37%	1,10	1,10	1,10	1,10	1,10
Fosforan jednowapniowy	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40
Siarczan lizyny	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40
Premiks mineralno-witaminowy	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40
Zakwaszacz plynny	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30
Sól paszowa	0,26	0,26	0,26	0,26	0,26
DL-Metionina 99%	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
Wodorowęglan sodu	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
L-Treonina 98%	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07
L-Walina 96%	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
Rovabio Advance Phy T	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Prototyp preparatu 1	-	-	0,01	0,02	-
Prototyp preparatu 2	-	-	-	-	0,01
Preparat komercyjny*	-	0,01	-	-	-

* Komercyjny preparat fitoncydowy Adicox AP firmy Adifeed

Tabela 9. Zawartość składników pokarmowych mieszanki paszowej typu finiszer

Surowiec		Udział [%]				
		Grupa K	Grupa N	Grupa A	Grupa B	Grupa C
Wilgotność	%	11,02	11,12	11,24	11,18	11,29
Popiół surowy	%	4,12	4,30	4,22	4,11	4,00
Tłuszcz surowy	%	6,80	6,74	6,81	6,74	6,73
Włókno surowe	%	2,85	2,83	2,80	2,77	2,89
Białko surowe	%	19,17	19,54	19,79	18,99	19,22
Skrobia	%	44,94	45,43	44,01	45,11	44,94
Lizyna	%	1,09	1,11	1,10	1,07	1,11
Metionina	%	0,47	0,47	0,48	0,47	0,48

Tabela 10. Skład premiksu mineralno-witaminowego

Nazwa składnika odżywczego	Jednostka	Zawartość
Wapń	g/kg	212
Witamina A	j.m./kg	2 500 000
Witamina D₃	j.m./kg	1 250 000
Witamina E	mg/kg	13 000
Witamina K₃	mg/kg	800
Witamina B₁	mg/kg	800
Witamina B₂	mg/kg	2 000
Niacyna	mg/kg	12 500
Kwas pantotenowy	mg/kg	4 000
Witamina B₆	mg/kg	1 050
Witamina B₁₂	mg/kg	5 600
Biotyna	mcg/kg	58 000
Chlorek choliny	mg/kg	134 000
Kwas foliowy	mg/kg	440
Żelazo	mg/kg	12 500
Mangan	mg/kg	25 000
Miedź	mg/kg	5 000
Cynk	mg/kg	25 000
Jod	mg/kg	250
Selen	mg/kg	80
Przeciwutleniacz	mg/kg	5 000

4.2.4. Ocena parametrów produkcyjnych kurcząt brojlerów

W trakcie trwania doświadczenia mierzono następujące parametry produkcyjne ptaków: masa ciała, pobranie paszy, zużycie paszy, śmiertelność oraz europejski wskaźnik wydajności (EWW). W celu określenia masy ciała ptaków były one ważone w pierwszy dzień po przybyciu na obiekt doświadczalny oraz w 7, 14, 21, 28 i 35 dobie życia.

Pobranie paszy obliczono na podstawie określenia masy zadawanej codziennie paszy oraz zważeniu niedojadów na koniec dnia. Zużycie paszy obliczono dzieląc paszę spożytą łącznie w danym tygodniu przez masę ciała ptaków. Śmiertelność monitorowano przez okres trwania doświadczenia i została ona wyrażona jako % upadków w stosunku do ptaków przebywających na obiekcie.

Europejski wskaźnik wydajności (EWW) obliczono ze wzoru:

$$EWW = \frac{\text{średnia masa ciała (kg)} * \text{przeżywalność (\%)}}{\text{dni odchowu} * FCR} * 100\%$$

4.3. Analiza próbek mięsa

4.3.1. Analiza jakościowa mięsa

W 35 dniu badania, po jednym wybranym losowo ptaku z każdego boksu (8 kurcząt z każdej grupy) zostało uśmierconych zgodnie z Dyrektywą Parlamentu Europejskiego i Rady 2010/63/EU z dnia 22 września 2010 r. Ich mięśnie piersiowe oraz udowe pobrano do dalszej analizy.

Po rozdrobieniu próbek, zostały one podzielone na porcje o masie 50 g każda. Każda próbka została homogenizowana z 50 mL wody dejonizowanej i poddana wirowaniu przy 15 000 obr./min przez 10 minut w temperaturze 4°C (Beckman, J2-21). Nadnadtlenki były wykorzystywane do dalszego oznaczenia substancji reaktywnych z kwasem triobarbiturowym (TBARS) i wybranych śladów przeciwutleniaczy. Oznaczenie kwasu tiobarbiturowego (TBA) było przeprowadzane metodą kolorymetryczną, a absorbancja była mierzona przy 532 nm przy użyciu spektrofotometru UV-Vis model PharmaSpec 1700 (Shimadzu, Japonia), z wykorzystaniem metody opisanej przez Batsoglou et al. (1994). Wyniki wyrażono jako ilość malonaldehydu (MDA) w µmol na mL próbki.

Po 24 godzinach od pobrania materiału dokonano pomiaru pH używając miernika Orion 3-Star pH Benchtop Meter (Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, Massachusetts). Zdolność zatrzymywania wody przez mięśnie (WHC) badano metodą Grau-Hamm'a z modyfikacjami Szymański (1986). Próbki mięsa umieszczano na bibule filtracyjnej Whatmana (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) i dociskano blokiem metalowym o masie 2 kg przez 5 minut. Następnie zapakowano je w plastikowe torebki i poddano obróbce termicznej w gorącej wodzie w temperaturze 85°C lub 95°C. Wszystkie próbki mięsa podgrzewano i monitorowano za pomocą termopar do momentu osiągnięcia przez środek geometryczny temperatury 72°C. Ilość wilgoci pozostałej po gotowaniu w stosunku do zawartości wilgoci w oryginalnej próbce (sprasowanej i niegotowanej) została wykorzystana jako wskaźnik WHC. Procedura została powtórzona trzykrotnie dla każdej próbki.

Zakres zmian oksydacyjnych w mięsie oceniano 24 h po uboju metodą kwasu tiobarbiturowego (TBA) według zmodyfikowanej metody McDonalda i Hultina (1987) w próbkach mięsa schłodzonych w workach polietylenowych na lodzie 10 minut po uboju, a następnie zamrożonych w -20°C.

Po obróbce cieplnej, siła ścinania została zmierzona przy użyciu tekstrometru TA.XT.plus firmy Stable Micro Systems (Stable Micro Systems Ltd., Godalming, Wielka Brytania) oraz trójkątnego noża. Pomiar przeprowadzono na próbkach mięsa w formie kostek o boku 10 mm. Cięcie zostało wykonane poprzecznie do próbek. Prędkość przemieszczenia noża została ustawiona na poziomie 2 mm/s.

Wszystkie analizy wykonano w laboratorium Katedry Rozwoju Funkcjonalnych Produktów Żywnościowych, Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.

4.3.2. Analiza sensoryczna mięsa

Przeprowadzono również analizę sensoryczną mięsa z piersi i ud. Sześćdziesięciu czterech panelistów, wybranych losowo spośród pracowników i studentów uczelni, oceniało akceptowalność konsumencką wyglądu, barwy, zapachu, tekstury i smaku mięsa.

Analiza sensoryczna została przeprowadzona według w pełni randomizowanego schematu. Uczestnicy badania otrzymali próbki piersi i ud ugotowanych metodą *sous-vide* i zostali poproszeni o ocenę każdego parametru w skali od 1 do 5 (od najgorszego do najlepszego).

4.4. Analiza poziomu aktywności przeciwutleniającej prototypów

Zdolności do neutralizacji reaktywnych form tlenu - przy użyciu barwnego kationorodnika ABTS•+ (2,2'-azynobis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonian)) - zostały ocenione zgodnie z protokołem Jiménez-Escrig i wsp. (2003), z drobnymi zmianami tj. inkubacji mieszaniny 7 mmol ABTS z 2,45 mmol nadsiarczanu potasu przez co najmniej 12 godzin w celu wytworzenia aktywnego kationorodnika ABTS•+ (rozpuszczalnik reakcyjny). Następnie dodano ten roztwór reakcyjny do surowicy i inkubowano przez 20 minut w temperaturze pokojowej na 96-dołkowych płytach polistyrenowych (w ciemności). Absorbencję mierzono przy długości fali 730 nm za pomocą spektrofotometru mikroplótkowego Biotek EPOCH2 (BioTek Instruments, Inc., USA) i oprogramowania Gen5 (v. 3.11). Wyniki zostały wyrażone jako ekwiwalenty zdolności antyoksydacyjnej tej substancji (Trolox equivalents of antioxidant capacity; TEAC) na jednostkę objętości surowicy krwi (mmol/l). Każdą analizę przeprowadzono trzykrotnie.

Metodą FRAP (ferric reducing antioxidant power) oceniono zdolność redukcji jonów żelaza trójwartościowego do formy dwuwartościowej, tworząc ciemnogrnatowy kompleks Fe(II)-2,4,6-tripirydylo-S-tiazyny (Fe(II)-TPTZ) w obecności substancji o działaniu przeciwutleniającym, zgodnie z procedurą opisaną przez Benzie i Strain (1996). Próbkę surowicy krwi zostały inkubowane na 96-dołkowych płytach polistyrenowych w temperaturze 37 °C (w ciemności) w obecności mieszaniny reakcyjnej FRAP (10 mmol TPTZ w 40 mmol HCl + 20 mmol chlorku żelaza, sześciowodnego + 0,1 mol bufora octanowego, pH = 3.60). Absorbencję końcową zmierzono po 30 minutach inkubacji przy $\lambda = 595$ nm za pomocą spektrofotometru mikroplótkowego Biotek EPOCH2 (BioTek Instruments, Inc., USA). Każdą analizę przeprowadzono trzykrotnie, a wyniki wyrażono jako ilości antyoksydacyjne Troloxu (TEAC) na litr surowicy, przeliczając na właściwą jednostkę w badanych preparatach (ug/mL).

4.5. Ocena histologiczna i histometryczna poszczególnych odcinków jelita cienkiego

Z kurcząt uśmierconych zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale 4.3.1. pobrano próbki jelit (dwunastnica, jelito kręte i biodrowe) do wykonania oceny histologicznej oraz histometrycznej.

Próbki jelit zostały zbadane pod kątem stosunku długości do szerokości kosmków jelitowych, głębokości krypt, grubości ścian poszczególnych odcinków jelita oraz występowania ewentualnych zmian patologicznych.

Zmierzono wysokość i szerokość kosmków, głębokość krypt, obliczając stosunek wysokości do szerokości oraz pole powierzchni kosmków (wzór: $2 \pi \times (W/2) \times L$ gdzie W-szerokość kosmka; L-długość kosmka) w 7 kolejnych, nienaruszonych kosmkach z odniesieniem do nienaruszonej blaszki właściwej.

Próbki jelit zostały utrwalone w 4% zbuforowanej formalinie, zatopione w blokach parafinowych, a następnie uzyskano z nich skrawki parafinowe o grubości 5 μm przy użyciu mikrotomu rotacyjnego Hyrax M25 (Carl Zeiss, Oberkochen, Niemcy). Skrawki zostały następnie wybarwione hematoksyliną i eozyną (HE), a przekrój poprzeczny jelit zanalizowany przy użyciu mikroskopu optycznego (Axio Scope® A1; Carl Zeiss, Oberkochen, Niemcy). Wszystkie niezbędne analizy przeprowadzono w Laboratorium Katedry Biostruktury i Fizjologii Zwierząt Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.

4.6. Ocena immunohistochemiczna migdałków jelita ślepego

Pobrane próbki migdałków jelita ślepego utrwalono w 4% paraformaldehydzie buforowanym 0,1 M buforem fosforanowym o pH 7,4 przez 60 minut. Następnie próbki przepłukano 0,1 M buforem fosforanowym i infiltrowano buforowaną 30% sacharozą. Próbki zostały zamrożone w kriostacie (Leica CM1850, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Niemcy) i pocięto na skrawki tkankowe o grubości 10 μm , które wysuszono powietrzem i przechowywano do momentu użycia w temperaturze $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Wszystkie szkiełka zostały zakropione monoklonalnymi mysimi przeciwciałami (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA) skierowanym przeciwko kurzym antygenom Bu-1, CD4 i CD8 α . Wiązania niespecyficzne blokowano przez wstępną inkubację z rozcieńczalnikiem przeciwciał ze składnikiem redukującym tło przez 15 minut (Dako, Glostrup, Dania). Skrawki inkubowano przez 60 minut z pierwszorzędowymi przeciwciałami w wilgotnej komorze w temperaturze pokojowej. Następnie szkiełka płukano 0,01 M buforem fosforanowym i wizualizowano przy użyciu LSAB+ System HRP (Dako) z DAB+ (Dako).

Limfocyty B wizualizowano za pomocą przeciwciał monoklonalnych przeciwko kurczemu antygenowi Bu-1 (Clone AV 20, chB6, 1:500) (Southern Biotech, Birmingham, AL, 100 USA), które rozpoznają monomorficzną determinantę markera Bu-1 alloantygeny związanego z limfocytami B obu linii RPL 6 (Bu-1a) i 7 (Bu-1b) zimbredowanych kurcząt (Rothwell et al. 1996; Igyártó et al. 2008).

Subpopulację limfocytów T wykrywano przy użyciu przeciwciał anti-CD4 (clone CT-4, 1:300, Southern Biotech) i anti-CD-8 α (clone CT-8, 1:200, Southern Biotech). Antygen CD4 znajduje się przede wszystkim na limfocytach pomocniczych T (Th), a CD8 α jest typowym markerem cytotoksycznych limfocytów T (Tc) i komórek NK. Materiał zamontowano w medium montażowym Euparal (Roth GmbH, Karlsruhe, Niemcy).

4.7. Statystyczna analiza wyników

W celu standaryzacji danych przeprowadzono test Grubbsa, który pozwolił na identyfikację i odrzucenie obserwacji odstających.

Wyniki zostały przedstawione jako średnia arytmetyczna i błąd standardowy średniej (SEM). Dla parametrów produkcyjnych kurcząt (masa ciała, przyrosty dobowe, pobranie paszy, zużycie paszy, śmiertelność, EWW), parametrów jakościowych mięsa (barwa, masa mięśni przed i po pieczeniu, wyciek termiczny, pH, siła cięcia, TBARS), wyników analizy sensorycznej mięsa (zapach, barwa, wygląd, kruchość, smak) oraz parametrów histometrycznych poszczególnych odcinków jelita cienkiego, normalność rozkładu danych oceniono przy pomocy testu Shapiro-Wilka.

Jeśli rozkład danych zbliżony był do rozkładu normalnego przeprowadzono jednoczynnikową analizę wariancji, gdzie różnice pomiędzy grupami określono używając testu Tukey'a. Jeśli rozkład danych nie był zbliżony do rozkładu normalnego przeprowadzono test Kruskalla-Wallisa. Różnice uznano za istotne statystycznie gdy $P \leq 0,05$.

Wszystkie dane zostały analizowane przy użyciu programu Statistica ver. 13.1.

5. Wyniki i dyskusja

5.1. Wyniki produkcyjne tuczu kurcząt brojlerów

Masa ciała

W badaniu wykazano różnice istotne statystycznie w masie ciała uzyskanej przez ptaki. W pierwszym tygodniu wartość ta różniła się pomiędzy grupami B i N, a C. W grupie C masa ciała w 7 dniu życia była najniższa. W 14 dniu nie wykazano istotnych różnic w masie ciała ptaków w poszczególnych grupach. W 21 dobie życia grupa C miała masę istotnie niższą od grupy K (kontrolnej). W 28 dniu nie zaobserwowano istotnych różnic, jednak wystąpił trend w którym grupa C mocno zbliżyła się masą ciała do pozostałych grup. Finalnie w 35 dobie ptaki istotnie różniły się masą ciała w grupach A i B, a grupami kontrolnymi K (negatywna) i N (pozytywna). Masa ciała ptaków w grupie C uplasowała się na poziomie pomiędzy masą grup A i B, a K i N. Należy zwrócić uwagę, że grupa C wykazywała najniższą masę ciała od 7 do 21 dnia, by następnie dorównała ona grupom kontrolnym.

Przyrosty dobowe

Istotne różnice w przyrostach dobowych wykazane zostały w 7 dniu pomiędzy kurczętami z grup B i N oraz C. Ptaki w grupach B i N przyrastały w szybszym tempie w stosunku do grupy C. W pozostałych pomiarach nie wykazano różnic istotnych statystycznie.

Zużycie paszy

Różnice istotne statystycznie zaobserwowano w 7 dniu pomiędzy grupą B i pozostałymi grupami. Współczynnik ten był najniższy dla grupy B. Następnie do końca trwania eksperymentu nie zostały wykazane żadne istotne różnice pomiędzy grupami.

Pobranie paszy

Wykazano istotne różnice w pobraniu paszy w 21 dniu pomiędzy grupami C i K. Ptaki z grupy C pobrały nieco mniej paszy. Kolejne różnice wykazano w 35 dniu pomiędzy grupami B, a K i N, gdzie ptaki z grupy B przyrastały zdecydowanie lepiej niż grupy kontroli negatywnej i pozytywnej.

Należy zauważyć, że ptaki ze wszystkich grup uzyskały wyniki znacznie lepsze niż cele sugerowane przez producenta materiału genetycznego, który w 35 dobie wskazuje na średnią masę ciała 2296 g, FCR na poziomie 1,399 oraz przyrosty dobowe 100 g (Aviagen, 2022). Ptaki osiągnęły pożądaną masę ubojową już wieku 35 dni. Wpływ na to miały optymalne warunki panujące w obiekcie doświadczalnym oraz prawidłowo zbilansowana mieszanka paszowa, a także brak dodatkowych stresorów środowiskowych.

Stosunkowo wysoka śmiertelność ptaków związana była z podwyższonymi upadkami w pierwszym tygodniu życia, wśród padniętych sztuk występowały pisklęta, które częściowo powinny zostać poddane wcześniejszej selekcji na wylęgarni.

Syntetyczny współczynnik EWW nie różnił się statystycznie pomiędzy grupami, choć w przypadku grup A i B wyniósł on ponad 500 punktów, co wskazuje na bardzo wysoki wynik efektywności chowu. W praktyce, jeśli parametr ten przewyższa 400 punktów wynik klasyfikuje się jako bardzo dobry.

Spośród wszystkich grup doświadczalnych najlepszy wynik produkcyjny uzyskały kurczęta z grupy B. Ich masa ciała w 35 dobie była znacząco wyższa od masy ciała ptaków z grupy kontrolnej (o 99,5 g) przy współczynniku konwersji paszy na tym samym poziomie. Pomimo braku statystycznie istotnych różnic obserwowalny był trend wyższych przyrostów dobowych w stosunku do pozostałych grup doświadczalnych. Można domniemywać, że utrzymanie tak wysokiego przyrostu masy ciała wpłynęłoby na zwiększenie różnic pomiędzy grupami w przypadku wydłużenia okresu tuczu. Efekt działania preparatu widoczny był po pierwszych 7 dniach trwania doświadczenia, co wskazuje na to, że działa on szybciej od preparatów wyprodukowanych ze zmikronizowanych ziół, które podawane były w grupach C oraz N.

Potwierdzenie uzyskanych wyników można znaleźć w dostępnej literaturze opisującej poszczególne składniki prototypu 1 (Salicylan metylu, mentol, olejek anyżowy, olejek eukaliptusowy) i ich wpływ na wyniki produkcyjne kurcząt brojlerów. Spodziewać się można synergistycznego działania tych związków, które powinno spotęgować efekt działania wieloskładnikowego preparatu fitoncydowego.

W literaturze dostępne są badania, które wskazują na pozytywne działanie dodatku mentolu na uzyskiwane wyniki produkcyjne. Masa ciała i jej przyrost zwiększały się wraz z wzrostem stężeń mentolu w trakcie trwania eksperymentu. Ponadto, pobranie paszy zwiększało się w sposób liniowy wraz ze wzrostem stężeń mentolu i skutkowało liniowymi poprawami wskaźników konwersji paszy (Abdel-Wareth i in., 2019). W

badaniu tym prócz skuteczności działania tej substancji wykazano także efekt dawkozależny.

Salicylan metylu zastosowany w paszy dla prosiąt wpływał korzystnie na parametry przyrostu tych zwierząt (Wei i in., 2021). Wykazano także, że dodatek proszku z eukaliptusa miał dodatni wpływ na wyniki produkcyjne kurcząt i był on porównywalny do wyniku uzyskanego u ptaków żywionych paszą z dodatkiem wirginiamcyny, będącej antybiotykowym stymulatorem wzrostu (Mashayekhi i in., 2018). Olejek anyżowy zastosowany w mieszance paszowej dla kurcząt brojlerów powodował 15% większy przyrost masy ciała ptaków i poprawę konwersji paszy względem grupy kontrolnej oraz grupy z zawierającej avilamycynę zaliczaną do antybiotykowych stymulatorów wzrostu (Ciftci i in., 2005).

Wyniki uzyskane w grupach C oraz N, gdzie zastosowano preparaty oparte o zmikronizowane surowce roślinne znajdują potwierdzenie w literaturze. Zastosowanie komercyjnej mieszanki ziół opartej o *Capsicum annuum*, *Sinapis alba*, *Curcuma longa* i *Acorus calamus* nie wpłynęło na wyniki produkcyjne kurcząt brojlerów wykazując jednak działanie redukujące śmiertelność ptaków względem pozostałych grup doświadczalnych (Łukasiewicz M. i in., 2014). Literatura opisuje działanie dodatku tych ziół do paszy jako środków prewencji kokcydiozy. Szczególnie wykazano pozytywny wpływ *Curcuma longa* na zakażenie *E. tenella*, *E. acervulina* i *E. maxima* (Abbas i in., 2010; Aljedaie i Al-Malki, 2020; Khalafalla i in., 2011) oraz mieszanki *Capsicum annuum* z *Curcuma longa* na *E. acervulina* i *E. tenella* (Lee i in., 2009). W badaniach tych pozytywny wpływ na wyniki produkcyjne ptaków powiązany był z efektem kokcydiostatycznym tych preparatów ziołowych.

W przeprowadzonym eksperymencie ptaki nie były narażone na dużą presję kokcydiozy dodatkowo, aby ograniczyć wpływ tego czynnika na wyniki doświadczenia zostały one zaszczepione przeciwko tej jednostce chorobowej. W związku z tym preparaty ukierunkowane na zwalczanie kokcydiozy nie miały możliwości wykazania pełnego spektrum działania.

Wykazano natomiast pożądane i dawkozależne działanie prototypu 1 jako odpowiednika antybiotykowego stymulatora wzrostu. Zastosowanie wyciągów ziołowych z dużym prawdopodobieństwem wykazuje szybsze działania niż użycie zmikronizowanych ziół, co można było zaobserwować po pierwszym tygodniu chowu.

Tabela 11 Wyniki produkcyjne tuczu kurcząt brojlerów

Parametr	A	B	C	K	N	SEM	Wartość-P
Dzień 7							
Masa ciała (g)	191,0	198,6 ^a	186,6 ^b	192,4	197,3 ^a	1,456	0,050
Przyrosty dobowe (g)	21,57	22,65 ^a	20,95 ^b	21,77	22,47 ^a	0,208	0,050
Pobranie paszy (g)	175,6	176,1	176,6	176,5	176,5	0,314	0,829
Zużycie paszy	0,920 ^{ab}	0,888 ^a	0,947 ^b	0,920 ^{ab}	0,895 ^{ab}	0,006	0,043
Dzień 14							
Masa ciała (g)	503,6	514,5	494,8	510,3	516,6	3,205	0,158
Przyrosty dobowe (g)	44,92	45,56	44,12	45,47	45,89	0,339	0,527
Pobranie paszy (g)	552,5	560,2	557,5	560,1	564,2	1,343	0,074
Zużycie paszy	1,098	1,089	1,129	1,098	1,092	0,005	0,110
Dzień 21							
Masa ciała (g)	1029,5 ^{ab}	1048,9 ^{ab}	1010,7 ^a	1050,4 ^b	1039,4 ^{ab}	4,786	0,039
Przyrosty dobowe (g)	75,67	77,01	73,79	77,18	75,64	0,712	0,594
Pobranie paszy (g)	1193,9 ^{ab}	1213,6 ^{ab}	1192,3 ^a	1222,7 ^b	1210,6 ^{ab}	3,628	0,022
Zużycie paszy	1,159	1,157	1,180	1,164	1,165	0,003	0,191
Dzień 28							
Masa ciała (g)	1746,1	1744,3	1740,5	1739,3	1736,6	7,783	0,996
Przyrosty dobowe (g)	102,4	101,1	104,4	98,4	100,2	1,112	0,520
Pobranie paszy (g)	2256,3	2253,4	2255,3	2251,0	2256,9	2,894	0,973
Zużycie paszy	1,292	1,292	1,297	1,294	1,300	0,004	0,983
Dzień 35							
Masa ciała (g)	2611,2 ^a	2629,5 ^a	2574,4	2530,0 ^b	2518,7 ^b	14,73	0,050
Przyrosty dobowe (g)	123,5	127,7	119,3	116,4	111,7	1,968	0,083
Pobranie paszy (g)	3657,9 ^{ab}	3719,4 ^a	3647,1 ^{ab}	3581,6 ^b	3571,3 ^b	16,19	0,014
Zużycie paszy	1,400	1,415	1,416	1,415	1,418	0,003	0,506
Śmiertelność (%)	4,642	4,285	5,357	4,642	3,214	-	-
EWW	513	512	494	496	495	4,768	0,521

5.2. Wyniki analiz jakościowej i sensorycznej mięsa

W przeprowadzonych wcześniej badaniach naukowych wykazano związek pomiędzy składowymi barwy $L^*a^*b^*$ mięsa drobiowego, a jego właściwościami technologicznymi. Podjęto badania nad możliwością wykorzystania barwy mięśni piersiowych i udowych kurcząt brojlerów do szacowania jakości technologicznej mięsa. Pomimo uzyskania istotnych korelacji pomiędzy składowymi barwy współczynniki determinacji były zbyt niskie aby metoda ta miała praktyczne zastosowanie (Słowiński M. i in., 2005).

W innych badaniach wykazano jednak, że zdolność mięsa do zatrzymywania wody oraz utraty masy podczas procesu termicznego, a także kruchość mięśni piersiowych drobiu, są powiązane z jego kolorystyką. Zaobserwowano powiązania między jasnością barwy (wartość L^*) mięsa z indyka, a jego zdolnością do zatrzymywania wody i poziomem pH (McCurdy i in. 1996).

Formulacja mieszanki paszowej dla drobiu oraz konkretne składniki wchodzące w jej skład, takie jak różne substancje roślinne i dodatki pełniące funkcje przeciwutleniaczy, substancji przeciwbakteryjnych i aromatyzatorów, mają istotny wpływ na ostateczny kolor mięsa drobiowego (Pokoo-Aikins i in., 2022). Dodatkowo, stosowanie różnych składników roślinnych i dodatków jako przeciwutleniaczy, substancji przeciwbakteryjnych i aromatyzatorów w mięsie drobiowym odgrywa istotną rolę w kształtowaniu jego ostatecznego koloru (Wideman i in., 2016). Te zmiany można przypisać nie tylko zdolności niektórych związków do działania jako naturalne barwniki, ale także ich zdolności antyoksydacyjnej, która może wpływać na procesy utleniania i, co za tym idzie, na kolor końcowego produktu w trakcie przechowywania (Mancini i in., 2005).

Wyniki pomiaru barwy mięsa w przeprowadzonym eksperymencie wykazały różnicę istotną statystycznie w parametrze a^* dla mięśni nóg pomiędzy grupami K i N, w parametrze b^* dla mięśni piersiowych pomiędzy grupami K i N, a także w parametrze L^* dla mięśni nóg pomiędzy grupą C, a grupami A, B i N.

Wyniki dotyczące wartości a^* wskazującej na nasycenie kolorem czerwonym, znacznie różniły się pomiędzy grupą kontrolną, a grupą zawierającą komercyjnie dostępny preparat fitoncydowy. Wyższa wartość grupy N wskazuje istotny wpływ dodatku preparatu złożonego ze zmikronizowanych ziół na wybarwienie mięśni ud.

Mniej czerwona barwa mięsa wiąże się zazwyczaj z niższym poziomem oksymyoglobiny. Oksymyoglobina jest odpowiedzialna za czerwoność mięsa, a proces utleniania mioglobiny do metmyoglobiny prowadzi do zmniejszenia intensywności czerwieni mięsa (Khan i in., 2021).

Parametr żółtości b^* jest dosyć istotny w przypadku mięsa drobiowego, ponieważ głęboki kolor skóry w odcieniach żółci jest preferowany przez pewne grupy konsumentów (Castañeda i in., 2005). W tym przypadku także grupa N w której podawano komercyjny preparat wykazała się intensywniejszą barwą mięśni udowych.

Można domniemywać, że wpływ na wybarwienie mięsa mógł mieć jeden z głównych składników preparatu, którym jest *Capsicum annuum*. Roślina ta zawiera duże ilości czerwonych barwników w postaci kapsantyny, zeaksantyny, β -kryptoksantyny i β -karotenu (Kim S., Park J., Hwang I.K., 2008). Doświadczenia w których sproszkowana *Capsicum Annum* wykorzystywana była jako alternatywa dla substancji antybiotycznych potwierdzają możliwość jej wpływu na barwę mięsa (El-Deek i in., 2012).

Trawa cytrynowa oraz mięta pieprzowa podawane w formie suszonej do paszy dla brojlerów poprawiały parametr a^* (Rahman i in., 2022) sprawiając, że zarówno mięso udowe jak i piersiowe miały wyraźnie lepsze wybarwienie.

Zazwyczaj, wyższe wartości parametru jasności L^* są związane z większym procesem utleniania, ale w opublikowanych badaniach zauważono, że prawdopodobnie oryginalny kolor ekstraktu i poszczególne składniki mogły mieć także wpływ na ten wynik (Ahn i in., 2007; Gao i in., 2021). Wyraźne różnice występują pomiędzy grupami, w których podawane były różne preparaty, co może potwierdzać zależność parametru L ze składem mieszaniny fitoncydowej.

Zmianę wszystkich składowych parametrów barwnych mięsa uzyskano także w doświadczeniu wykorzystującym naturalne ekstrakty z *Macleaya cordata*. Jasność (L^*), czerwoność (a^*) i żółtość (b^*) mięsa piersiowego zostały istotnie zwiększone wraz ze wzrostem dawek substancji fitobiotycznych w paszy (Khatun i in., 2023).

Z kolei zastosowanie innego suszu roślinnego z *Rhus Coriaria* w paszy dla przepiórek nie wpłynęło na zmianę barwy mięsa (Kırar i in., 2020), co zapewne związane jest ze składem wymienionej rośliny która w żadnych swoich częściach nie posiada oznaczonych substancji barwiących (Abu-Reidah i in., 2015).

W wielu przypadkach występuje wpływ substancji pochodzenia ziołowego na parametry barwy mięsa poprawiając jego wybarwienie, co w przypadku mięsa drobiowego uznawane jest za czynnik korzystny. Najczęściej występował on podczas

podawania produktów złożonych z suszonych ziół, a nie ich ekstraktów. Wiele roślin zawiera naturalne substancje barwiące, które wykorzystywane są także w przemyśle drobiarskim właśnie do barwienia tuszek lub żółtek jaj.

Tab. 12 Barwa mięsa

Mięśnie	Parametr	A	B	C	K	N	SEM	Wartość P
Piersiowe	L*	52,56	51,09	50,83	51,25	51,14	0,307	0,427
	a*	3,560	3,296	3,526	3,534	3,612	0,110	0,917
	b*	1,098 ^{ab}	1,323 ^{ab}	1,280 ^{ab}	0,835 ^a	1,860 ^b	0,117	0,032
Nóg	L*	50,59 ^b	50,62 ^b	54,22 ^a	53,19 ^{ab}	50,49 ^b	0,433	0,007
	a*	4,385 ^{ab}	4,230 ^{ab}	3,908 ^{ab}	3,544 ^a	4,526 ^b	0,136	0,035
	b*	1,179	2,256	2,512	1,399	1,618	0,201	0,169

W tabeli 2 pokazano wyniki masy mięsa przed i po pieczeniu oraz wycieku termicznego. Znaczenie określenia ilości wycieku termicznego jest istotne, gdyż przekazuje nam informacje na temat utraty soku mięśniowego (Rudy i in. 2014). Parametr ten odzwierciedla utratę masy mięsa podczas obróbki termicznej, dane te także umieszczono w tabeli.

W wykonanych analizach zauważono statystycznie istotne różnice w przypadku wycieku termicznego mięśni piersiowych pomiędzy grupami A i B. Wskazuje to na dawkozależny efekt działania pierwszego prototypu na ten parametr. Zastosowanie dwukrotnie większej dawki prototypu 1 znacznie zmniejszyło wartość tego parametru, co korzystnie wpłynęło na jakość mięsa fileta z piersi po obróbce termicznej

W przypadku mięśni nóg wystąpiła różnica istotna statystycznie dla wycieku termicznego pomiędzy grupami B i K, N. Zastosowanie prototypu pierwszego w podwójnej dawce wpłynęło na znaczne zmniejszenie tego parametru względem grupy kontrolnej oraz grupy, w której zastosowano istniejący na rynku komercyjny preparat ziołowy wykazując działanie analogiczne jak w przypadku mięśnia piersiowego.

Podobne wyniki uzyskano przy zastosowaniu mieszaniny związków pochodzenia roślinnego o charakterze monoterpenoidów, fenylopropanoidów oraz trans-anetolu, 1,8-cyneolu i mentolu, gdzie w grupach doświadczalnych wyciek termiczny był

zdecydowanie niższy (Iwiński i in., 2023). Należy zwrócić uwagę, że testowana mieszanina zawierała podobne składniki do prototypu preparatu z grupy B.

Tab. 13 Masa mięśni przed i po pieczeniu oraz wyciek termiczny

Mięśnie	Parametr	A	B	C	K	N	SEM	Wartość P
Piersiowe	Masa przed pieczeniem (g)	258,0	260,0	280,0	258,6	233,4	7,110	0,383
	Masa po pieczeniu (g)	180,3	202,0	200,2	192,7	165,3	5,422	0,166
	Wyciek termiczny %	30,06 ^a	22,06 ^b	28,27 ^{ab}	25,80 ^{ab}	28,87 ^{ab}	4,520	0,025
Nóg	Masa przed pieczeniem (g)	237,8	236,5	249,0	251,2	229,1	5,237	0,683
	Masa po pieczeniu (g)	175,8	163,5	179,5	193,3	176,5	4,353	0,323
	Wyciek termiczny %	26,05 ^{ab}	30,96 ^a	27,78 ^{ab}	22,83 ^b	23,18 ^b	4,146	0,002

pH, siła cięcia i TBARS

Niektórzy autorzy zgłaszają istotne korelacje między wartością pH mięśni a jakością mięsa drobiowego (Fletcher, 1999; Van Laack i in. 2000). Normalny zakres pH mięsa kurcząt mięsnych wynosi od 5,7 do 6,1. Poniżej 5,7 mięso jest nazywane kwasowym, a powyżej 6,1 jako DFD (ciemne, twarde i suche) (Fletcher i in., 2000; Qiao i in., 2001). Na ten parametr wpływają różne czynniki, takie jak genetyka, płeć, sposób

utrzymania zwierząt, transport, warunki przedubojowe i metoda uboju, parametry technologiczne i czas przechowywania mięsa (Ristic, 2003).

W badaniu wykazano brak statystycznie istotnych różnic pomiędzy grupami doświadczalnymi, co świadczy o tym, że zastosowane preparaty nie wpływają na zmianę pH mięsa.

W innym doświadczeniu z zastosowaniem wyciągów z *Macleaya cordata* nie zaobserwowano istotnego wpływu związków fitoncydowych na pH mięsa (Khatun, 2023). Także w przypadku dodatku *Rhus Coriaria* w paszy dla przepiórek nie potwierdzono zależności pomiędzy zastosowaniem dodatku suszu ziołowego oraz zmianą pH mięsa (Kırar i in., 2020).

Mięso kaczek żywionych mieszankami paszowymi o różnej koncentracji składników odżywczych wzbogacanymi mieszaniną związków fitoncydowych nie wykazywało żadnych różnic w parametrze kwasowości w zależności od zastosowania substancji ziołowych (Gheisar i in., 2018).

Zastosowanie w mieszance paszowej preparatu zawierającego wyekstrahowany olejek miętowy (*Oleum Menthae piperitae*), który w swoim składzie zawiera min. metnol, menton, 1,8-cyneol, octan metylu, limonen (Farmakopea Polska X, 2014) czyli substancje wchodzące także w skład prototypu 1, nie wykazał wpływu na pH mięsa przepiórczego (Daş i in., 2020).

Można przyjąć, że najczęściej stosowane w przemyśle kompozycje preparatów ziołowych nie wpływają na ten parametr jakościowy tuszek.

Z powodu wysokiej zawartości nienasyconych kwasów tłuszczowych w tłuszczu drobiowym (Kitessa i Young, 2009) mięso to jest podatne na procesy oksydacyjne. Z prezentowanych badań wynika, że najbardziej podatne na utlenianie lipidów jest według kolejności mięso ryb, drobiowe, wieprzowe, wołowe i baranina (Zouari i in, 2010). Jedną z technik, które pomagają kontrolować utlenianie lipidów, jest zastosowanie przeciwutleniaczy, które można wprowadzić do diety zwierząt jako składnik paszy (Bölükbaşı i in. 2006). Surowce roślinne stanowią źródło substancji biologicznie czynnych, w tym związków o właściwościach przeciwutleniających, takich jak fenolokwasy, flawonoidy, taniny i katechiny (Szajdek i Borowska, 2004).

W żywieniu zwierząt wykorzystuje się zioła o właściwościach antyoksydacyjnych, takie jak rozmaryn, tymianek, oregano, mięta pieprzowa, krwawnik, głóg i szalwia. Rozmaryn i szalwia uznawane są za rośliny charakteryzujące się największą zdolnością antyoksydacyjną, ale także tymianek i majeranek wykazują

wysoką skuteczność w opóźnianiu procesów utleniania lipidów (Marcinčák i in., 2008; Marcinčák i in., 2011; Mohammadi Gheisar i in., 2015). W składzie testowanych preparatów nie zastosowano żadnego z tych składników.

Znaczne obniżenie wartości TBARS uzyskiwano w grupach żywionych mieszankami zawierającymi w swoim składzie *Artemisia annua*, co tłumaczono właściwościami antyoksydacyjnymi związków polifenolowych lub witaminy E (Cherian i in. 2013).

Właściwości antyoksydacyjne preparatów ziołowych związane są z występującymi w nich substancjami fenolowymi takimi jak np. kwas rozmarynowy czy rozmarol (Cuppett i Hall, 1998) oraz specyficznymi substancjami niefenolowymi (Placha i in., 2014) czy modulacją działania niektórych enzymów antyoksydacyjnych (Franz i in., 2010).

W uzyskanych wynikach nie występuje statystycznie istotna różnica pomiędzy poszczególnymi grupami doświadczalnymi w wartości TBARS, co może świadczyć o braku lub zbyt niskiej koncentracji antyoksydantów w testowanych preparatach oraz specyficznych związków fenolowych wykazujących takie działanie. Żadne z badań nie wskazywało na wyraźne działanie antyoksydacyjne składników występujących w trzech testowanych preparatach, co zostało potwierdzone w tym badaniu. W związku z tym przeprowadzono analizę zastosowanych preparatów pod kątem dwóch rodzajów aktywności antyoksydacyjnych – aktywność przeciwrodnikowa oraz zdolność redukcji jonów metali przejściowych.

Jednym ze znaczących dla konsumenta parametrów sensorycznych mięsa jest jego tekstura, którą można badać za pomocą pomiarów instrumentalnych. Pomiar tekstury mięsa wykonuje się wykorzystując urządzenia pomiarowe umożliwiające oznaczenie cech mechanicznych takich jak m. in. siłę cięcia (Diakun i in., 2012; Niedźwiedź i in., 2013). Parametr ten ma także duże znaczenie w przydatności mięsa do procesów technologicznych takich jak proces masażu, mielenia mięsa i mieszania z innymi składnikami (Kim i in., 2012; Singh i in., 2019).

W przeprowadzonych badaniach nie udowodniono różnic statystycznych w sile cięcia próbek mięsa.

W opublikowanych badaniach wykazano, że w przypadku kurcząt brojlerów parametr ten rośnie w zależności od wieku ubijanych ptaków (Park i in., 2021). Zastosowanie pewnych preparatów roślinnych takich jak imbir może mieć wpływ na obniżenie tego parametru (Zdanowska-Sąsiadek i in., 2019; Herawati, 2011). Natomiast

inne surowce pochodzenia roślinnego takie jak ekstrakt z cebuli czy ekstrakt z kwercetyny nie miały wpływu na siłę cięcia pozyskanego mięsa (An i in., 2015; Jang i in., 2011).

Substancje aktywne występujące w testowanych preparatach nie miały wpływu na miękkość mięsa.

Tab. 14 pH, siła cięcia i TBARS

Parametr	A	B	C	K	N	SEM	Wartość P
pH	5,622	5,426	5,456	5,530	5,450	0,028	0,163
Siła cięcia (N/cm²)	20,16	21,54	22,66	24,60	22,72	0,798	0,528
TBARS μmol MDA/mL	1,563	1,381	1,545	0,981	1,272	0,084	0,170

Parametry sensoryczne mięsa

Barwa mięsa traktowana jest przez konsumentów jako wyróżnik jego jakości. Nie stanowi pewnego wskaźnika jego bezpieczeństwa ale jest istotnym czynnikiem decydującym o zakupie mięsa (Tkacz i in., 2021). W przeprowadzonych w tym temacie badaniach udowodniono, że 74% respondentów traktuje barwę mięsa jako czynniki determinujący ich decyzje zakupowe (Lynch, Kastner, Kropf, 1986).

W badaniu zaobserwowano różnicę w barwie mięśni piersiowych pomiędzy grupami A i B. Respondenci wyraźnie lepiej oceniali mięśnie piersiowe pochodzące od zwierząt z grupy żywionej niższą (0,01%) dawką prototypu 1.

Badania prowadzone z wykorzystaniem ekstraktów z kurkumy i z czosnku wykazały, że zastosowanie tych dodatków nie wpływało w żaden sposób na żadne parametry sensoryczne mięsa (Purwanti i in., 2018).

Potwierdzono różnice istotne statystycznie w wyglądzie mięśni piersiowych pomiędzy grupami B, C i N, gdzie najlepszy efekt osiągnięto w grupie żywionej mieszanką z dodatkiem komercyjnie dostępnego preparatu ziołowego.

Zaobserwowano różnice w zapachu i brawie mięśni nóg pomiędzy grupami A i K, gdzie respondenci wskazali lepsze parametry próbek z grupy kontrolnej. Co znamienne

zastosowanie podwójnej dawki preparatu fitoncydowego (0,02%) podawanego ptakom w grupie A nie wykazało już różnic w stosunku do grupy kontrolnej.

Pomiędzy grupami C i N wystąpiły różnice w ocenie smaku mięśni nóg ze wskazaniem na grupę N, zawierającą komercyjny preparat, jako smaczniejszą.

Przeprowadzone ankiety wskazują, że preparaty fitoncydowe mogą mieć wpływ na odbiór cech organoleptycznych przez konsumentów. Szczególnie widoczne może to być w przypadku produktów złożonych ze zmikronizowanych ziół. W skład preparatu zastosowanego w grupie kontroli pozytywnej (N) wchodziły rośliny stosowane także jako przyprawy kulinarne m.in. papryka roczna, gorczyca biała, ostryż długi (tzw. kurkuma) i wyraźnie wpłynęło to pozytywnie na cechy sensoryczne produktów.

Tab. 15 Parametry sensoryczne mięsa

Mięśnie	Parametr	A	B	C	K	N	SEM	Wartość P
Piersiowe	Zapach	4,388	4,222	4,666	4,500	4,500	0,564	0,261
	Barwa	4,666 ^a	4,000 ^b	4,222 ^{ab}	4,166 ^{ab}	4,388 ^{ab}	0,640	0,020
	Wygląd	4,500 ^{ab}	4,111 ^a	4,111 ^a	4,222 ^{ab}	4,666 ^b	0,552	0,006
	Kruchość	4,333	3,944	3,888	4,055	4,333	0,725	0,173
	Smak	4,444	4,111	4,055	4,250	4,333	0,619	0,215
Nóg	Zapach	3,888 ^a	4,166 ^{ab}	4,333 ^{ab}	4,638 ^b	4,305 ^{ab}	0,069	0,020
	Barwa	3,833 ^a	4,222 ^{ab}	4,222 ^{ab}	4,666 ^b	4,305 ^{ab}	0,072	0,011
	Wygląd	4,194	4,555	4,416	4,305	4,194	0,062	0,349
	Kruchość	4,166	4,250	4,500	4,416	3,944	0,065	0,052
	Smak	4,555 ^{ab}	4,444 ^{ab}	4,111 ^a	4,416 ^{ab}	4,638 ^b	0,055	0,037

5.3. Aktywność przeciwutleniająca badanych preparatów

Wyniki przedstawione w Tabeli 3 wyrażono jako ekwiwalent aktywności przeciwutleniającej Troloxu (Trolox Equivalents of Antioxidant Capacity, TEAC) oraz podano w $\mu\text{g/mL}$. Ponieważ wyniki zostały wyskalowane na tę samą koncentrację testowanych preparatów, podane niżej wartości pozwalają na obiektywną ocenę wszystkich aktywności testowanych dodatków względem siebie.

Tabela 16 Wyniki 1-czynnikowej analizy ANOVA dla wszystkich prób.

L.P.	Preparat	Rozpuszczalnik	TEAC (FRAP) [$\mu\text{g/mL}$]	TEAC (DPPH) [$\mu\text{g/mL}$]	TEAC (ABTS) [$\mu\text{g/mL}$]
1	Prototyp 1	Metanol	3,1 ^a	2,9 ^a	10,4 ^a
2	Prototyp 1	Izopropanol	3 ^a	4,5 ^{ab}	11,9 ^a
3	Prototyp 2	Metanol	21,8 ^b	14,3 ^b	56,6 ^b
4	Prototyp 2	Izopropanol	15,1 ^b	6,3 ^{ab}	36,7 ^b
5	Preparat N	Metanol	19,8 ^b	10 ^a	53,2 ^b
6	Preparat N	Izopropanol	16,3 ^b	5,6 ^{ab}	37,4 ^b
SEM			3,5	2,6	11,6
Wartość P			0,001	0,001	0,001

Prototyp 1: grupa A 0,01%; grupa B 0,02%

Prototyp 2: grupa C 0,01%

Preparat N: grupa N 0,01% (preparat dostępny komercyjnie na rynku)

Aktywność testowanych preparatów była niższa niż Trolox. Należy zauważyć, że względnie niskie wartości TEAC to najprawdopodobniej efekt niskiej zawartości substancji aktywnych przeciwutleniająco, z uwagi na niski stopień oczyszczenia stosowanych preparatów. Potwierdzeniem tego stanu rzeczy jest fakt, że preparaty te nie są ekstraktami czy wyciągami roślinnymi, lecz produktami sproszkowanymi, w których przeciwutleniacze stanowią tylko niewielką frakcję; niewielka część naważki pozostaje rozpuszczalna w dedykowanych rozpuszczalnikach (metanol, izopropanol). Trolox sam z siebie jest substancją wysokoaktywną, dlatego konkurować z nią mogą przeważnie preparaty o wysokim stopniu oczyszczenia lub czyste substancje (np. wyizolowane flawonoidy) lub mocne roztwory/napary ziół.

Tabela 17 Wynik analizy ANOVA (1-czynnikowa), osobno dla preparatu i rozpuszczalnika.

Preparat	TEAC (FRAP) [µg/mL]	TEAC (DPPH) [µg/mL]	TEAC (ABTS) [µg/mL]
Prototyp 1	3,07 ^a	3,68 ^a	11,27 ^a
Prototyp 2	17,8 ^b	11,07 ^b	46,68 ^b
Preparat N	18,05 ^b	7,81 ^b	43,72 ^b
Wartość P	0,001	0,001	0,001
Rozpuszczalnik			
Metanol	20,31	15,89	83,7
Izopropanol	17,99	10,2	53,05
SEM	3,52	2,58	11,63
Wartość P	0,802	0,222	0,297

Prototyp 1: grupa A 0,01%; grupa B 0,02%

Prototyp 2: grupa C 0,01%

Preparat N: grupa N 0,01% (preparat dostępny komercyjnie na rynku)

W przypadku Prototypu 2 oraz Preparatu N aktywność ich była na porównywalnym, stosunkowo niskim poziomie. Najniższą aktywność w obrębie wszystkich trzech testów wykazał Prototyp 1.

Wykonane testy oceniają tylko syntetyczne mechanizmy działania przeciwutleniającego, a nie skuteczność rzeczywistą jako dodatków przeciwutleniających, co wymaga oznaczeń w trakcie procesu peroksydacji. Wyniki te potwierdzają pośrednio, że prototypy 1 i 2 nie powinny mieć wpływu na TBARS i pH mięsa.

5.4. Wyniki histologiczne i histometryczne jelita cienkiego

Ocenie poddano segmenty jelit pobrane od kurcząt brojlerów z 5 grup. W badaniu wykorzystano 2 grupy kontrolne (K-kontrola, N-kontrola pozytywna z wykorzystaniem komercyjnej mieszanki ziół) oraz 3 grupy badane (A- prototyp 1 0,01%; B- prototyp 1 0,02%; C-prototyp 2 0,01%). Analiza dotyczyła 120 próbek z segmentów jelita (D-dwunastnicy, B-j. biodrowego, K-j. krętego). Zmierzono wysokość i szerokość kosmków, głębokość krypt, obliczając stosunek wysokości do szerokości oraz pole powierzchni kosmków (wzór: $2 \pi \times (W/2) \times L$ gdzie W-szerokość kosmka; L-długość kosmka) w 7 kolejnych, nienaruszonych kosmkach z odniesieniem do nienaruszonej blaszki właściwej.

Opis mikroskopowy:

Grupa A, odcinek biodrowy.

Kosmki spłaszczone w części szczytowej, oddzielone od siebie przestrzeniami między kosmkowymi. Długie kosmki kształtu „kanciastego” z powodu wcięć brzegu kosmka ulegają zgięciu i układają się w formie „dywanu”. Podstawy kosmków zlewają się ze sobą. Krypty liczne, silnie wydłużone, gęsto ułożone w 1 szeregu lub tworzą wieloelementowe skupiska.

Odcinek jelita biodrowego z grupy A wykazuje podobieństwa do grupy N. Zaobserwowano, że kosmki jelitowe wykazują tendencję do dichotomicznego rozgałęziania w części szczytowej oraz tworzenia wcięć na brzegach kosmka. Krypty silnie wydłużone (A5B; A6B) niekiedy tworzą skupiska (A7B;A8B), ale w takim przypadku kosmki są „kanciaste”, pozginane i tworzą strukturę „dywanu”.

Grupa B, odcinek biodrowy.

W grupie tej obserwujemy 2 rodzaje kosmków:

1. kosmki „palcokształtne” o jednakowej szerokości od podstawy do szczytu, który jest tępy. Ich brzegi są gładkie, bez widocznych wcięć, a podstawy sąsiadujących kosmków zlewają się ze sobą. Krypty bardzo wydłużone, owale ułożone w 1 rzędzie (BB; B4B;B6B).

2. kosmki „kanciaste”, których brzegi są mocno (B5B) lub słabiej powcinane (B7B). W wyniku powcinanego brzegu dłuższe/„starsze” kosmki ulegają zgięciu i tworzą strukturę

„dywanu” (B5B; B7B). U podstawy kosmków krypty, kształtu owalnego lub kulistego, tworzą kilkudziesięcioelementowe skupiska. Widoczna migracja krypt od podstawy ku szczytowi kosmka.

W porównaniu do grupy N odcinek jelita biodrowego z grupy B wykazuje pewne cechy wspólne. Brzegi kosmków powcinane, przez co tworzą „kanciaste” zamiast palczastych struktury. Liczne krypty migrują ku szczytowi kosmka oraz tworzą wieloelementowe skupiska.

Grupa C, odcinek biodrowy.

Obserwujemy kosmki palczaste o płasko ściętych szczytach lub kosmki „kanciaste” o powcinanych brzegach, zgięte w połowie wysokości i tworzące strukturę „dywanu” (C3B; C6B; C7B; C8B). Podstawy kosmków zlewają się ze sobą w części podstawnej, gdzie obecne są dobrze widoczne, bardzo liczne, polimorficzne krypty ułożone w 1 -2 rzędach (C1B; C2B; C4B; C5B) lub tworzące kilkudziesięcioelementowe skupiska (C3B; C6B; C7B; C8B), co o wydaje się być cechą charakterystyczną w tej grupie. Ponad to charakterystyczne są też skupiska krypt, niekiedy migrujące ku szczytowi kosmka. Kosmki o brzegach „powcinanych” tworzą formy „kanciaste” układające się „dywanowato”.

Grupa C z odcinka biodrowego reprezentuje etap pośredni w stosunku do grupy N.

Do podobieństw zaliczamy „paprociowy” kształt kosmków o brzegach mocno powcinanych. Co najprawdopodobniej jest wynikiem obecności dużej liczby komórek kubkowych (C2B; C3B; C6B; C7B; C8B) oraz wzrost liczby krypt, które migrują ku szczytowej części kosmka.

Grupa K, odcinek biodrowy.

Grupa kontrolna zupełnie różna od grupy kontroli pozytywnej N oraz grup badawczych A, B, C. Kosmki o kształcie prostokątów i gładkich brzegach, lekko spłaszczonych szczytach (K1B; K3B; K4B; K7B) i wąskich przestrzeniach pomiędzy kosmkami (K1B; K3B; K8B; K7B). Kosmki zwrócone do światła jelita, rzadko tworzą formy zgięte/ „kanciaste” o mocno powcinanych brzegach i układające się w dywan (K6B). Krypty owalne, mocno wydłużone, ułożone w 1-2 rzędach. Niekiedy obserwowano krypty migrujące ku szczytowi kosmka.

Grupa N, odcinek biodrowy.

Kosmki o kształcie prostokąta lub palcokształtne o tępo ściętych szczytach (N1B;N3B;N5B;N6B) lub mocno powcinanych brzegach, zgięte (N8B; N3B; N2B; N4B; N1B), a wtedy krypty wypełniają niemal szczelnie ich podstawy tworząc ogromne, kilkudziesięcioelementowe, wylewające się ku warstwie mięśniowej skupiska (N2B;N4B;N1B). Zaobserwowano wzrost liczby krypt. Ten odcinek jelita Wykazuje cechy reorganizacji struktury w wyniku zastosowania substancji N.

Grupa A, odcinek z jelita krętego.

Kosmki polimorficzne, zarówno cienkie i długie o zaokrąglonych końcach jak też palczaste, szerokie z tępym szczytem. Ułożone w dużych odległościach pomiędzy sobą. Szczyty kosmków zaokrąglone/trójkątne (A5K; A3K) lub tępo ścięte (A2K; A8K). Niekiedy kosmki „prostokątne” o szerokiej podstawie i szerokiej części szczytowej i powcinanych brzegach. Krypty liczne, owalne lub wydłużone owale ułożone w 1 rzędzie u podstawy kosmków. Brak jednolitości obrazu mikroskopowego. Nieuporządkowana, chaotyczna struktura tej części jelita. Liczne, puste przestrzenie po miejscowym „wypadnięciu” kosmków co jest charakterystyczne dla występowania blaszek limfocytarnych. Brak podobieństwa do grupy N.

Grupa B, odcinek z jelita krętego.

Kosmki o typowym „palczastym” kształcie skierowane do światła jelita (B1K;B4K;B6K;B8K) lub kolankowato zgięte układające się w formie „dywanu”(B2K;B3K;B7K). We wszystkich typach kosmków brzegi gładkie, bez wcięć. Krypty owalne ułożone w 1 (B1K;B4K;B6K;B8K), 2 (B7K; B5K) lub 3 (B2K; B3K) rzędach. Czasami obserwowano 2-3 kosmkowe struktury (B6K; B4K), które powstają w wyniku ścisłego przylegania sąsiadujących elementów dzięki proliferacji enterocytów.

Obserwowana jest zmiana kształtu kosmków na wydłużony, szczytu na zaokrąglony, przy czym brzeg kosmka pozostaje gładki. Kosmki ułożone regularnie z widocznymi przestrzeniami pomiędzy kosmkami. Krypty, w porównaniu z grupą N czy K, bardziej liczne, ułożone w kilka rzędów i migrujące ku szczytowi kosmka. W mojej ocenie ten odcinek jelita pod wpływem zastosowanej substancji B ulega korzystnej zmianie i wykazuje podobieństwo do grupy N.

Grupa C, odcinek z jelita krętego.

Zwiększona powierzchnia chłonna poprzez wzrost liczby kosmków. Kosmki „palczaste” często złane bocznie po 2-3 elementy (C1K; C3K;C6K;C7K;C8K), prostokątne lub językowate w kształcie, często złane bokami dzięki proliferacji eterocytów. Krypty owalne ułożone w 1-2 rzędach bez cech migracji. Kosmki o brzegach gładkich, bez wcięć. Pomiedzy kosmkami wąskie przestrzenie między kosmkami. Kosmki skierowane do światła jelita lub tworzące strukturę „dywanu”.

Jelito z tego odcinka pod wpływem substancji C wykazuje pewne cechy podobieństwa do grupy N. Ponad to pomimo obecności blaszek limfatycznych w postaci cienkiej blaszki w środkowej części kosmki znajdujące się powyżej nie ulegają skróceniu ani wypadnięciu jak to się dzieje w przypadku obecności guzków limfatycznych. Wzrasta też liczba krypt także tych migrujących ku szczytowi kosmka.

Grupa K, odcinek z jelita krętego.

Kosmki nitkowate o kształcie „prostokątów” o zaokrąglonych końcach i gładkich brzegach (K5K; K8K). W bezpośrednim sąsiedztwie dłuższych prostokątnych kosmków zaobserwowano krótsze, trójkątne (K8K;K6K). Wyraźne przestrzenie międzykosmkowe od szczytu do podstawy. Krypty ułożone w 1,2 rzędach. Fałdy Kerckringa niewielkie lub jest ich mało (K7K;K8K). Brak guzków, blaszek limfatycznych limfatycznych, ale też brak pustych miejsc bezkosmkowych.

Grupa N, odcinek z jelita krętego.

Wzrost liczby kosmków wraz ze zmianą kształtu na palczasty/prostokątny z zaokrąglonym/zaokrąglonym szczytem. Przestrzenie pomiędzy kosmkami obecne, dobrze widoczne. Brak wcięć na brzegach kosmków. Krypty w 1- 2 rzędach. Odnotowano obecność blaszek limfatycznych przy równoczesnym braku wypadania kosmków. Cechą charakterystyczną jest zlewanie się kosmków poprzez boczne zetknięcie sąsiadujących brzegów kosmków.

Grupa N, odcinek z dwunastnicy.

Obserwowano dużą deformację kosmków oraz zanik uporządkowanej struktury tkankowej. Kosmki w przeważającej liczbie cienkie, nitkowate ze strefami wypadniętego materiału w częściach szczytowych kosmka (N3D; N4D) prawdopodobnie po komórkach

kubkowych co prowadzi do stopniowej degeneracji kosmków (N7D). Obecne blaszki (N1D; N2D;N3D;N4D;N5D) oraz grudki limfatyczne (N6D; N8D)

Grupa A, odcinek z dwunastnicy.

Kosmki długie, cienkie o powcinanych brzegach i zaokrąglonym szczycie skierowane do światła jelita. Odległości pomiędzy kosmkami wyraźne. W przypadku kosmków „maczugowatych” brzegi kosmków powcinane, a szczyty „buławkowato” powiększone/ rozdęte. W tym typie kosmków widoczne strefy przejaśnień będące wynikiem utraty części materiału wskutek zmian apoptycznych, prawdopodobnie spowodowanych procesem barwienia. W obu typach kosmków krypty liczne, owalne lub wydłużone owale ułożone w 1 rzędzie (A8D;A7D;A5D) bądź tworzące skupiska (A1D). W tej grupie odnotowano zarówno ścienienie kosmków (A6D) jak też nienaturalne „rozdęcie” kosmków (A5D;A8D;A7D) prowadzące ostatecznie do wcześniejszej degeneracji kosmka. Obraz mikroskopowy wskazuje na znaczną dezorganizację i degenerację kosmków w wyniku zastosowania substancji A.

Grupa B, odcinek z dwunastnicy.

Kosmki cienkie, długie o powcinanych brzegach i zaostzonych szczytach (B1D;B2D;B6D). Skierowane ku światłu jelita (B1D; B2D; B6D;B5D;B4D) lub zgięte i tworzące formę „dywanu” (B3D;B8D). Obecne też kosmki o średnio (B5D) lub silnie rozszerzonych częściach szczytowych (B8D; B7D). Krypty liczne, gęsto ułożone w 1 rzędzie (B1D; B2D;B5D; B4D) lub silnie wydłużone owalne krypty w 2 rzędach (9B3D;B8D;B7D). Sporadycznie obserwowano kilkudziesięcioelementowe skupiska owalnych krypt (B6D).

Grupa C, odcinek z dwunastnicy.

Kosmki cechuje duży polimorfizm. Obserwowano długie i cienkie (C5D;C8D) o zaokrąglonym lub trójkątnym szczycie, który ulega deformacji (C1D;C4D). Krypty ułożone w 1-2 szeregach (C4D; C3D; C5D).

W tej grupie podanie substancji C spowodowało ścienienie kosmków lub w przypadku kosmków liściokształtnych doprowadziło do powstania licznych wcięć na brzegach kosmka (C4D;C3D). Zaobserwowano wzrost liczby wydłużonych krypt (C8D;C7D), tworzących skupiska (C1D;C2D;C3D).

Grupa K, odcinek z dwunastnicy.

Kosmki długie, cienkie, nitkowształtne o powcinanych brzegach i zaokrąglonych szczytach. Mogą układać się w formie „dywanu” gdy kosmki są zgięte (9K3D;K8D). Krypty w 1-2 rzędach, ale mogą też tworzyć kilkudziesięcioelementowe skupiska (K3D;K8D).

Ocena segmentów dwunastnicy i jelita krętego jest głównym wskaźnikiem zdrowia, rozwoju i funkcjonalności jelit w tym powierzchni resorpcyjnej jelita. Wzrost resorpcji substancji odżywczych wynika ze zwiększenia powierzchni jelita wskutek wydłużenia kosmków jelitowych co może być efektem wzrostu regeneracji lub/i spadku apoptozy enterocytów (Pluske i in. 1996).

Zmiany zdolności wchłaniania składników odżywczych wynikają ze zmian morfologicznych jelita. Jednostkami funkcjonalnym nabłonka jelita są kosmki i krypty. Pierwsze wydłużeniu ulegają kosmki, natomiast kilka dni później tworzą się krypty, a ich odnowa odbywa się co 4-5 dni. Kosmki pokryte są enterocytami, które migrują ku szczytowi kosmka. Migracja enterocytów i ich apoptoza u zdrowego osobnika pozostają w równowadze. Jeśli natomiast dochodzi do zbyt dużej utraty enterocytów to głębokość wzrasta (Cheng i Leblond, 1974).

Wzrost długości i szerokości kosmków jelita (zwłaszcza w dwunastnicy i kątnicy) prowadzi do zwiększenia powierzchni resorpcyjnej tych odcinków jelita. Zmniejszenie głębokości krypt i zmieniony stosunek długości kosmków do głębokości krypt wskazuje na zmniejszoną wymianę enterocytów (czyli zmniejszoną potrzebę tworzenia nowych komórek). Z wiekiem głębokość krypt i liczby enterocytów nie ulega zmianie, natomiast zmniejsza się liczba kosmków w danym segmencie jelita (Prakatur i in., 2019).

Kurczęta brojlery charakteryzują się wysokim pobraniem paszy, co stanowi znaczne obciążenie dla funkcjonowania całego przewodu pokarmowego, szczególnie dla komórek nabłonka wchłaniającego w jelitach cienkich. Aby radzić sobie z tym stresem i uszkodzeniami, ta grupa komórek musi być nieustannie odnawiana. Nowe enterocyty formują się poprzez szybki podział komórek w obszarach zwanych kryptami, a nowo utworzone komórki przemieszczają się w górę kosmków, stopniowo dojrzewając i wyrażając niezbędne receptory i enzymy do wykonywania swoich zadań. Podczas końcowego procesu dojrzewania i pod wpływem różnych czynników stresowych, komórki nabłonkowe na końcach kosmków przechodzą proces apoptozy i są uwalniane do światła jelita. Wzmoczone uszkodzenia prowadzą do większej utraty komórek na

powierzchni kosmków, co z kolei skutkuje ich skracaniem i wydłużaniem krypt w próbie zrekompensowania utraty komórek przez zwiększoną proliferację komórek w kryptach, dlatego wartość stosunku długości kosmków do głębokości krypt jest używana jako miara stanu zdrowia jelit.

Stosunek wysokości kosmków do głębokości krypt pokazuje stopień przebudowy tkanki. Wartość min. B8B (1,39), max. A6D (21,6) co oznacza stopień intensywności przebudowy znacznie przewyższający wartości w grupie N. Najlepszą wartość osiągnięto przy zastosowaniu prototypu 1 w dawce 0,01%

Powierzchnia kosmków jelitowych, która powoduje zwiększenie powierzchni chłonnej kosmków, a to z kolei przekłada się na wzrost wchłaniania składników odżywczych. Wartość min. K4B (207918), max. A4D (15630587). Wykazano zdecydowaną przewagę grupy żywionej paszą z dodatkiem prototypu 1 w dawce 0,01% nad grupą kontrolną.

Głębokość krypt, która określa długość życia kosmków. Wartość min. A7B (72), max. C7D (448). Najpłytsze krypty oznaczają wydłużony czas życia kosmków z powodu braku potrzeby ich odnawiania. Najlepszy parametr osiągnięto przy zastosowaniu prototypu 1 w dawce 0,01%

Wysokość kosmków jest związana z długością życia kosmków. Dłuższe kosmki oznaczają aktywną mitozę w komórkach jelit. Wartość min. B8B (516), natomiast wartość max. A4D (2154) oznacza podwyższoną aktywność mitotyczną komórek. Najwyższa wartość mitotyczna wystąpiła w grupie otrzymującej prototyp 1 preparatu w dawce 0,01%.

Na podstawie analizy ilościowej zwiększenie powierzchni chłonnej jelita następuje po podaniu substancji w grupie A, najmniejsze w grupie C.

Dwunastnica grupy A wykazuje najsilniejszy stopień przebudowy, jak też zwiększoną powierzchnię resorbcyjną jelita w wyniku wydłużenia kosmków (A6D, A4D). Znaczne pogłębienie krypt, a co za tym intensyfikację procesu odnowy kosmków odnotowano w grupie C (C7D), natomiast grupa A (A7B) wydaje się być grupą pośrednią pomiędzy grupą B i C.

Na podstawie analizy mikroskopowej grupa N wskazuje na silne pobudzenie jelit do odnowy i tworzenia nowych kosmków. W części preparatów kosmki „pozginane” układające się w formie „dywanu” utrudniają dokonanie pomiarów ich długości, natomiast elementem dominującym są kilkudziesięcioelementowe skupiska krypt (jelito biodrowe). W dwunastnicy kosmki są ścinione, długie, liczne. Widoczne są blaszki

limfatyczne. Odcinek j. krętego jest najbardziej zbliżony do obrazu kontrolnego jelit z powtarzającymi się zlanymi kosmkami wskutek proliferacji enterocytów. Dwunastnica posiada niejednolity obraz kosmków-rozdętych, ścienionych, połączonych bocznie, dlatego przy zastosowaniu substancji badanych A,B, C zasadne było zanalizowanie 3 odcinków jelit .

W innych doświadczeniach także zaobserwowano wpływ związków fitoncydowych na morfologię jelit kurcząt brojlerów. Dodatek do paszy dwóch fitobiotyków złożonych z *Persicaria odorata* i *Piper betle*, spowodował wzrost wysokości kosmków jelitowych w dwunastnicy i jelicie czczym u kurcząt (Basit, 2020). Ptaki, które otrzymywały w paszy mieszaninę związków fitobiotycznych zawierającą kamfor, mentol i tymol, charakteryzowały się zwiększoną wysokością kosmków jelitowych oraz brakiem istotnej zmiany głębokości krypt w jelicie krętym (Giannenas, 2019). Suplementacja diety dodatkiem tymolu i karwakrolu w zależności od zastosowanej dawki poprawiała morfologię jelita krętego oraz jelita ślepego. W badanych grupach znacząco zwiększyła wysokość kosmków w jelicie krętym oraz grubość błony śluzowej jelita krętego, a także istotnie zmniejszyła głębokość krypt w jelicie ślepym (Li i in., 2023).

Natomiast doświadczeniu w którym ptakom podawano związki fitoncydowe do wody pitnej z zaobserwowano efekt zmiany morfologii jelit w zależności od odcinka. Jednokrotne i dwukrotne podawanie wyciągów roślinnych nie wpłynęło na wysokość kosmków jelitowych natomiast zwiększało głębokość krypt szczególnie w dwunastnicy (Wojtacka i in., 2023). Badania te mogą sugerować, że podawanie związków fitoncydowych jest skuteczniejsze pod kątem poprawy morfologii przewodu pokarmowego jeśli jest ono stosowane w mieszance paszowej w sposób ciągły.

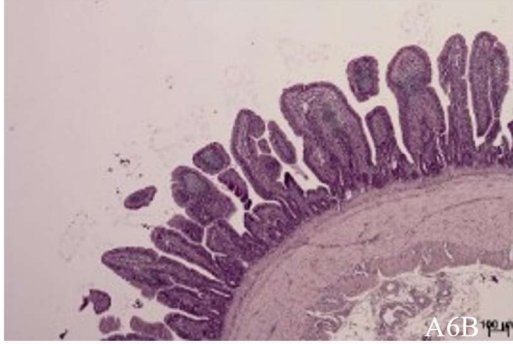
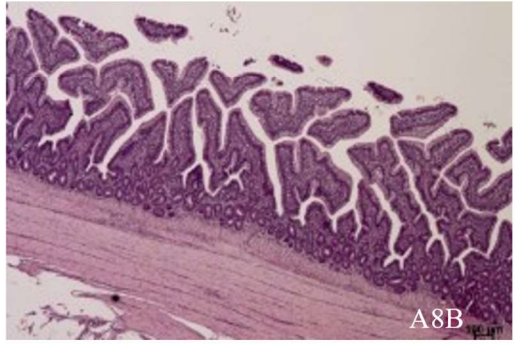
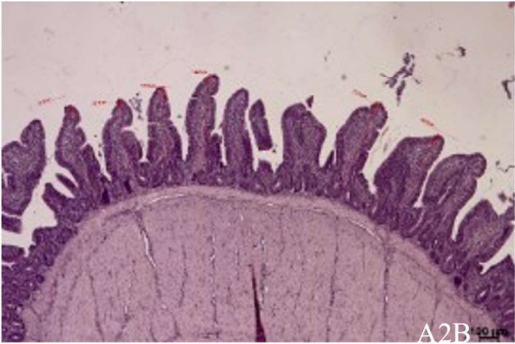
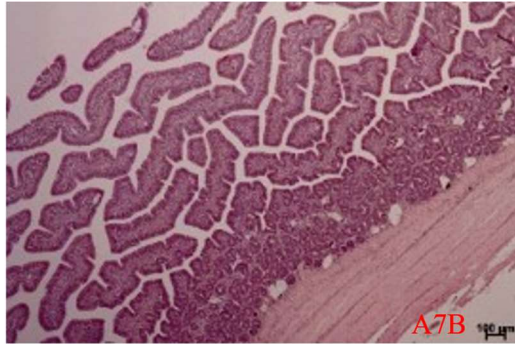
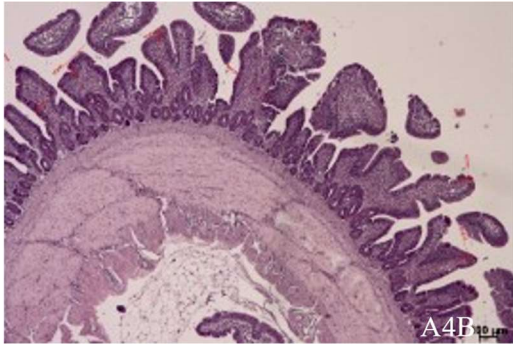
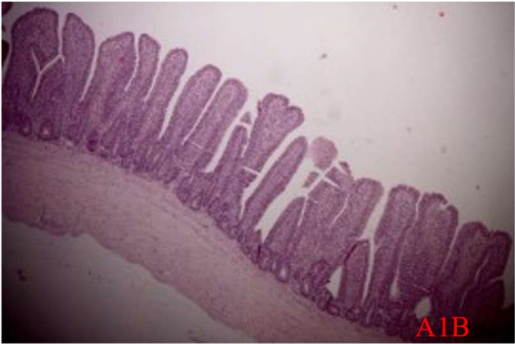
Wszystkie grupy badane A, B, C mikroskopowo wykazują podobieństwo do grupy N, natomiast zupełnie odbiegają od obrazu jelit z grupy K. Wskazuje to na pozytywne działanie na morfologię jelit kurcząt każdego zastosowanego preparatu i wyraźną różnicę w stosunku do obrazu jelit ptaków żywionych dietą kontrolną. Zastosowanie preparatów fitoncydowych wpłynęło także pozytywnie na zwiększenie powierzchni chłonnej jelit, co powinno mieć pozytywny wpływ na przyswajalność składników odżywczych.

Zarówno powierzchnia kosmków jelitowych jak i ich wysokość była najwyższa w grupie w której podawano prototyp 1, podobnie jak najmniejsza, czyli najbardziej

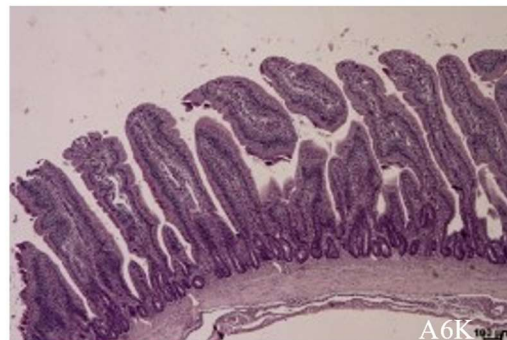
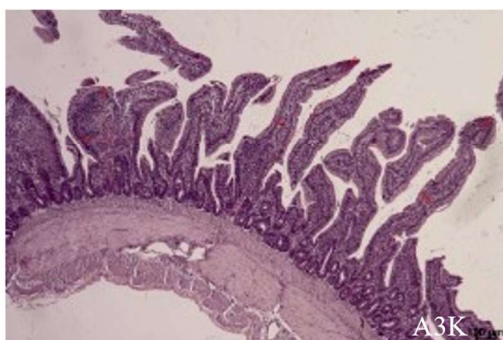
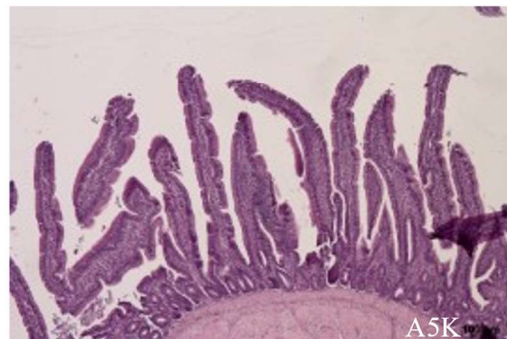
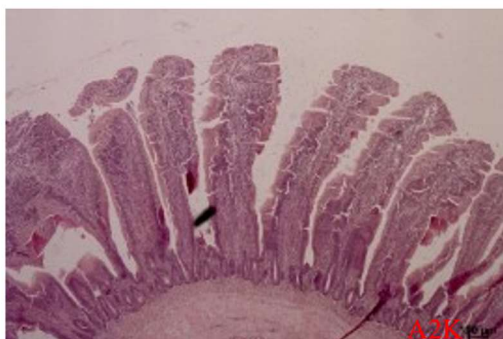
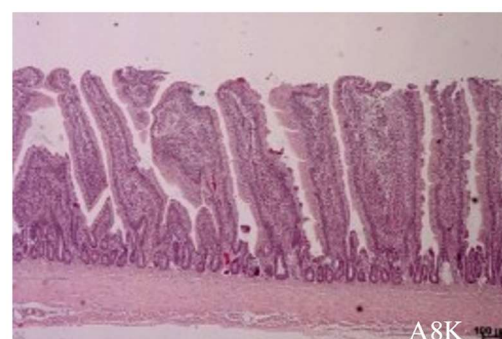
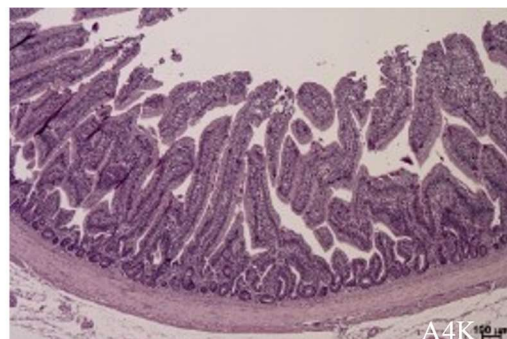
korzystna głębokość krypt. Obraz ten pozwala domniemać, że skład tego preparatu najkorzystniej wpływa na obraz morfologiczny jelit. Doświadczenia przeprowadzone na prosiętach wykazały, że dodatek salicylanu metylu, będącego głównym składnikiem prototypu 1 powodował większą wysokość kosmków w dwunastnicy w porównaniu do grupy kontrolnej (Zhang i in., 2020; Wei i in., 2021).

Tabela 18 Średnie wyników pomiarów kosmków jelitowych i krypt

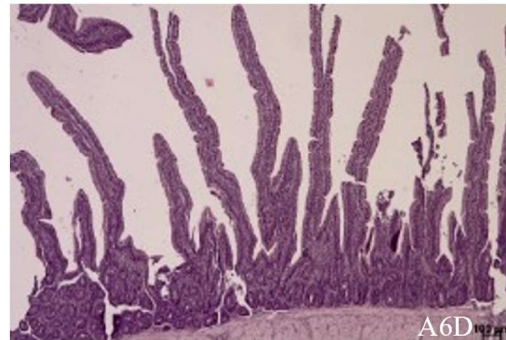
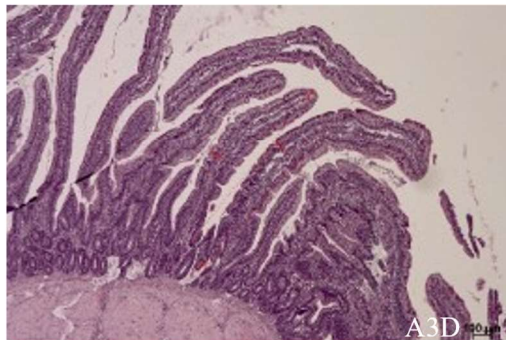
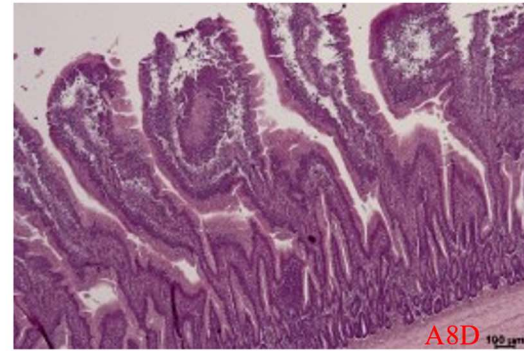
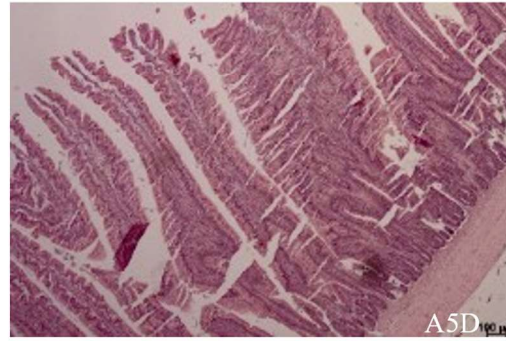
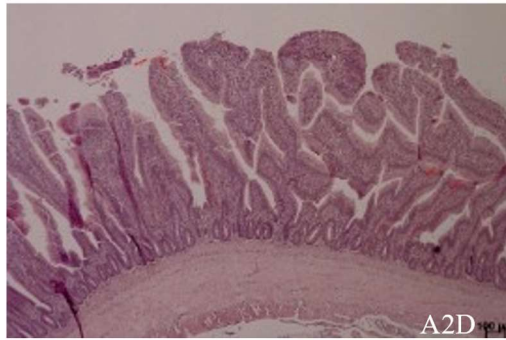
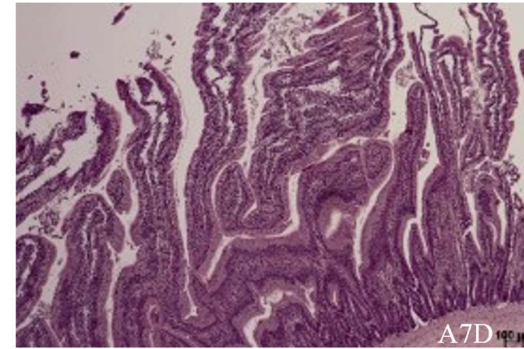
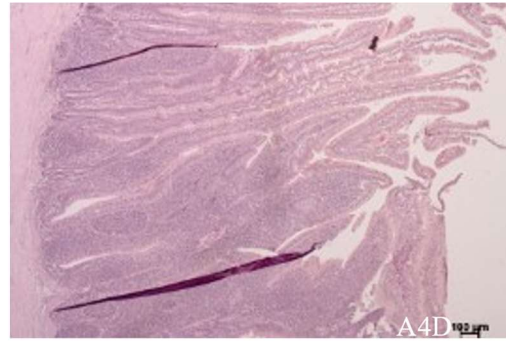
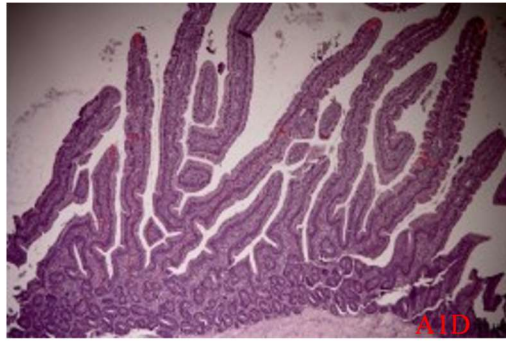
Odcinek	Parametr	K	N	A	B	C	SEM	Wartość-P
Biodrowe	Długość (μm)	646,3	729,1	682,1	670,2	742,2	14,18	0,066
	Szerokość (μm)	162,5	185,5	176,7	159,1	178,2	6,005	0,402
	Głębokość krypt (μm)	131,2	139,0	117,1	162,3	128,6	11,68	0,477
	Stosunek wysokości kosmków do głębokości krypt	6,581	8,071	6,338	4,859	7,886	0,480	0,199
Dwunastnica	Długość (μm)	1501,3	1669,6	1427,5	1566,7	1612,3	48,56	0,818
	Szerokość (μm)	195,7	255,5	222,6	202,8	193,7	15,84	0,868
	Głębokość krypt (μm)	125,0	143,8	133,1	214,0	129,4	13,58	0,634
	Stosunek wysokości kosmków do głębokości krypt	12,69	12,60	10,27	9,476	12,79	0,823	0,618
Kręte	Długość (μm)	1075,5	1126,6	1065,4	1147,7	1215,1	22,06	0,301
	Szerokość (μm)	159,0	204,4	210,0	190,3	186,2	9,166	0,086
	Głębokość krypt (μm)	121,3	166,1	123,1	106,0	121,8	10,83	0,508
	Stosunek wysokości kosmków do głębokości krypt	10,13	9,622	8,984	11,03	10,46	0,500	0,595



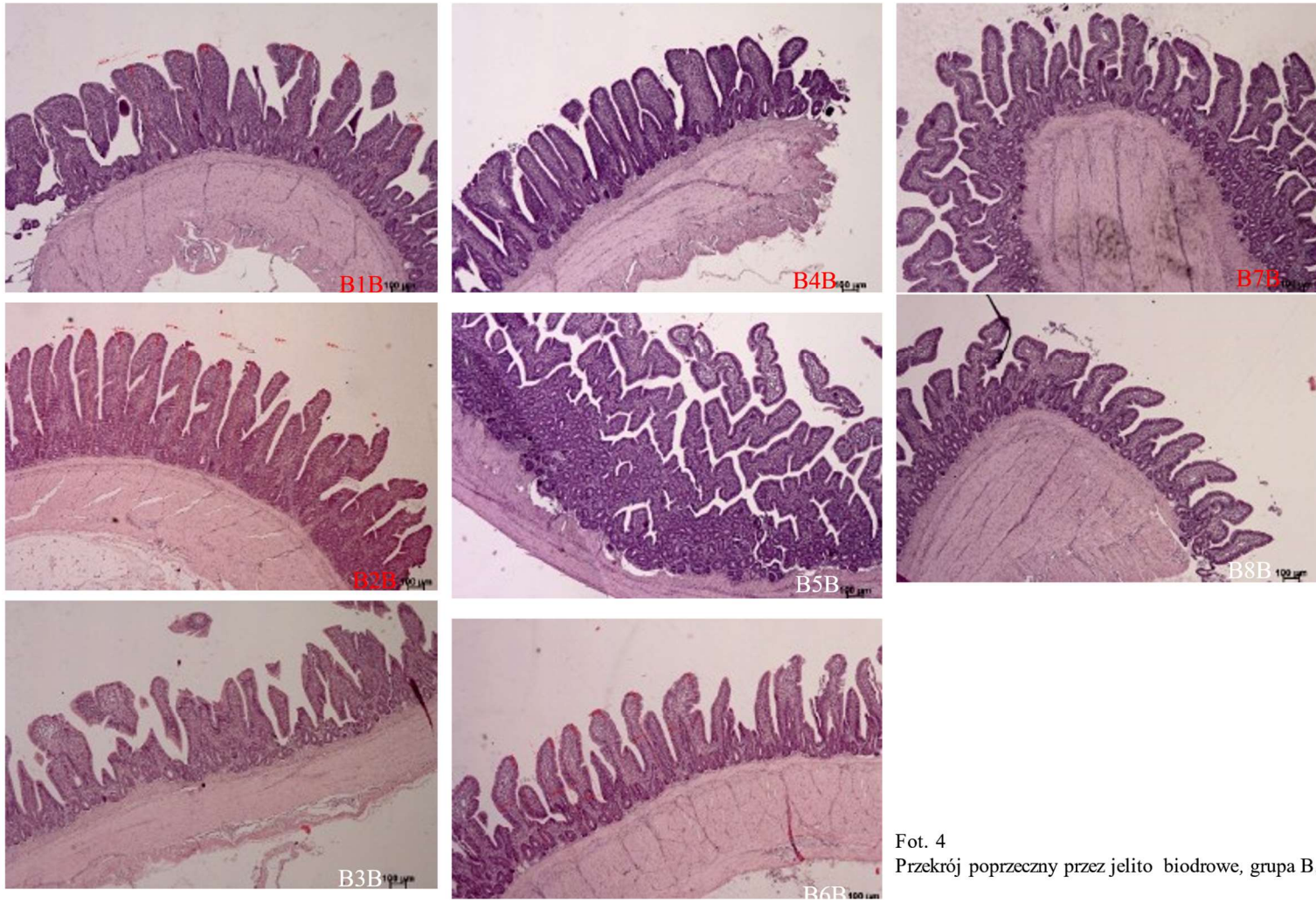
Fot. 1
Przekrój poprzeczny przez jelito biodrowe grupa A.



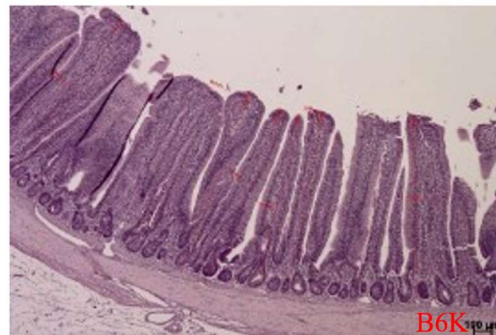
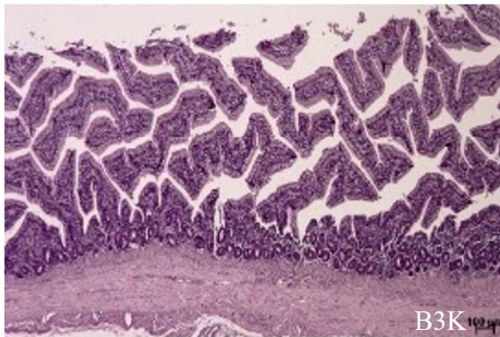
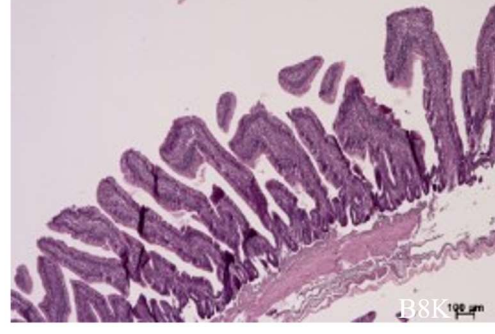
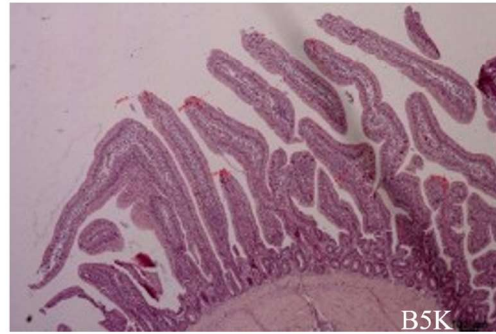
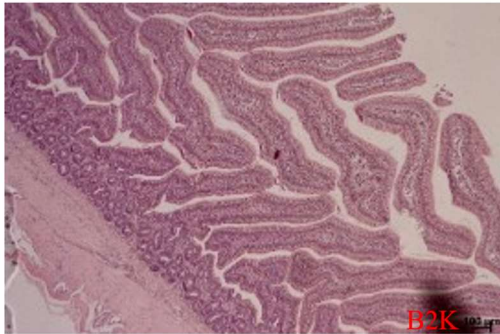
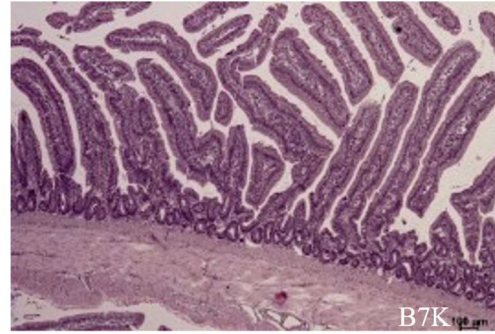
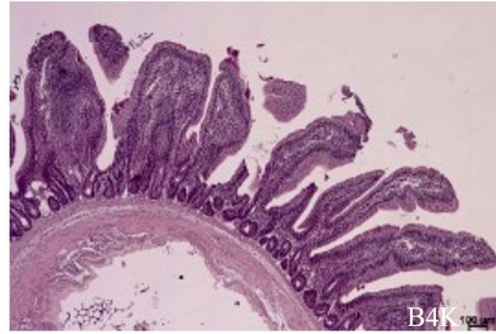
Fot. 2
Przekrój poprzeczny przez jelito kręte grupa A.



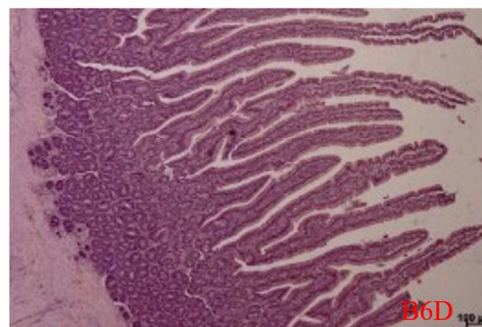
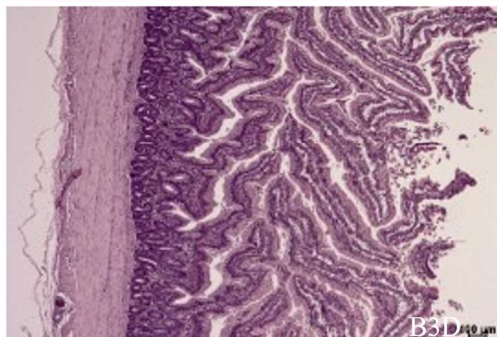
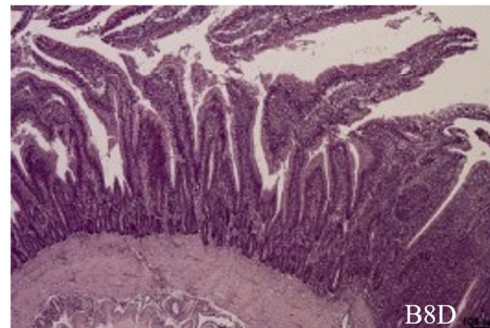
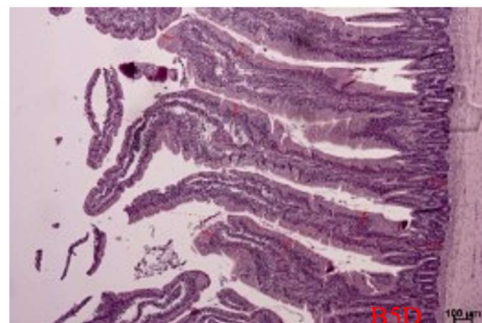
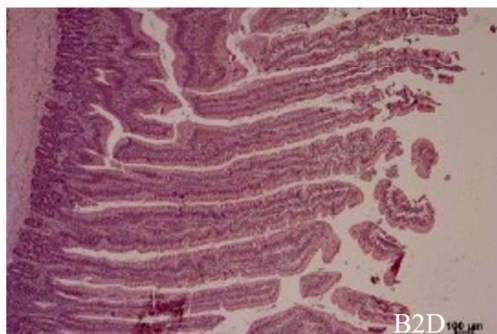
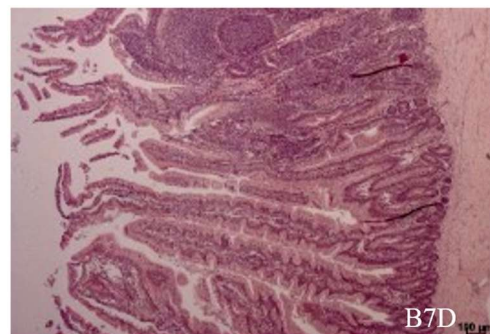
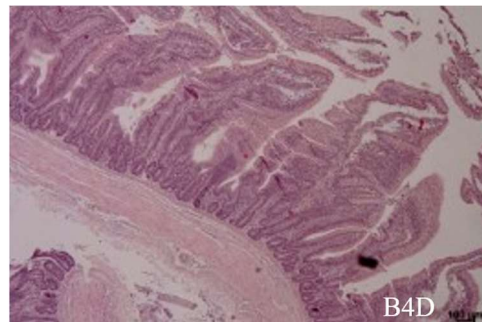
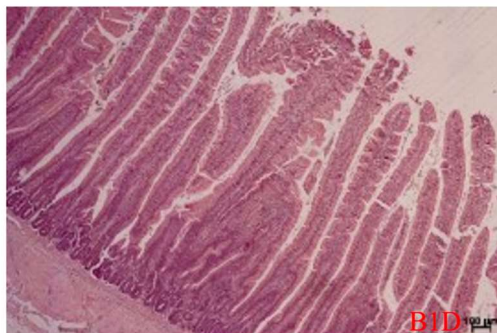
Fot. 3
Przekrój poprzeczny przez dwunastnicę grupa A.



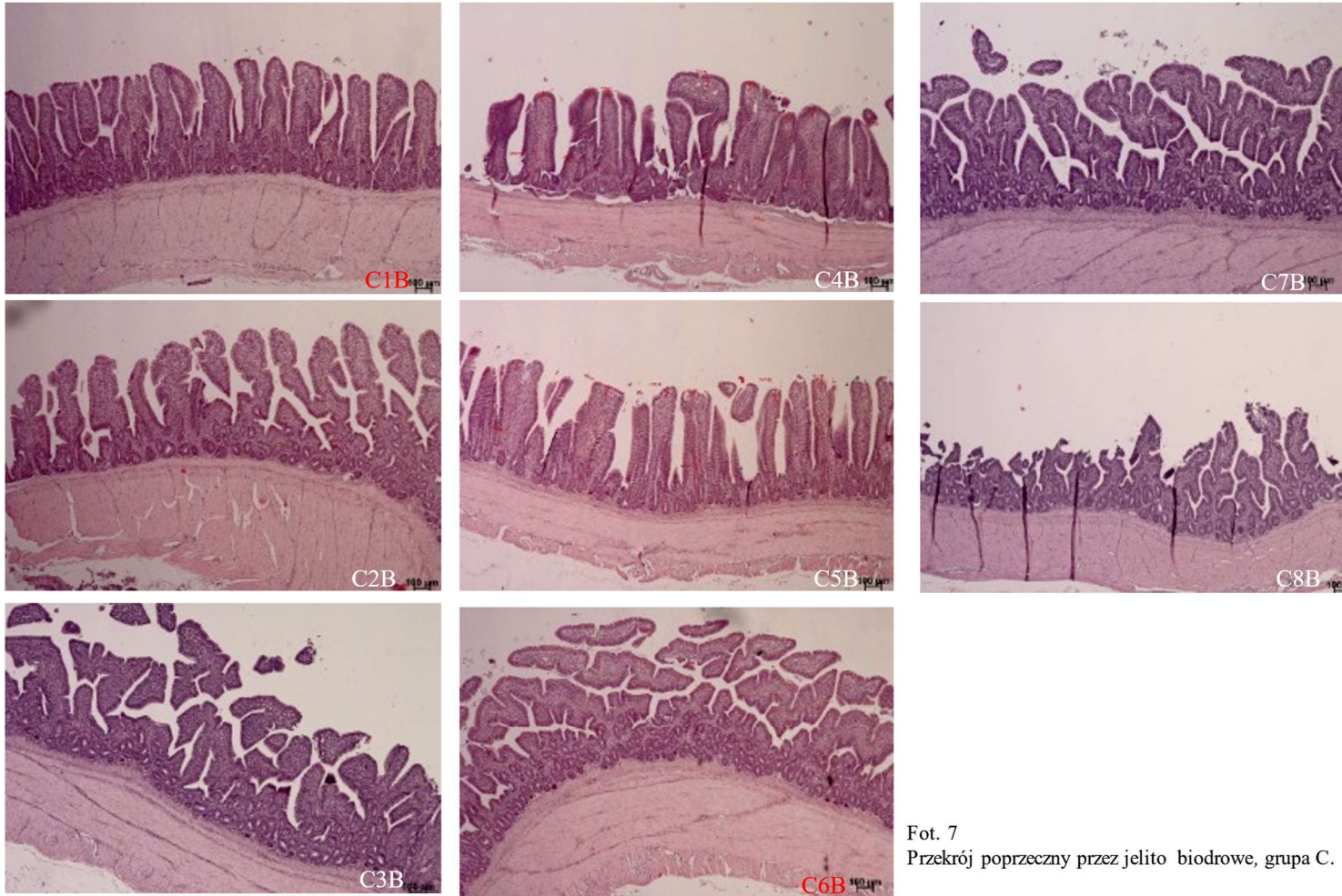
Fot. 4
Przekrój poprzeczny przez jelito biodrowe, grupa B.



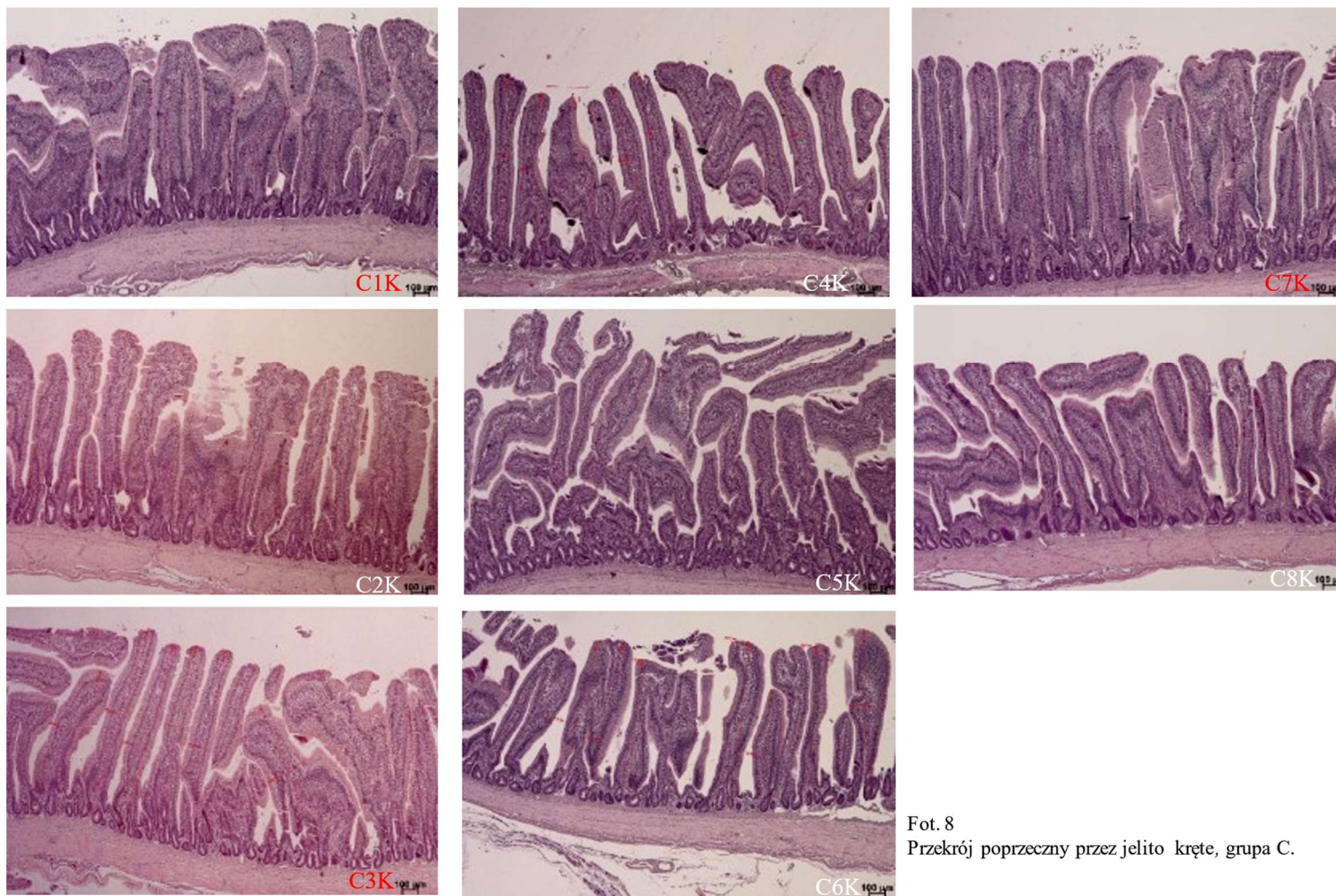
Fot. 5
Przekrój poprzeczny przez jelito kręte, grupa B.



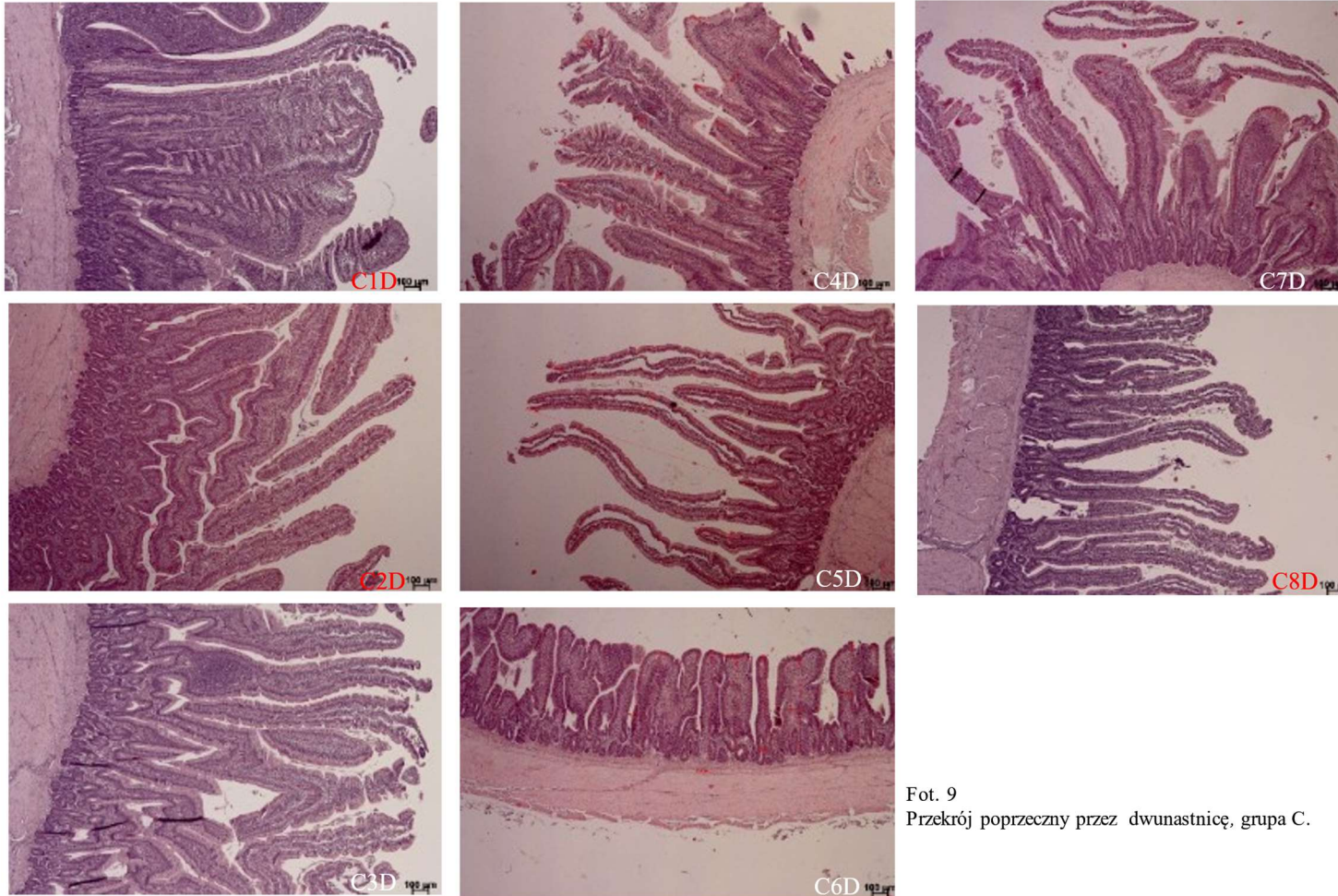
Fot. 6
Przekrój poprzeczny przez dwunastnicę , grupa B.



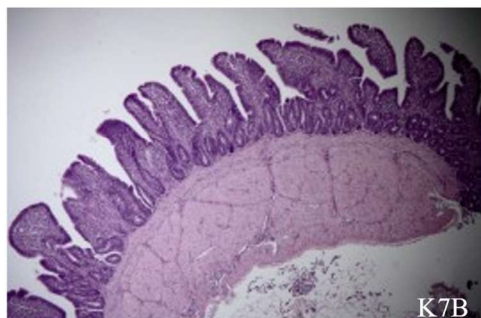
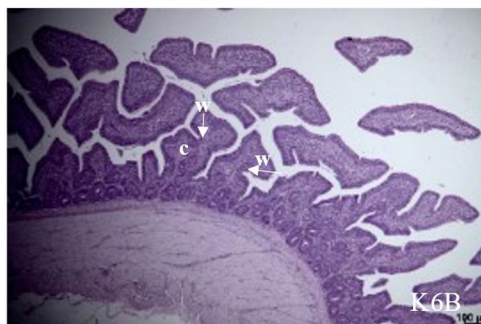
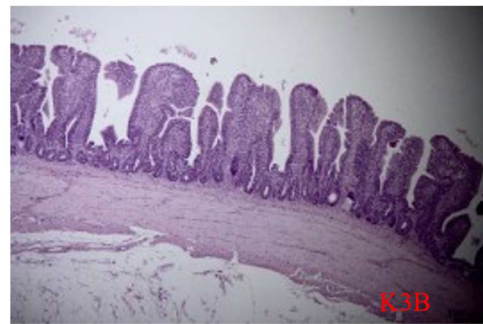
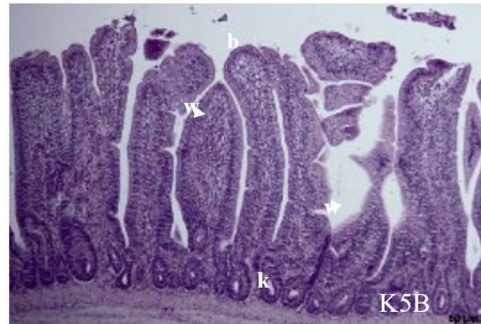
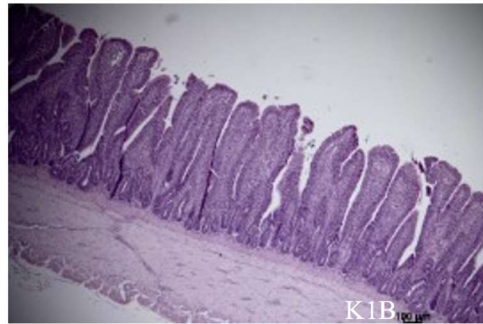
Fot. 7
Przekrój poprzeczny przez jelito biodrowe, grupa C.



Fot. 8
Przekrój poprzeczny przez jelito kręte, grupa C.

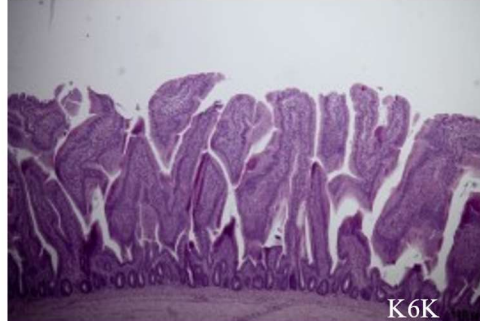
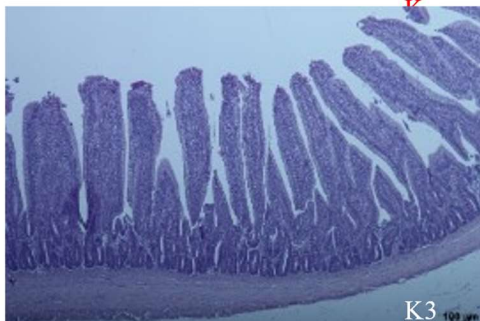
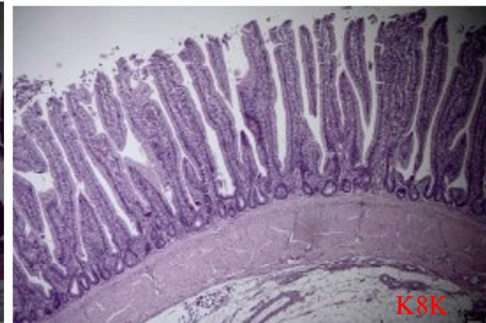
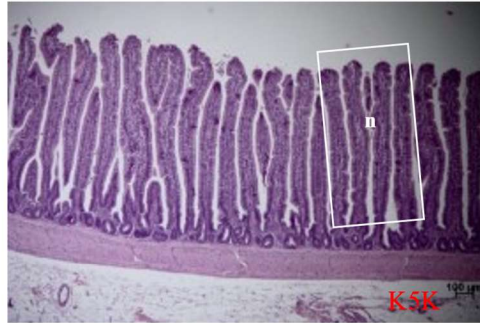
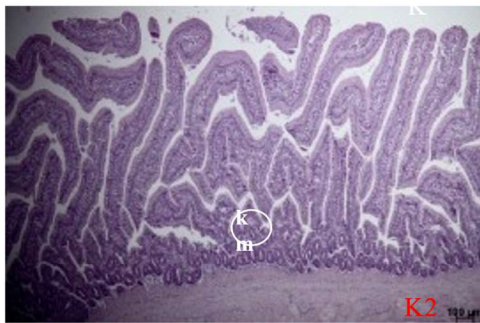
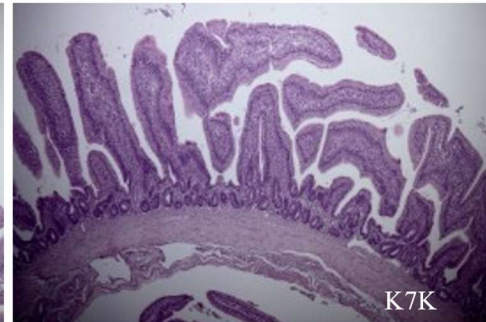
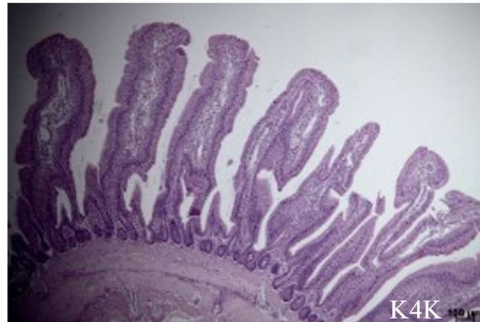
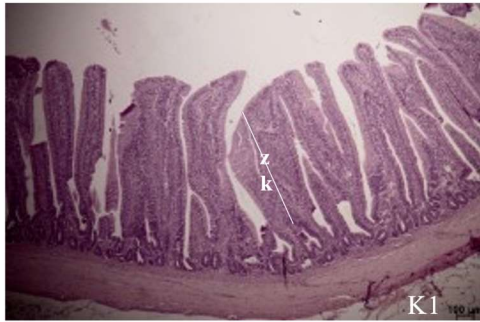


Fot. 9
Przekrój poprzeczny przez dwunastnicę, grupa C.



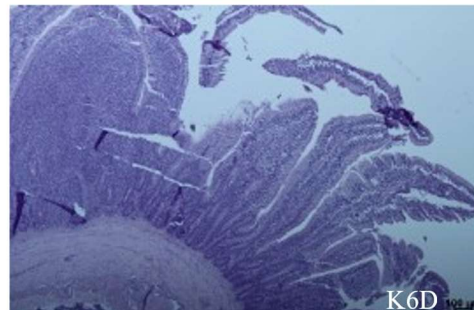
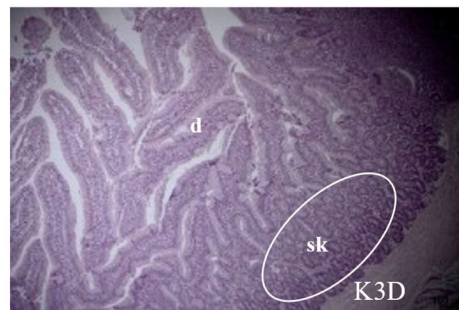
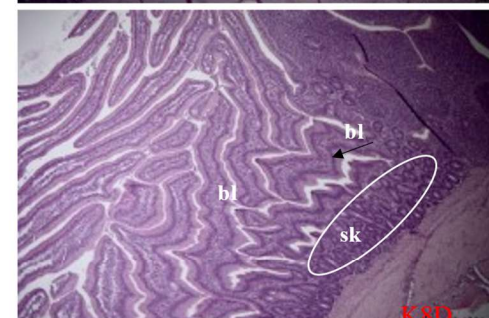
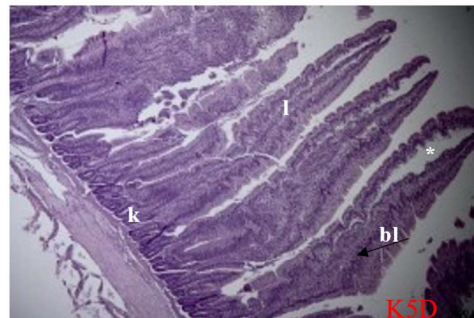
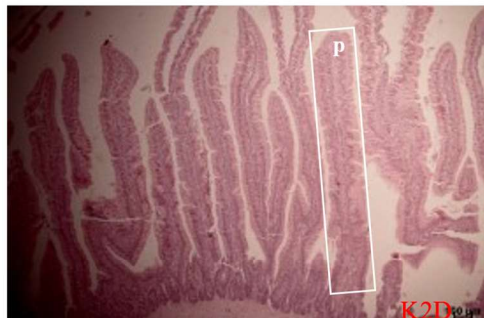
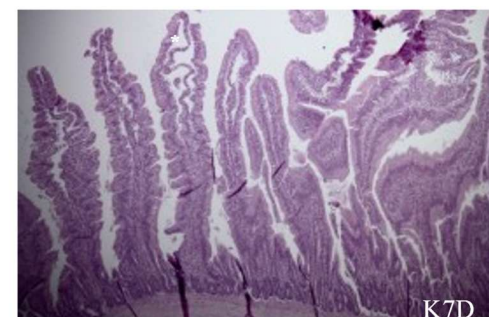
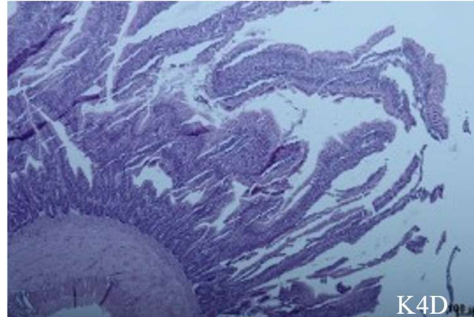
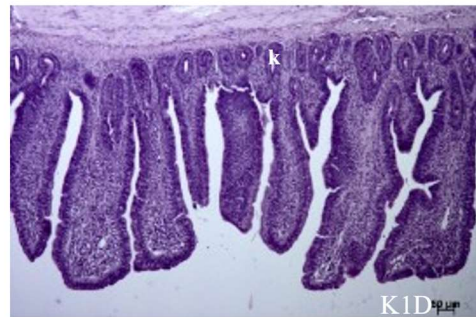
Fot. 10
Przekrój poprzeczny przez jelito biodrowe, grupa K:

- a – spłaszczony kosmek
- b – zaokrąglony kosmek
- c – kanciasty kosmek układający się w formie „dywanu”
- z – złane bocznie kosmki (linia ograniczająca boki kosmków)
- k – krypty
- m – warstwa mięśniowa
- w – wcięcia na bocznych krawędziach kosmka



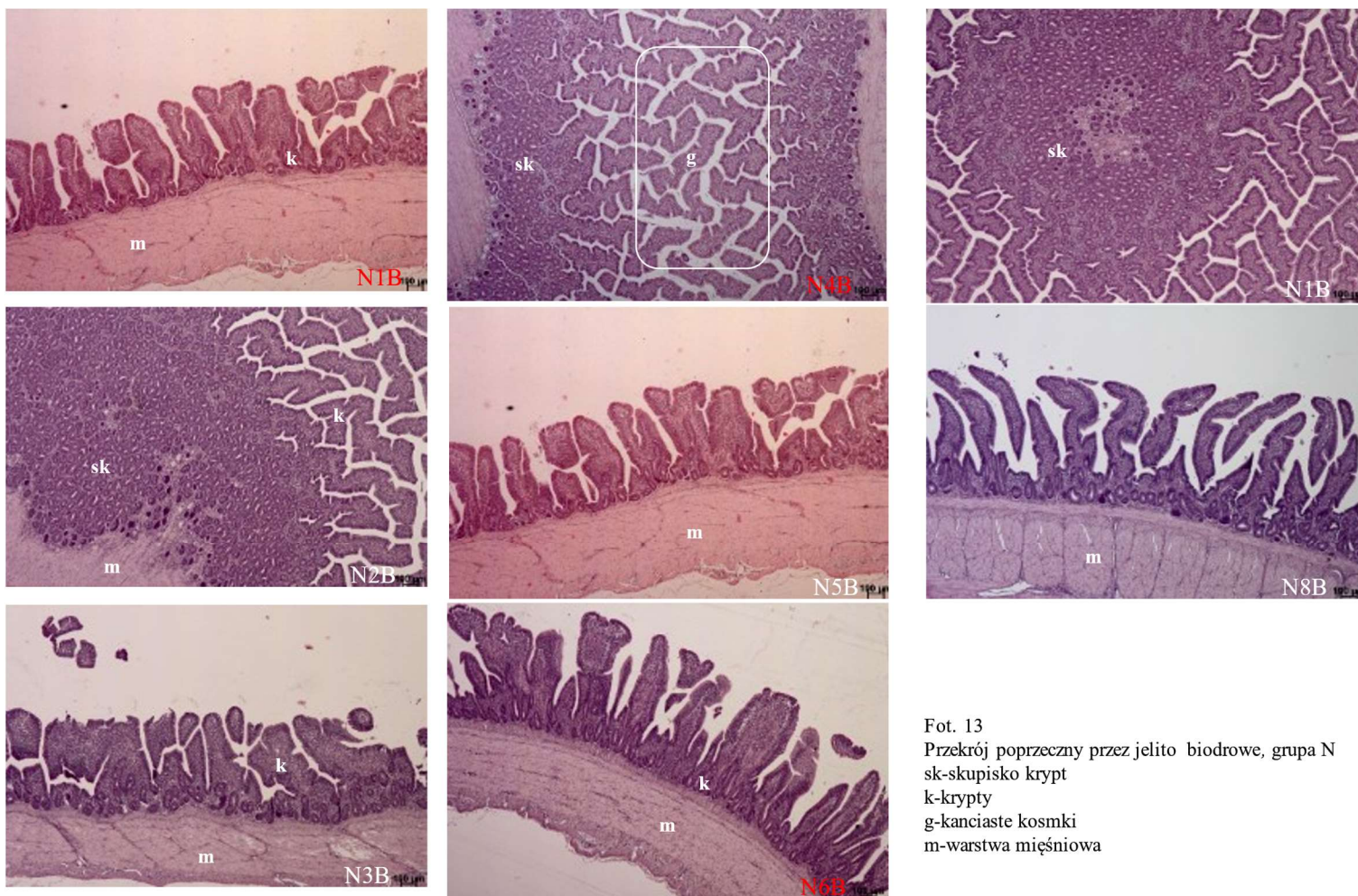
Fot. 11
Przekrój poprzeczny przez jelito kręte, grupa K

n-kosmki nitkowane
zk-kosmki złane bocznie
km-krypty migrujące

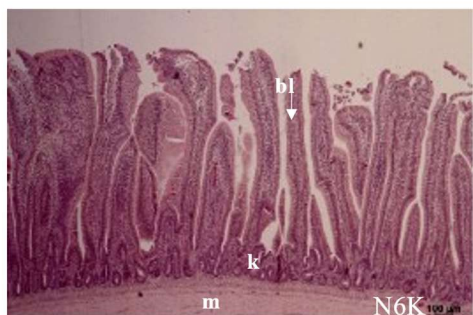
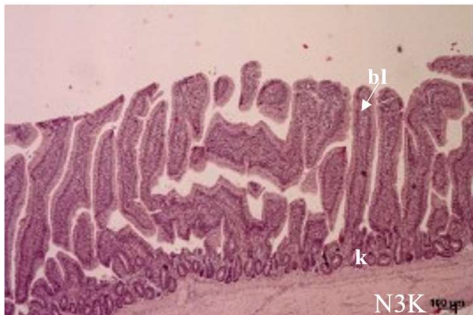
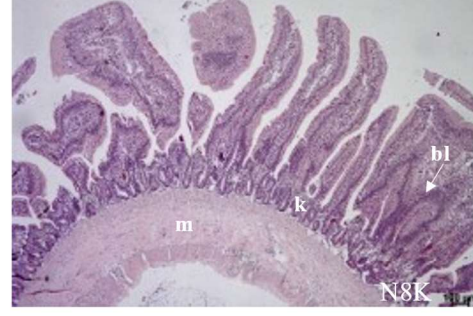
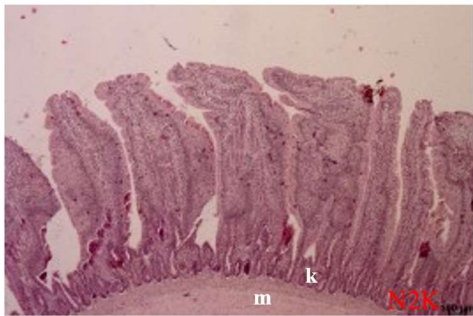
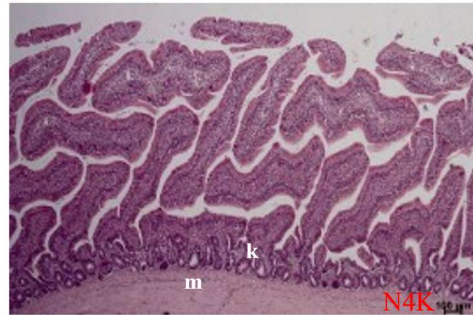
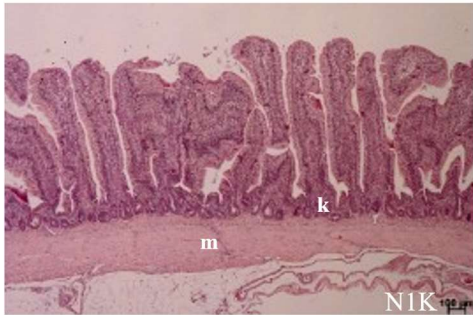


Fot. 12
Przekrój poprzeczny przez dwunastnicę, grupa K

- p-kosmek palczasty
- k-krypty
- l-kosmyk liściasty
- sk-skupisko krypt
- d- kosmki ułożone w formie „dywanu”
- *-zmiany apoptyczne
- bl-błaszka limfatyczna

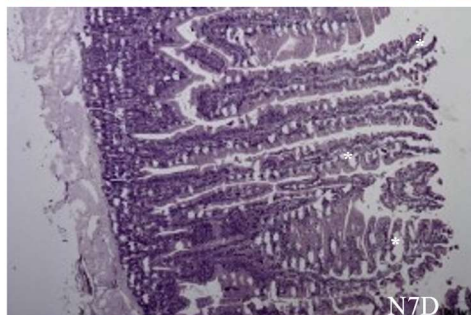
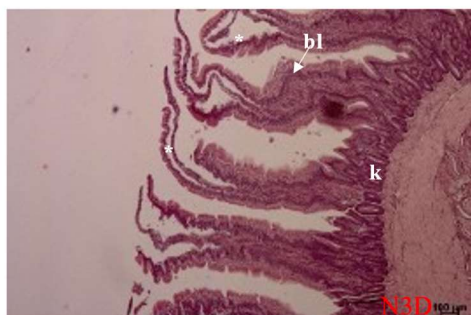
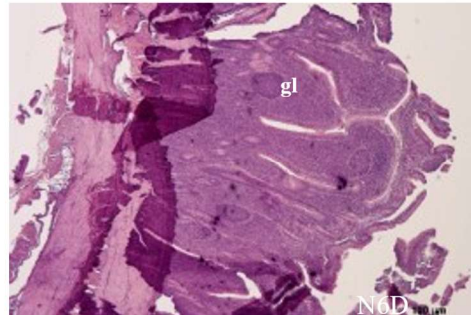
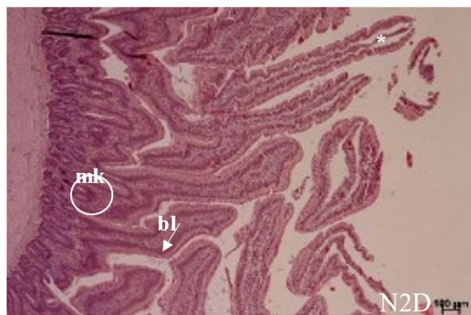
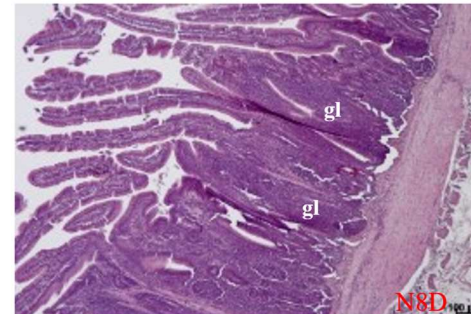
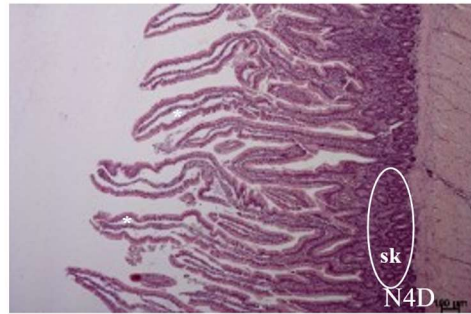
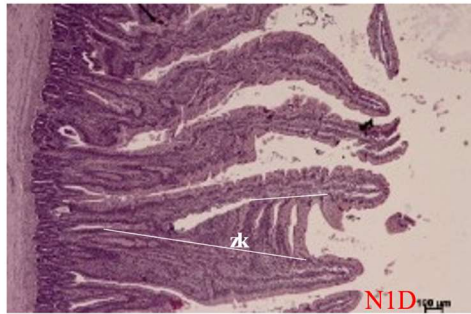


Fot. 13
 Przekrój poprzeczny przez jelito biodrowe, grupa N
 sk-skupisko krypt
 k-krypty
 g-kanciaste kosmki
 m-warstwa mięśniowa



Fot. 14
Przekrój poprzeczny przez jelito kręte, grupa N:

zk-kosmki złane bocznie (linia oddzielająca krawędzie boczne kosmków)
m-warstwa mięśniowa
k-krypty
bl-błazka limfatyczna

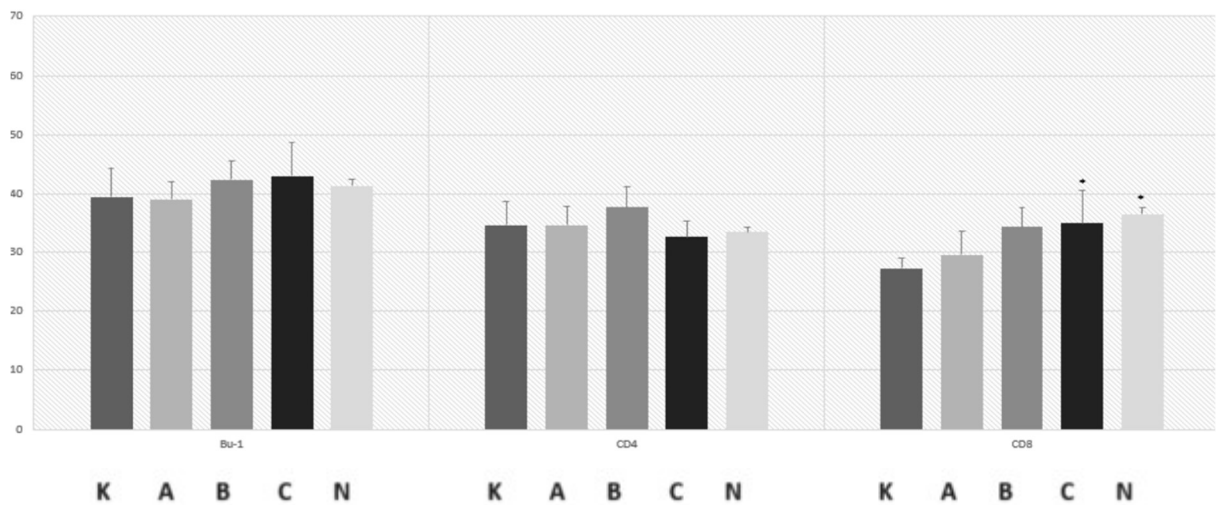


Fot. 15
Przekrój poprzeczny przez dwunastnicę, grupa N.

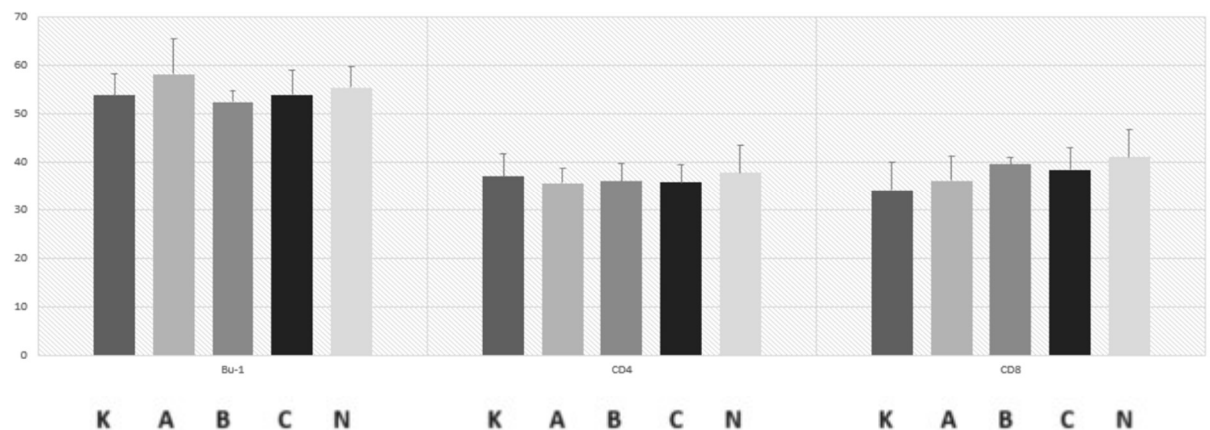
- * - zmiany apoptyczne
- gl - grudki limfatyczne
- bl - blaszki limfatyczne
- k - krypty
- sk - skupisko krypt
- zk - złane kosmki

5.5. Wyniki oceny immunohistematycznej

Ogólny efekt suplementów (grupy A, B, C) na układ immunologiczny ptaków nie spowodował immunostymulacji. Procent obszarów śledziony i migdałków jelitowych, które wykazywały obecność limfocytów Bu-1+, CD4+ i CD8+, nie wykazywał istotnych różnic w porównaniu z grupą kontrolną. Wyjątkiem była grupa C i kontrola pozytywna, które spowodowały wyższą liczbę komórek CD8+ w śledzionie w porównaniu z grupą kontrolną.

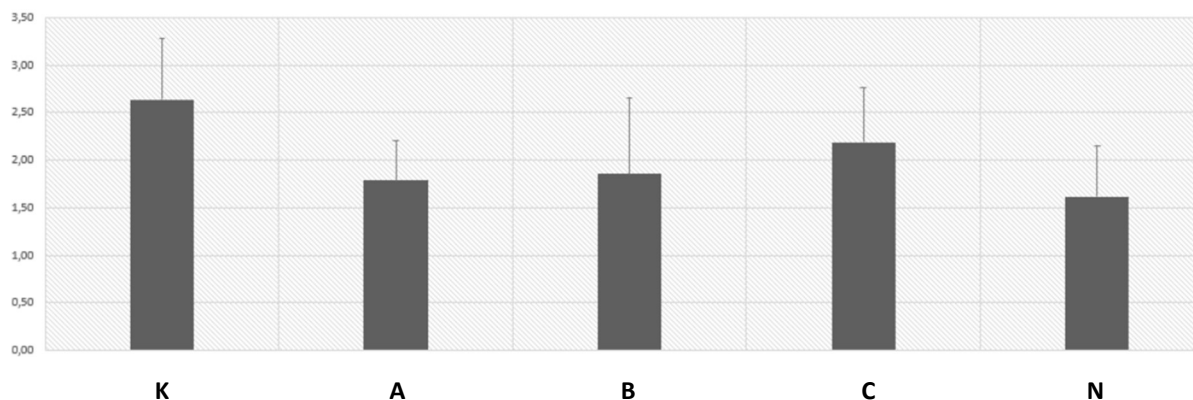


Wykres 1. Obszar zajmowany przez komórki pozytywne dla antygenów Bu-1, CD4, CD8 w migdałkach jelitowych



Wykres 2. Obszar zajmowany przez komórki pozytywne dla antygenów Bu-1, CD4, CD8 w śledzionie

Wykresy przedstawiają obszar zajmowany przez komórki pozytywne dla antygeny (średnia \pm SD, $n = 8$) w migdałkach jelitowych i śledzionie kurcząt w wieku 35 dni. K: kontrola, A: prototyp 1 100g, B: prototyp 1 200 g, C: prototyp 2 100g, N: kontrola pozytywna. Istotna różnica w porównaniu z grupą kontrolną została oceniona jako $*P < 0,05$.



Wykres 3. Średnie procentowe obszary (\pm SD), zajmowane przez wszystkie centra germinalne w polu widzenia
 K: kontrola, A: prototyp 1 0,01%, B: prototyp 1 0,02%, C: prototyp 2 0,01%, N: kontrola pozytywna.

Metabolity roślin są zdolne do modulowania układu immunologicznego poprzez kilka różnych mechanizmów. Zwiększona liczba limfocytów stanowi jedynie wierzchołek góry lodowej znacznie szerszego zakresu korzystnych efektów. Suplementacja ekstraktem roślinnym pomaga zwierzęciu być gotowym do reagowania na szkodliwe bodźce w różny sposób, zwiększając szanse na sukces. Badanie tych efektów na "zdrowych" osobnikach daje ogromną przewagę polegającą na obserwacji rodzaju "czasu zerowego", gdy organizm inwestuje w zapobieganie wystąpienia choroby, zamiast zwalczać ją. Ten moment jest również istotny dla obserwacji potencjalnych skutków ubocznych leczenia. W naszym badaniu nie zaobserwowano żadnych skutków ubocznych.

Wzrost liczby limfocytów CD8⁺ w śledzionie wydaje się wskazywać, że suplement prototyp 2 (razem z kontrolą pozytywną) może przyczyniać się do silniejszej ścieżki sygnalizacyjnej poprzez podklasę Th1. Wyniki te odzwierciedlają różne składy dodatków.

Kontrola pozytywna i formuła prototypu 2 są w rzeczywistości jedynymi preparatami zawierającymi fitobiotyki immunostymulujące (*Capiscuum Annum*, *Saponaria Officinalis* i *Acorus Calamus L.*) (Kolawole i in., 2017; Kuznetsova i in., 2014; Hyeri i in., 2009), które polaryzują odpowiedzi immunologiczne w kierunku typu Th1 (Kuznetsova i in., 2014; Hyeri i in., 2009). Badania z zastosowanie związków fitobiotycznych w wodzie pitnej u indyków wykazały znaczący wzrost procentowego udziału limfocytów T CD4⁺ w grasicy i śledzionie, limfocytów T CD8⁺ w migdałkach jelitowych i krwi oraz limfocytów T CD4⁺ CD8⁺ w grasicy i błonie śluzowej jelita (Koncicki i in., 2015), co potwierdza możliwość immunostymulacji ptaków także podczas krótkich okresów podawania takich preparatów.

Wyniki te nie mogą być interpretowane jako dowód na to, że prorotyp 1 w dawce 100 g i 200 g nie wywołały efektu immunomodulującego. Modulacja układu immunologicznego rzeczywiście obejmuje wiele różnych mechanizmów działania, które niekoniecznie prowadzą do wzrostu liczby białych krwinek (Maferati et al., 2021).

6. Wnioski

1. Prototyp 1 preparatu w żadnej dawce nie wywołał działania immunomodulującego natomiast prototyp numer 2 oraz preparat z grupy kontroli pozytywnej wywołały niewielką odpowiedź immunologiczną. Działanie immunostymulacyjne zależne jest od składu preparatu
2. Każdy z zastosowanych preparatów fitoncydowych wpływał pozytywnie na morfologię jelit kurcząt brojlerów zwiększając ich powierzchnię chłonną przy czym najefektywniej działał prototyp 1.
3. Komercyjny produkt zastosowany w kontroli pozytywnej silnie pobudzał jelita do odnowy i tworzenia nowych kosmków jelitowych.
4. Preparaty zawierające w swoim składzie naturalne substancje barwiące mogą wpływać na kolor tuszki.
5. Prototyp 1 preparatu wpływał korzystnie na zmniejszenie parametru wycieku termicznego mięśni udowych w dawce 0,02%
6. Żaden z testowanych preparatów fitoncydowych nie wpływał na pH mięsa.
7. Żaden z preparatów nie wpływał na właściwości oksydacyjne mięsa.
8. Preparat dostępny komercyjnie pozytywnie wpływał na właściwości sensoryczne mięsa w tym jego smak.
9. Prototyp 1 preparatu fitoncydowego w dawce 0,02% powodował większą masę ciała po 7 i po 35 dniach tuczu. Wykazywał on działanie podobne do antybiotykowego stymulatora wzrostu.
10. W przypadku preparatów fitoncydowych bardzo ważne jest określenie skutecznej dawki, ponieważ w zbyt niskim stężeniu mogą one nie działać właściwie. Proces taki wymaga przeprowadzenia doświadczeń w warunkach kontrolowanych.
11. Prototyp 1 spełnia założenia stawiane przed wdrożeniem i po przeprowadzeniu obserwacji terenowych zostanie wykorzystany komercyjnie.

7. Obserwacje wdrożeniowe

Wytypowany prototyp 1 preparatu został wyprodukowany w formie sypkiej w skali przemysłowej w fabryce firmy Adifeed. Następnie dodano 0,02% tego preparatu do mieszanek paszowych pełnoporcjowych dla kurcząt brojlerów kurników wytypowanych do testu terenowego. Mieszanki paszowe wyprodukowano w komercyjnej mieszalni pasz w formie granulatu o średnicy 3 mm.

Tabela 19 Skład mieszanek paszowych zastosowanych w obserwacji terenowej

	Starter	Grower- 1	Grower- 2	Finisz
Pszonica	47,66	50,66	47,83	46,3
Śruta sojowa	25,9	23,4	19,4	17,3
Kukurydza	15	15	15	15
Pszonczyto	5	5	11	15
Olej sojowy	1,8	2,45	3,3	3,2
Kreda pastewna	1,46	1,11	1,05	0,86
L-Lizyna HCl	0,91	0,48	0,52	0,5
DL-metionina	0,43	0,4	0,39	0,37
L-treonina	0	0,25	0,26	0,24
Premiks mineralno- witaminowy	0,25	0,25	0,25	0,25
Fosforan jednowapniowy	0,6	0,2	0	0
L-Arginina	0,22	0,19	0,25	0,25
L-Walina	0,2	0,18	0,2	0,19
Sól paszowa	0,2	0,18	0,16	0,16
L-Izoleucyna	0,17	0,05	0,19	0,18
Siarczan sodu	0,15	0,15	0,15	0,15
6-Fitaza	0,04	0,04	0,04	0,04
Ksylanaza, β-glukanaza	0,01	0,01	0,01	0,01

Tabela 20 Zawartość składników pokarmowych mieszanek paszowych zastosowanych w obserwacji terenowej

Energia Metaboliczna (kcal/kg)	2975	3050	3150	3180
Popiół surowy (g/kg)	53	45,8	39,88	36,41
Białko ogólne (g/kg)	205	190	180	170
Tłuszcz surowy (g/kg)	33,3	40,58	48,8	48,16
Włókno surowe (g/kg)	29	28,5	25,9	25,5
Fosfor mineralny (g/kg)	4,6	4,26	3,39	3,35
Wapń (g/kg)	8,4	6,5	5,5	4,5
Sód (g/kg)	1,6	1,45	1,4	1,4
Lizyna (g/kg)	13,58	12,31	11,61	10,95
Metionina (g/kg)	7	6,56	6,32	6
Treonina (g/kg)	9,38	8,6	8,13	7,68

Preparat fitoncydowy był jednym z elementów pozwalających na rozszerzenie działalności firmy o produkcję mięsa drobiowego bez wykorzystania antybiotyków.

Cykl przeprowadzono na fermie składającej się z 12 obiektów produkcyjnych podzielonych na dwa sektory po 6 obiektów, przystosowanych do prowadzenia tuczu kurcząt brojlerów.

Każda hala produkcyjna miała powierzchnię 2650 m², wyposażona była w kropelkowe linie pojenia, automatyczne karmidła, automatyczny system kontroli mikroklimatu, wentylację szczytową oraz nagrzewnice gazowe z zamkniętą komorą spalania.

Kurczęta pochodzące z tej samej wylęgarni wstawiono w ilości po 49 500 sztuk do wcześniej przygotowanych hal produkcyjnych. Tucz przeprowadzono w systemie ściółkowym na słomie pszennej. Pierwsze sześć hal stanowiła grupa referencyjna, w której zastosowano standardową metafilaktykę z wykorzystaniem antybiotyków oraz dodatku salinomycyny do paszy w ilości 70 mg/kg. Kolejne sześć hal wyznaczała grupa testowa zawierająca dodatek preparatu fitoncydowego w ilości 0,02% w której nie stosowano dodatku żadnych antybiotyków.

Mieszanki paszowe podawano kurczętom do woli z podziałem na okresy stosowania:

- mieszanka starter 0-10 dnia życia
- mieszanka grower-1 11-22 dnia życia
- mieszanka grower-2 23-33 dnia życia
- mieszanka finisz – powyżej 34 dnia życia.

Poniżej przedstawiono wyniki uzyskane po przeprowadzeniu cyklu produkcyjnego kurcząt brojlerów.

Tab. 21 Wyniki produkcyjne uzyskane w obserwacji terenowej

Parametr	Grupa referencyjna	Grupa z preparatem B	SEM	Wartość-P
Masa ciała (kg)	2,27	2,29	0,043	0,773
Śmiertelność (%)	3,95	4,41	0,241	0,358
FCR	1,65 ^a	1,6 ^b	0,0091	0,0004
EWW	357	352	5,841	0,679

Wyniki uzyskane na fermach zostały przeanalizowane statystycznie przy użyciu oprogramowania Statistica ver. 13.1. Normalność rozkładu danych oceniono testem Shapiro-Wilka. Jeśli dane posiadały rozkład normalny przeprowadzono test t-Studenta dla prób niezależnych. Jeśli dane nie miały rozkładu normalnego wykonano test U Manna-Whitney'a.

Nie wykazano różnic istotnych statystycznie w przypadku masy ciała, ilości upadków oraz EWW. Ptaki z grupy otrzymującej w paszy preparat B charakteryzowały się istotnie mniejszym wskaźnikiem FCR ($P < 0,05$). Co ważne, ptaki w grupie otrzymującej preparat B były utrzymywane w chowie bez wykorzystania antybiotyków i kokcydiostatyków. W przypadku grupy referencyjnej zastosowano standardową metafilaktykę oraz dodatek kokcydiostatyku jonforowego - salinomycyny.

Uzyskane wyniki na obu fermach są zbliżone, grupa, w której podano preparat fitoncydowy wykazała się lepszym wskaźnikiem konwersji pasz. Dowodzi to skuteczności zastosowanego preparatu i wskazuje możliwość komercyjnego wykorzystywania produktu w celu poprawy wyników produkcyjnych, w szczególności współczynnika konwersji paszy, a także jako środek wspomagający produkcję kurcząt brojlerów bez wykorzystania antybiotyków.

8. Piśmiennictwo

- 1 Abadi A.T.B., Rizvanov A.A., Haertlé T., Blatt N.L. 2019. *World Health Organization Report: Current Crisis of Antibiotic Resistance*. *BioNanoScience* 2019, 9, 778–788.
- 2 Abbas R. Z., Iqbal Z., Khan M. N., Zafar M. A., Zia M. A. 2010. *Anticoccidial activity of Curcuma longa L. in broilers*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 53, 63-67.
- 3 Abdel-Wareth A.A.A., Kehraus S., Südekum K.H. 2019. *Peppermint and its respective active component in diets of broiler chickens: growth performance, viability, economics, meat physicochemical properties, and carcass characteristics*. *Poult Sci.* 2019 Sep 1;98(9):3850-3859. doi: 10.3382/ps/pez099. PMID: 30877743.
- 4 Abu-Reidah I.M., Ali-Shtayeh M.S., Jamous, R.M., Arráez-Román D., Segura-Carretero A. 2015. *HPLC-DAD-ESI-MS/MS Screening of Bioactive Components from Rhus coriaria L. (Sumac) Fruits*. *Food Chem.* 2015, 166, 179–191.
- 5 Adams C., Vahl H.A., Veldman A. 1996. *Interaction between nutrition and Eimeria acervulina infection in broiler chickens: development of an experimental infection model*. *Br J Nutr.* (1996) 75:867–73. doi: 10.1079/BJN19960192
- 6 Adhikari P., Kiess A., Adhikari R., Jha R. 2020. *An approach to alternative strategies to control avian coccidiosis and necrotic enteritis*. *J Appl Poultry Res.* (2020) 29:515–34. doi: 10.1016/j.japr.2019.11.005
- 7 Ali H. , Naqvi F., Tariq N. 2014. *Prevalence of coccidiosis and its association with risk factors in poultry of Quetta, Pakistan*. *Asian J Appl Sci.* (2014) 2:4.
- 8 Aljedaie M. M., Al-Malki E. S. 2020. *Anticoccidial activities of Salvadora persica (arak), Zingiber officinale (ginger) and Curcuma longa (turmeric) extracts on the control of chicken coccidiosis*. *Journal of King Saud University-Science*, 32(6), 2810-2817.
- 9 Allen P.C., Fetterer R.H. 2002. *Recent advances in biology and immunobiology of Eimeria species and in diagnosis and control of infection with these coccidian parasites of poultry*. *Clin. Microbiol. Rev.*, 15 (2002), pp. 58-65

- 10 Alnassan A.A., Thabet A., Dauschies A., Bangoura B. 2015. *In vitro efficacy of allicin on chicken Eimeria tenella sporozoites*. Parasitology Research, 114(10): 3913-3915. DOI: <https://www.doi.org/10.1007/s00436-015-4637-2>
- 11 An B.K., Kim J.Y., Oh S.T., Kang C.W., Cho S., Kim S.K. 2015. *Effects of onion extracts on growth performance, carcass characteristics and blood profiles of white mini broilers*. AsianAustralasian Journal of Animal Science 28, (2), 247-251.
- 12 Apajalahti J., Vienola K. 2016. *Interaction between chicken intestinal microbiota and protein digestion*. Anim. Feed Sci. Technol., 221 (2016), pp. 323-330
- 13 Aviagen. 2018. *Ross broiler management handbook*
- 14 Aviagen. 2022. *Ross 308, Ross 308 FF Performance objectives*.
- 15 Aviagen. 2022. *Ross Nutrition Specifications all plant protein-based feeds*.
- 16 Azad MAK., Kikusato M., Maekawa T., Shirakawa H., Toyomizu M. 2010. *Metabolic characteristics and oxidative damage to skeletal muscle in broiler chickens exposed to chronic heat stress*. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol. 155:401–6. doi: 10.1016/j.cbpa.2009.12.011
- 17 Azad MAK., Kikusato M., Zulkifli I., Toyomizu M. 2013. *Electrolysed reduced water decreases reactive oxygen species-induced oxidative damage to skeletal muscle and improves performance in broiler chickens exposed to medium-term chronic heat stress*. Br Poult Sci. 54:503–9.
- 18 Barekatin M.R. , Antipatis C. , Rodgers N. , Walkden-Brown S.W. , Iji P.A. , Choct N. 2013. *Evaluation of high dietary inclusion of distillers dried grains with solubles and supplementation of protease and xylanase in the diets of broiler chickens under necrotic enteritis challenge*. Poult. Sci., 92 (2013), pp. 1579-1594
- 19 Barnes D.M., Kirby Y.K., Oliver K.G. 2001. *Effects of biogenic amines on growth and the incidence of proventricular lesions in broiler chickens*. Poult. Sci., 80 (2001), pp. 906-911
- 20 Barug D. , de Jong J., Kies A.K., Versteegen M. 2006. *Antimicrobial Growth Promoters: Where Do We Go from Here?*, Wageningen Academic Publishers, Wageningen, the Netherlands (2006), pp. 19-51

- 21 Basit M. A., Kadir A. A., Loh T. C., Abdul Aziz S., Salleh A., Zakaria Z. A., Banke Idris S. 2020. *Comparative efficacy of selected phytobiotics with halquinol and tetracycline on gut morphology, ileal digestibility, cecal microbiota composition and growth performance in broiler chickens*. *Animals* 2020, 10, 2150.
- 22 Befus A.D., Johnston N., Leslie G.A., Bienenstock J. 1980. *Gut-associated lymphoid tissue in the chicken. I. Morphology, ontogeny, and some functional characteristics of Peyer's patches*. *J Immunol.* 1980;125:2626–32.
- 23 Biancone L., Monteleone I., Blanco G.D.V., Vavassori P., Pallone F. 2002. *Resident bacterial flora and immune system*. *Dig. Liver Dis.*, 34 (2002), pp. 37-43
- 24 Blake D.P., Knox J., Dehaeck B., Huntington B., Rathinam T., Ravipati V., Ayoade S., Gilbert W., Adebambo A.O., Jatau I.D., Raman M., Parker D., Rushton J., Tomley F.M. 2020 *Re-calculating the cost of coccidiosis in chickens*. *Vet Res.* 2020 Sep 14;51(1):115. doi: 10.1186/s13567-020-00837-2. PMID: 32928271; PMCID: PMC7488756.
- 25 Bölükbaşı Ş.C., Erhan M.K., Özkan A., 2006. *Effect of dietary thyme oil and vitamin E on growth, lipid oxidation, meat fatty acid composition and serum lipoproteins of broilers*. *S. Afr. J. Anim. Sci.* 36, 189–196.
- 26 Brandtzaeg P. 1984. *Immune functions of human nasal mucosa and tonsils in health and disease*. In *Immunology of the Lung and Upper Respiratory Tract*, Edited by: Bienenstock, J. 28–95. New York: McGraw-Hill.
- 27 Burkholder K.M., Thompson K.L., Einstein M.E., Applegate T.J., Patterson J.A. 2008. *Influence of stressors on normal intestinal microbiota, intestinal morphology, and susceptibility to Salmonella enteritidis colonization in broilers*. *Poult. Sci.* (2008) 87:1734–41. doi: 10.3382/ps.2008-00107
- 28 Burt S. 2004. *Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review*. *Int J Food Microbiol.* 94:223–253.
- 29 Burt S.A., Tersteeg-Zijderveld M.H., Jongerius-Gortemaker B.G., Vervelde L., Vernooij J.C. 2013. *In vitro inhibition of Eimeria tenella invasion of epithelial cells by phytochemicals*. *Veterinary Parasitology*,
- 30 Castañeda M.P., Hirschler E.M., Sams A.R. 2005. *Skin pigmentation evaluation in broilers fed natural and synthetic pigments*. *Poultry Sci.*, 84: 143–147

- 31 Cervantes H.M., McDougald L.R., Jenkins M.C. 2020. *Coccidiosis* In: Diseases of Poultry, Volume II. Fourteenth Edition. Editor-in-chief David E. Swayne: John Wiley & Sons, Inc. (2020). p. 1193–217.
- 32 Chapman H.D., Jeffers T.K. 2014. *Vaccination of chickens against coccidiosis ameliorates drug resistance in commercial poultry production*. Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist. 2014;4:214–217. doi: 10.1016/j.ijpddr.2014.10.002
- 33 Chapman HD. 2014. *Milestones in avian coccidiosis research: a review*. *Poult Sci J.* (2014) 93:501–11. doi: 10.3382/ps.2013-03634
- 34 Cheng H., Leblond C.P. 1974. *Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine I. Columnar cell*. Am. J. Anat. 1974;141:461–479. doi: 10.1002/aja.1001410403.
- 35 Cherian G., Orr A., Burke I.C., Pan W. 2013. *Feeding Artemisia annua alters digesta pH and muscle lipid oxidation products in broiler chickens*. Poult Sci. 92:1085–1090.
- 36 Chrubasik S., Pittler M.H., Roufogalis B.D. 2005. *Zingiberis rhizoma: a comprehensive review on the ginger effect and efficacy profiles*. Phytomedicine. 12:684–701.
- 37 Ciftci M., Güler T., Dalkiliç B., Ertas O. N. 2005. *The Effect of Anise Oil (Pimpinella anisum L.) On Broiler Performance*. International Journal of Poultry Science 4 (11): 851-855, 200
- 38 Collier C.T., Hofacre C.L., Payne A.M., Anderson D.B., Kaiser P., Mackie R.I., et al. 2008. *Coccidia-induced mucogenesis promotes the onset of necrotic enteritis by supporting Clostridium perfringens growth*. Vet Immunol Immunopathol. (2008) 122:104–15. doi: 10.1016/j.vetimm.2007.10.014
- 39 Craven S.E., Stern N.J., Bailey J.S., Cox N.A. 2001. *Incidence of Clostridium perfringens in broiler chickens and their environment during production and processing*. Avian Dis. 2001 Oct-Dec;45(4):887-96. PMID: 11785893.
- 40 Crosnier C., Stamatakis D., Lewis J. 2006. *Organizing cell renewal in the intestine: Stem cells, signals and combinatorial control*. Nat. Rev. Genet. 2006;7:349–359. doi: 10.1038/nrg1840
- 41 Cuppett S.L., Hall C.A. 1998. *Antioxidant activity of the Labiatae*. Adv Food Nutr Res. 42:245–271.

- 42 Dahiya J.P., Hoehler D., Van Kessel A.G., Drew M.D. 2007. *Effect of different dietary methionine sources on intestinal microbial populations in broiler chickens*. *Poult. Sci.*, 86 (2007), pp. 2358-2366
- 43 Darsham S., Doreswamug R. 2004. *Patented anti-inflammatory plant drug development from traditional medicine*. *Phytother Res.* 18:343–357.
- 44 Daş B. D., Daş A., Koyuncu İ., Bilal O., Çetin M., Kırar N., Şengül A. Y. 2020. *Bıldırcın rasyonlarına nane yağı ilavesinin besi performansı, et kalitesi, karkas kompozisyonu ve oksidatif stres belirleyicileri üzerine etkisi*. *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi*, 7(1), 186-194.
- 45 Davies J. 2019. *Slow-growing birds are fast becoming mainstream*. *Poultry World*. <https://www.poultryworld.net/Meat/Articles/2019/7/Slow-growing-birds-are-fast-becoming-mainstream-454287E/>
- 46 De Gussem M. 2007. *Coccidiosis in poultry: review on diagnosis, control, prevention and interaction with overall gut health*. In *Proceedings of the XVI European Symposium on Poultry Nutrition* (pp. 160 169 . Strasbourg , France .
- 47 Dibner J.J., Richards J.D. 2005. *Antibiotic growth promoters in agriculture: History and mode of action*. *Poult. Sci.*, 84 (2005), pp. 634-643
- 48 Djordjevic S.P., Morgan B.S. 2019. *A One Health genomic approach to antimicrobial resistance is essential for generating relevant data for a holistic assessment of the biggest threat to public health*. *Microbiol. Aust.* 2019, 40, 73–76.
- 49 Donoghue D.J. 2003. *Antibiotic residues in poultry tissues and eggs: Human health concerns?* *Poult. Sci.*, 82 (2003), pp. 618-621
- 50 Drew M.D., Syed N.A., Goldade B.G., Laarveld B., Van Kessel A.G. 2004. *Effects of dietary protein source and level on intestinal populations of Clostridium perfringens in broiler chickens*. *Poult. Sci.*, 83 (2004), pp. 414-420
- 51 El-Deek A. A., Al-Harhi M. A., Osman M., Al-Jassas F., Nassar, R. 2012. *Hot pepper (Capsicum Annum) as an alternative to oxytetracycline in broiler diets and effects on productive traits, meat quality, immunological responses and plasma lipids*. *European Poultry Science*, 76(2), 73-80.
- 52 Fabri T.H.F. 2000 . *Necrotic enteritis, Clostridial enteritis or dysbacteriosis?* In *Proceedings of the Elanco Symposium . Cork, Ireland .*

- 53 Farmakopea Polska X, Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne, Warszawa: Urząd Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych, 2014, s. 4276, ISBN 978-83-63724-47-4.
- 54 Felici M., Tugnoli B., Ghiselli F., Massi P., Tosi G., Fiorentini L., Piva A., Grilli E. 2020. *In vitro anticoccidial activity of thymol, carvacrol, and saponins*. *Poultry Science*, 99(11): 5350-5355. DOI: <https://www.doi.org/10.1016/j.psj.2020.07.035>
- 55 Ferrando C., Vergara P., Jiménez M., Goñalons E., 1987. *Study of the rate of passage of food with chromium-mordanted plant cells in chickens (Gallus gallus)*. *J. Exp. Physiol.* 72 (3), 251e259.
- 56 Fletcher D. L., Qiao M., Smith D. P. 2000. *The Relationship of Raw Broiler Breast Meat Color and pH to Cooked Meat Color and pH*. *Poult. Sci.* 79, 784–788. doi:10.1093/ps/79.5.784
- 57 Fletcher D. L. 1999. *Broiler breast meat color variation, pH and texture*. *Poult Science* 1999;78:1323–27.
- 58 Franz C., Baser K.H.C., Windisch W. 2010. *Essential oils and aromatic plants in animal feeding – a European perspective. A review*. *Flavour Frag J.* 25:327–340.
- 59 Gao Y., Yeh H.Y., Bowker B., Zhuang H. 2021. *Effects of different antioxidants on quality of meat patties treated with in-package cold plasma*. *Innov. Food Sci. Emerg. Tech.*, 70:102690
- 60 Gaskins H.R., Collier C.T., Anderson D.B. 2002. *Antibiotics as growth promotants: Mode of action*. *Anim. Biotechnol.*, 13 (2002), pp. 29-42
- 61 Gaucher M.L., Quessy S., Letellier A., Arsenault J., Boulianne M. 2015. *Impact of a drug-free program on broiler chicken growth performances, gut health, Clostridium perfringens and Campylobacter jejuni occurrences at the farm level*. *Poult. Sci.*, 94 (2015), pp. 1791-1801
- 62 Gea-Banacloche J.C. 2006. *Principles of Molecular Medicine*. Humana Press; Totowa, NJ, USA: 2006. Immunomodulation; pp. 893–904.
- 63 Geyra A., Uni Z., Sklan D. 2001. *The effect of fasting at different ages on growth and tissue dynamics in the small intestine of the young chick*. *Br. J. Nut.*, 86 (2001), pp. 53-61

- 64 Gheisar M.M., Zhao P. Kim I.H. 2018. *Addition of phytogetic blend in different nutrient density diets of meat-type ducks*, *Journal of Applied Animal Research*, 46:1, 854-859, DOI: 10.1080/09712119.2017.1411265
- 65 Giannenas I., Bonos E., Filliouis G., Stylianaki I., Kumar P., Lazari D., Christaki E., Florou-Paneri P. 2019. *Effect of a polyherbal or an arsenic-containing feed additive on growth performance of broiler chickens, intestinal microbiota, intestinal morphology, and lipid oxidation of breast and thigh meat*. *J. Appl. Poultry Res.* 2019, 28, 164-175.
- 66 Giannenas I., Florou-Paneri P., Botsoglou N.A., Christaki E., Spais A.B. 2005. *Effect of supplementing feed with oregano and (or) alpha-tocopheryl acetate on growth of broiler chickens and oxidative stability of meat*. *J Anim Feed Sci.* 14:521–535.
- 67 Goldstein DL., Skadhauge E. 2000. *Renal and Extrarenal Regulation of Body fluid composition*. In G.C Whittow (ed.) *Sturkies avian physiology*. Academic press San Diego, California, 2000. 265-297,
- 68 Habibi H., Firouzi S., Nili H., Razavi M., Asadi S.L., Daneshi S. 2016. *Anticoccidial effects of herbal extracts on Eimeria tenella infection in broiler chickens: In vitro and in vivo study*. *Journal of Parasitic Diseases*, 40(2): 401-407. DOI: <https://www.dx.doi.org/10.1007%2Fs12639-014-0517-4>
- 69 Haghghi H.R., Abdul-Careem M.F., Dara R.A., Chambers J.R., Sharif S. 2008. *Cytokine gene expression in chicken cecal tonsils following treatment with probiotics and Salmonella infection*. *Veterinary Microbiology*, 126: 225–233.
- 70 Hans C. 2013. *The Intestinal Crypt, A Prototype Stem Cell Compartment*. *Cell*. 2013;154:274–284
- 71 Hargis B. M. 2023. *Overview of Necrotic Enteritis in Poultry*. Department of Poultry Science, Dale Bumpers College of Agricultural, Food and Life Sciences, University of Arkansas and the Arkansas Agricultural Experiment Station, UA Division of Agriculture. <https://www.msdtvetmanual.com/poultry/necrotic-enteritis/overview-of-necrotic-enteritis-in-poultry>
- 72 Havenstein G. B., Ferket P. R., Qureshi M. A. . 2003. *Growth, Livability, and Feed Conversion of 1957 versus 2001 Broilers When Fed Representative 1957 and 2001 Broiler Diets*. *Poultry Science* 85: 1500–1508. doi:10.1093/ps/82.10.1500.

- 73 Herawati M. 2011. *The effect of feeding red ginger (Zingiber officinale rose) as phytobiotic on broiler slaughter weight and meat quality*. International Journal of Poultry Science 10 (12), 983-985
- 74 Hermans P.G. , Morgan K.L. 2007. *Prevalence and associated risk factors of necrotic enteritis on broiler farms in the United Kingdom; a cross-sectional survey*. Avian Pathol., 36 (2007), pp. 43-51
- 75 Hirakawa R, Nurjanah S, Furukawa K, Murai A, Kikusato M, Nochi T, Toyomizu M. 2020. *Heat Stress Causes Immune Abnormalities via Massive Damage to Effect Proliferation and Differentiation of Lymphocytes in Broiler Chickens*. Front Vet Sci. 2020 Feb 7;7:46. doi: 10.3389/fvets.2020.00046. PMID: 32118068; PMCID: PMC7020782.
- 76 Hocking, P. M. 2014. *Unexpected Consequences of Genetic Selection in Broilers and Turkeys: Problems and Solutions*. British Poultry Science 55: 1–12. doi:10.1080/00071668.2014.877692.
- 77 Hodges R.D. 1974. *The Histology of the Fowl* 84 180–187 . London : Academic Press .
- 78 Huff G.R., Huff W.E., Rath N.C., De Solis Los Santos F., Farnell M.B., Donoghue A.M. 2007. *Influence of hen age on the response of turkey poults to cold stress, Escherichia coli challenge, and treatment with a yeast extract antibiotic alternative*. Poultry Science, 86 (2007), pp. 636-642
- 79 Hussein E.O.S., Ahmed S.H., Abudabos A.M., Aljumaah M.R., Alkhulaifi M.M., Nassan M.A., Suliman G.M., Naiel M.A.E., Swelum A.A. 2020. *Effect of Antibiotic, Phytobiotic and Probiotic Supplementation on Growth, Blood Indices and Intestine Health in Broiler Chicks Challenged with Clostridium perfringens*. Animals 2020, 10, 507. <https://doi.org/10.3390/ani10030507>
- 80 Hyeri K., Tae-Ho H., Seong-Gen L. 2009. *Anti-inflammatory activity of a water extract of Acorus calamus L. leaves on keratinocyte HaCaT cells*. Journal of Ethnopharmacology, 2009, Vol. 122 (1), Pp. 149-156
- 81 Iwiński H., Wódz K., Chodkowska K., Nowak T., Rózański H. 2022. *In Vitro Evaluation of Antimicrobial Effect of Phytobiotics Mixture on Salmonella spp. Isolated from Chicken Broiler*. Antibiotics (Basel). 2022 Jun 28;11(7):868. doi: 10.3390/antibiotics11070868. PMID: 35884122; PMCID: PMC9312233.

- 82 Iwiński H., Chodkowska K.A., Drabik K., Batkowska J., Karwowska M., Kuroпка P., Szumowski A., Szumny A., Rózański H. 2023. *The Impact of a Phytobiotic Mixture on Broiler Chicken Health and Meat Safety*. *Animals*. 2023; 13(13):2155. <https://doi.org/10.3390/ani13132155>
- 83 Janardhana, V., Broadway, M.M., Bruce, M.P., Lowenthal, J.W., Geier, M.S., Hughes, R.J. and Bean, A.G. 2009. *Prebiotics modulate immune responses in the gut-associated lymphoid tissue of chickens*. *The Journal of Nutrition*, 139: 1404–1409.
- 84 Jang A., Ham J.A., Kim D.W., Chae H.S., Kim D.W., Kim S.H., Seol K.H., Oh M.W., Kim D.H., 2011. *Effect of quercetin and methoxylated quercetin on chicken thigh meat quality during cold storage*. *Korean Journal Poultry Science* 38, 265-273.
- 85 Jang I.S., Ko Y.H., Kang S.Y, Lee C.Y. 2007. *Effect of commercial essential oils on growth performance, digestive enzyme activity and intestinal microflora population in broiler chickens*. *Animal Feed Science and Technology*, Volume 134, Issues 3–4, 2007, Pages 304-315, ISSN 0377-8401, <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2006.06.009>.
- 86 Jones PJ., Niemi J., Christensen J-P., Tranter RB., Bennett RM. 2018. *A review of the financial impact of production diseases in poultry production systems*. *Anim Prod Sci*. <https://doi.org/10.1071/AN18281>.
- 87 Julian R. J. 1998. *Rapid Growth Problems: Ascites and Skeletal Deformities in Broilers*. *Poultry Science* 77: 1773–1780. doi:10.1093/ps/77.12.1773.
- 88 Kamatou G.P.P, Viljoen A.M. 2010. *A review of the application and pharmacological properties of α -bisabolol and α -bisabolol-rich oils*. *J Am Oil Chem Soc*. 87:1–7.
- 89 Kaukonen E., Norring M., Valros A. 2016. *Effect of litter quality on foot pad dermatitis, hock burns and breast blisters in broiler breeders during the production period*. *Avian Pathol*. 2016;45:667–673.
- 90 Kelly D., Smyth J. A., McCracken K. J. 1991. *Digestive development of the early-weaned pig. 1. Effect of continuous nutrient supply on the development of the digestive tract and on changes in digestive enzyme activity during the first week post-weaning*. *British Journal of Nutrition* 65(2), 169-180.

- 91 Kevin Li D.A., Meujo D.A., Hamann M.T. 2009. *Polyether ionophores: broad-spectrum and promising biologically active molecules for the control of drug-resistant bacteria and parasites*. *Expert Opin Drug Discov.* 2009 Feb;4(2):109-46. doi: 10.1517/17460440802661443
- 92 Khalafalla R. E., Müller U., Shahiduzzaman M. D., Dyachenko V., Desouky A. Y., Alber G., Dausgchies A. 2011. Effects of curcumin (diferuloylmethane) on *Eimeria tenella* sporozoites in vitro. *Parasitology research*, 108, 879-886.
- 93 Khan I.A., Parker N.B., Löhr C.V., Cherian G. 2021. *Docosahexaenoic acid (22:6 n-3)-rich microalgae along with methionine supplementation in broiler chickens: effects on production performance, breast muscle quality attributes, lipid profile, and incidence of white striping and myopathy*. *Poultry Sci.*, 100: 865–874
- 94 Khatun A., Das S.C., Ray B.C., Ahmed T., Hashem M.A., Khairunnesa M., Roy B.C. 2023. *Effects of feeding phytobiotics on growth performance, breast meat quality, blood biochemical indices, and liver enzymes of broiler chickens*. *Europ. Poult. Sci.*, 87. 2023, ISSN 1612-9199, DOI: 10.1399/eps.2023.374
- 95 Kim S., Park K., Hwang K.I. 2008. *Composition of Main Carotenoids in Korean Red Pepper (Capsicum annuum, L) and Changes of Pigment Stability During the Drying and Storage Process*. *Journal of Food Science*, volume 69, Issue 1, January 2004. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb17853.x>
- 96 Kim S.Y., Choi J.H., Choi Y.S., Kim H.Y., Ahn K.I., Kim H.W., et al. 2012. *Effects of low-temperature tumbling on the quality characteristics of restructured chicken breast ham*. *Korean J Food Sci Anim Resour.* 2012;32:268–73. doi: 10.5851/kosfa.2012.32.3.268.
- 97 Kırar N., Bilal O., Aydın D. A. Ş., Koyuncu İ., Mehmet A. V. C. I., Bozkaya F., Tufan T. 2020. *Bıldırcın rasyonlarına farklı oranlarda sumak (Rhus Coriaria L.) ilavesinin besi performansı, oksidatif stres parametreleri ve et kalitesi üzerine etkisi*. *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 9(2), 177-182
- 98 Kitessa S.M., Young P., 2009. *Echium oil is better than rapeseed oil in enriching poultry with n-3 PUFA, including eicosapentaenoic acid and docosapentaenoic acid*. *Brit. J. Nutr.* 101, 709–715.
- 99 Knarreborg A. , Simon M.A. , Engberg R.M. , Jensen B.B. , Tannock G.W. 2002. *Effects of dietary fat source and subtherapeutic levels of antibiotic on the*

- bacterial community in the ileum of broiler chickens at various ages*. Appl. Environ. Microb., 68 (2002), pp. 5918-5924
- 100 Kolawole D. Kolawole A., Ndelekwute E.K., Alabi O.M., Rotimi O. 2017. *Hot Red Pepper (Capsicum annum L.) Meal Enhanced the Immunity, Performance and Economy of Broilers Fed in Phases*. Journal of Biology, Agriculture and Healthcare Vol.7, No.8, 2017
- 101 Koncicki A., Śmiałek M., Tykałowski B., Pestka D., Stenzel T. 2015. *The influence of phytoncides on the immune system of broiler chickens and turkeys*. Cent Eur J Immunol. 2015;40(3):287-91. doi: 10.5114/ceji.2015.54588. Epub 2015 Oct 15. PMID: 26648771; PMCID: PMC4655377.
- 102 Konkol D.; Korzeniowska M.; Róžański H.; Górniak W., Andrys M. Opaliński S., Popiela E., Korczyński M. 2021. *The Use of Selenium Yeast and Phytobiotic in Improving the Quality of Broiler Chicken Meat*. Foods 2021, 10, 2558. <https://doi.org/10.3390/foods10112558>
- 103 Kostadinović L., Puvača N., Popović S., Lević J. 2015. *Botanical supplements as anti-coccidial alternatives in poultry nutrition*. World's Poult. Sci. J. 2015, 71, 27–36.
- 104 Kuznetsova T.A., Ivanushko L.A., Makarenkova I.D., Cherevach E.I., Ten'kovskaya L.A. 2014. *Effects of S. Officinalis L. Radix Triterpene Glycosides on Innate Immunity Factors*. Bull Exp Biol Med 156, 366–369 (2014). <https://doi.org/10.1007/s10517-014-2350-2>
- 105 Labro M.-T. 2000. *Interference of antibacterial agents with phagocyte functions: immunomodulation or “immuno-fairy tales”?*. Clin. Microbiol. Rev., 13 (2000), pp. 615-650
- 106 Lambert R.J.W., Skandamis P.N., Coote P.J., Nychas G.J.E. 2001. *A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol*. Appl Microbiol. 91:453–462.
- 107 Lee S. H., Lillehoj H. S., Park D. W., Jang S. I., Morales A., García D., Lillehoj E. P. 2009. *Induction of passive immunity in broiler chickens against Eimeria acervulina by hyperimmune egg yolk immunoglobulin Y*. Poultry science, 88(3), 562-566.

- 108 Li C., Lillehoj H.S., Gadde U.D., Ritter D., Oh S. 2017. *Characterization of Clostridium perfringens strains isolated from healthy and necrotic enteritis-afflicted broiler chickens*. Avian Dis. 2017, 61, 178–185.
- 109 Li L., Chen X., Zhang K., Tian G., Ding X., Bai S., Zeng Q. 2023. *Effects of Thymol and Carvacrol Eutectic on Growth Performance, Serum Biochemical Parameters, and Intestinal Health in Broiler Chickens*. Animals. 2023; 13(13):2242. <https://doi.org/10.3390/ani13132242>
- 110 Liu R.H. 2004. *Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action*. J Nutr. 2004;134:3479S–85S. doi: 10.1093/jn/134.12.3479S.
- 111 Lynch N.M., Kastner C.L., Kropf D.H. 1986. *Consumer acceptance of vacuum packaged ground beef as influenced by product color and educational materials*. J. Food Sci., 1986; 51(2): 253-255.
- 112 Łukasiewicz M., Michalczyk M., Pietrzak D., Niemiec J. 2014. *Effects of adiCox (R) AP and monensin on production parameters and quality of meat of slow-growing Hubbard JA 957 broiler chickens*. South African Journal of Animal Science 2014, 44 (No. 2)
- 113 MacDonald T.T., Monteleone G. 2005. *Immunity, inflammation, and allergy in the gut*. Science, 307 (2005), pp. 1920-1925
- 114 Mancini R.A., Hunt M.C. 2005. *Current research in meat color*. Meat Sci., 71: 100–121.
- 115 Marcinčák S., Cabadaj R., Popelka P., Šoltýsová L., 2008. *Antioxidative effect of oregano supplemented to broilers on oxidative stability of poultry meat*. Slov. Vet. Res. 45 (2), 61–66.
- 116 Marcinčák S., Mesarčová L., Popelka P., Čertík M., Šimková J., Marcinčáková D., Maľa P., Zachar P., Mártonová M., 2011. *The influence of dietary supplementation with Melissa officinalis and combination of Achillea millefolium and Crataegus oxyacantha on oxidative stability of stored poultry meat*. J. Anim. Feed Sci. 20, 236–245.
- 117 Marefati N., Ghorani V., Shakeri F., Boskabady M., Kianian F., Rezaee R., Boskabady MH. 2021. *A review of anti-inflammatory, antioxidant, and immunomodulatory effects of Allium cepa and its main constituents*. Pharm Biol.

- 2021 Dec;59(1):287-302. doi: 10.1080/13880209.2021.1874028. PMID: 33645419; PMCID: PMC7919894.
- 118 Martins R., Silva L.G., Pereira A., Esteves A., Duarte S.C., Pena A. 2022 *Coccidiosis and Poultry: A Comprehensive Review and Current Legislation*. Foods 2022, 11(18), 2738; <https://doi.org/10.3390/foods11182738>
- 119 Mashayekhi H., Mazhari M., Esmaeilipour O. 2018 *Eucalyptus leaves powder, antibiotic and probiotic addition to broiler diets: effect on growth performance, immune response, blood components and carcass traits*, Animal, Volume 12, Issue 10, 2018, Pages 2049-2055, ISSN 1751-7311, <https://doi.org/10.1017/S1751731117003731>
- 120 Matsumoto R., Hashimoto Y. 2000. *Distribution and developmental change of lymphoid tissues in the chicken proventriculus*. The Journal of Veterinary Medical Science, 62: 161–167.
- 121 Mazanowski, A. 2011. *Nowoczesna produkcja kurcząt brojlerów*
- 122 McCrudy R. D., Barbut S., Quinton M. 1996. *Seasonal effect on pale soft exudative (PSE) occurrence in young turkey breast meat*. Food Research International, 1996, 29, (3/4), 363.
- 123 McDevitt R.M., Brooker J.D., Acamovic T., Sparks N.H.C. 2006. *Necrotic enteritis; a continuing challenge for the poultry industry*. Worlds Poult. Sci. J., 62 (2006), pp. 221-247
- 124 Mehdizadeh A., Karimi E., Oskoueian E. 2022. *Nano-liposomal encapsulation of Artemisia aucheri phenolics as a potential phytobiotic against Campylobacter jejuni infection in mice*. Food Sci Nutr. 2022 May 17;10(10):3314-3322. doi: 10.1002/fsn3.2921. PMID: 36249965; PMCID: PMC9548345..
- 125 Miguel M.G. 2010. *Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short review*. Molecules. 2010 Dec 15;15(12):9252-87. doi: 10.3390/molecules15129252. PMID: 21160452; PMCID: PMC6259136.
- 126 Miles R., Butcher G., Henry P., Littell R. 2006. *Effect of antibiotic growth promoters on broiler performance, intestinal growth parameters, and quantitative morphology*. Poult. Sci., 85 (2006), pp. 476-485
- 127 Mitsch P., Zitterl-Eglseer K., Kohler B., Gabler C., Losa R., Zimpernik I. 2004. *The effect of two different blends of essential oil components on the proliferation*

- of Clostridium perfringens in the intestines of broiler chickens*. Poult Sci. 83:669–675.
- 128 Mohammadi Gheisar M., Hosseindoust A., Kim I.H. 2015. *Evaluating the effect of microencapsulated blends of organic acids and essential oils in broiler chickens diet*. J Appl Poult Res. 24:511–519.
- 129 Mujahid A., Furuse M. 2009. *Oxidative damage in different tissues of neonatal chicks exposed to low environmental temperature*. Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology, 152 (2009), pp. 604-608
- 130 Naveenkumar S., Karthikeyan N., Babu R.N., Veeramani P., Sivaramakrishnan S. 2017. *Effect of organic acid salts as an alternative to antibiotic growth promoters on the production performance of commercial broiler chicken*. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci., 6 (2017), pp. 3470-3480
- 131 Niewold T.A., van Essen G.J., Nabuurs M.J.A., Stockhofe-Zurwieden N., van der Meulen J. 2000. *A review of porcine pathophysiology: A different approach to disease*. Vet. Q., 22 (2000), pp. 209-212
- 132 Norwegian Scientific Committee. 2015. *The risk of development of antimicrobial resistance with the use of coccidiostats in poultry diets*. Report from the Norwegian Scientific Committee for Food Safety (VKM) <https://vkm.no/download/18.2994e95b15cc5450716152d3/1498142579152/0025301628.pdf>
- 133 Novak J.S., Juneja V.K., McClane B.A. 2003. *An ultrastructural comparison of spores from various strains of Clostridium perfringens and correlations with heat resistance parameters*. Int. J. Food Microbiol. 2003;86:239–247.
- 134 Olejnik M., Szprengier-Juskiewicz T., Jedziniak P. 2014. *Semduramicin in eggs—The incompatibility of feed and food maximum levels*. Food Chem. 2014, 149, 178–182.
- 135 Page S. W. 2006. *Current use of antimicrobial growth promoters in food animals: The benefits*. Antimicrobial growth promoters: where do we go from here, 136, 19-51.
- 136 Park S.Y., Byeon D.S., Kim G.W., Kim H.Y. 2021. *Carcass and retail meat cuts quality properties of broiler chicken meat based on the slaughter age*. J Anim

- Sci Technol. 2021 Jan;63(1):180-190. doi: 10.5187/jast.2021.e2. Epub 2021 Jan 31. PMID: 33987595; PMCID: PMC7882843.
- 137 Pattison M. 2002. *Some clinical and pathological features of enteritis in broilers—observations on treatment in the UK*. In Proceedings of the Elanco Global Enteritis Symposium (pp. 17). Cambridge, UK
- 138 Peralta M.F., Danelli M.G.M., Vivas A.B. 2016. *Rediscovering the importance of mucosal immune system (MIS) in poultry*. Acad J Biotechnol (2016) 4(3):91–5. 10.15413/ajb.2015.0238
- 139 Peralta M.F., Magnoli A., Alustiza F., Nilson A., Miazzo R., Vivas A. 2017. *Gut-Associated Lymphoid Tissue: A Key Tissue Inside the Mucosal Immune System of Hens Immunized with Escherichia coli F4*. Front Immunol. 2017 May 22;8:568. doi:10.3389/fimmu.2017.00568
- 140 Petit L., Gibert M., Popoff M.R. 1999. *Clostridium perfringens: toxinotype and genotype*. Trends Microbiol., 7 (1999), pp. 104-110
- 141 Placha I., Takacova J., Ryzner M., Cobanova K., Laukova A., Stromfova V., Venglovska K., Faix S. 2014. *Effect of thyme essential oil and selenium on intestine integrity and antioxidant status of broilers*. Br Poult Sci. 55:105–114.
- 142 Platel K., Srinivasan K. 2004. *Digestive stimulant action of spices: a myth or reality?* Indian J Med Res. 119:167–179.
- 143 Pluske, J. R., Tompson, M. J., Atwood, C. S., Bird, P. H., Williams, I. H., & Hartmann, P. E. 1996. *Maintenance of villus height and crypt depth, and enhancement of disaccharide digestion and monosaccharide absorption, in piglets fed on cow's whole milk after weaning*. British Journal of Nutrition 76(3), 409-422.
- 144 Pokharel S., Raut S., Adhikari B. 2019. *Tackling antimicrobial resistance in low-income and middle-income countries*. BMJ Glob. Health 2019, 4, e002104
- 145 Pokoo-Aikins A., Timmons J.R., Min B.R., Lee W.R., Mwangi S.N., McDonough C.M., Chen C. 2022. *Effects of varying levels of dietary DL-Methionine supplementation on breast meat quality of male and female broilers*, Poultry, 1: 40–53.
- 146 Potturi P.V., Patterson J.A., Applegate T.J. 2005. *Effects of delayed placement on intestinal characteristics in turkey poults*. Poult Sci (2005) 84:816–24. doi: 10.1093/ps/84.5.816

- 147 Prakatur, I., Miškulin, M., Pavić, M., Marjanović, K., Blazićević, V., Miskulin, I., & Domaćinović, M. 2019. *Intestinal morphology in broiler chickens supplemented with propolis and bee pollen*. *Animals* 9(6), 301.
- 148 Purwanti S., Zuprizal Z., Yuwanta T., Supadmo S. 2018. *Physical and Sensory Quality of Broiler Meat as Influenced by Dietary Supplementation of Turmeric (*Curcuma longa*), Garlic (*Allium sativum*) and in Combinations as a Feed Additive*. *ANIMAL PRODUCTION* [Online], 20.1 (2018): 61-69.
- 149 Qaisrani S.N., Van Krimpen M.M., Kwakkel R.P., Verstegen M.W.A., Hendriks W.H. 2015. *Dietary factors affecting hindgut protein fermentation in broilers: a review*. *Worlds Poultry Sci. J.*, 71 (2015), pp. 139-160
- 150 Qiao M., Fletcher D. L., Smith D. P., Northcutt J. K. 2001. *The Effect of Broiler Breast Meat Color on pH, Moisture, Water-Holding Capacity, and Emulsification Capacity*. *Poult. Sci.* 80, 676–680. doi:10.1093/PS/80.5.676
- 151 Quinteiro-Filho W.M., Ribeiro A., Ferraz-de-Paula V., Pinheiro M.L., Sakai M., Sá L.R., et al. 2010. *Heat stress impairs performance parameters, induces intestinal injury, and decreases macrophage activity in broiler chickens*. *Poult. Sci.* (2010) 89:1905–14. doi: 10.3382/ps.2010-00812
- 152 Rada Europejska. 2003 *Rozporządzenie WE Nr 1831/2003 parlamentu europejskiego i rady z dnia 22 sierpnia 2003 w sprawie dodatków stosowanych w żywieniu zwierząt*. <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2003R1831:20100901:PL:PDF>
- 153 Rada Europejska. 2007. *Dyrektywa Rady 2007/43/WE*
- 154 Rafeeq M., Muhammad Bilal R., Batool F, Yameen K., Farag M.R., Madkour M., Elnesr S., El-Shall N.A., Dhama K., Alagawany M. 2023. I, *World's Poultry Science Journal*, 79:1, 95-117, DOI: 10.1080/00439339.2022.2151395
- 155 Rahman M.A., Sultana S., Redoy M.R.A., Debi M.R., Chowdhury R., Al-Mamun M. 2022. *Combined impact of lemongrass and spearmint herbs on performance, serum metabolites, liver enzymes, and meat quality of broiler*. *J Adv Vet Anim Res.* 2022 Dec 31;9(4):712-719. doi: 10.5455/javar.2022.i640. PMID: 36714510; PMCID: PMC9868796.

- 156 Rao R.R., Platel K., Srinivasan K. 2003. *In vitro influence of spices and spice-active principles on digestive enzymes of rat pancreas and small intestine*. Nahrung. 47:408–412.
- 157 Rehfeld J.F. 2004. A centenary of gastrointestinal endocrinology. Horm. Metab. Res. 2004;36:735–741. doi: 10.1055/s-2004-826154.
- 158 Ristic M., Damme K. 2003. *Significance of pH-value for meat quality of broilers – influence of breed lines*. Veterinarski glasnik 2003;67:67-73
- 159 Ritz C.W., Fairchild B.D., Michael P.L. 2009. *Litter quality and broiler performance*. Bulletin 1267. Valley State University University of Georgia; Athens, GA: 2009. University of Georgia and Ft.
- 160 Rodgers N.J., Swick R.A., Geier M.S., Moore R.J., Choct M., Wu S.-B. 2015. *A multifactorial analysis of the extent to which eimeria and fishmeal predispose broiler chickens to necrotic enteritis*. Avian Dis., 59 (2015), pp. 38-45
- 161 Rudy M., Roch A., Stanisławczyk R., Duma P. (2014). *Wpływ rasy bydła na wybrane cechy jakościowe cielęciny przechowywanej w warunkach chłodniczych*. Roczniki Naukowe Polskiego Towarzystwa Zootechnicznego, 10 (1), 45-53
- 162 Rybicki M.J. 2020. *Coccidiostats in treating coccidiosis*. Żywnosc Nauk. Technol. Jakosc/Food Sci. Technol. Qual. 2020;125:127–137. doi: 10.15193/zntj/2020/125/364.
- 163 Schat K.A., Kaspers B., Kaiser P. 2014. *Avian Immunology* Second Edition
- 164 Schummer, A. 1973. *Lymphgefäßsystem*”. In *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere Band V: Anatomie der Hausvögel*, Edited by: Nickel, R., Schummer, A. and Seiferle, E. 105–109. Berlin: Verlag Paul Parey.
- 165 Senthamil Pandian C., Radhakrishnan L., Karunakaran R., Gopala Krishna Murthy TR., Appa Rao V., Shamsudeen P. et al. 2021. *Antimicrobial activity of selected phytochemicals individually and in combination against gram positive and gram negative bacteria*. Journal of Entomology and Zoology Studies 2021; 9(1): 2255-2260
- 166 Sharma R., Schumacher U. 1995. *Morphometric analysis of intestinal mucins under different dietary conditions and gut flora in rats*. Dig Dis Sci. 1995 Dec;40(12):2532-9. doi: 10.1007/BF02220438.

- 167 Sheikh I.U., Nissa S.S., Bushra Zaffer, Bulbul K.H., Akand A.H., Ahmed H.A., Dilruba Hasin, Isfaqul Hussain i Hussain S.A.. 2018. *Ammonia production in the poultry houses and its harmful effects*. International Journal of Veterinary Sciences and Animal Husbandry 2018; 3(4): 30-33
- 168 Shen D., Pan M.H., Wu Q.L., Park C.H., Juliani H.R., Ho C.T., Simon J.E. 2010. *LC-MS method for the simultaneous quantitation of the anti-inflammatory constituents in oregano (Origanum species)*. J Agric Food Chem. 58:7119–7125.
- 169 Shimizu T., Ohtani K., Hirakawa H., Ohshima K., Yamashita A., Shiba T., Ogasawara N., Hattori M., Kuhara S., Hayashi H. 2002. *Complete genome sequence of Clostridium perfringens, an anaerobic flesh-eater*. PNAS. 2002;99:996–1001.
- 170 Shynkaruk T., Long K. , LeBlanc C. , Schwean-Lardner K. 2023. *Impact of stocking density on the welfare and productivity of broiler chickens reared to 34 d of age*. Journal of Applied Poultry Research, Volume 32, Issue 2, 2023, 100344, ISSN 1056-6171, <https://doi.org/10.1016/j.japr.2023.100344>
- 171 Sidiropoulou E., Skoufos I., Marugan-Hernandez V., Giannenas I., Bonos E., Aguiar-Martins K., Lazari D., Blake D.P., Tzora A. 2020. *In vitro anticoccidial study of oregano and garlic essential oils and effects on growth performance, fecal oocyst output, and intestinal microbiota in vivo*. Frontiers in Veterinary Science, 7: 420. DOI:<https://www.doi.org/10.3389/fvets.2020.00420>
- 172 Singh P., Yadav S., Pathera A., Sharma D. 2019. *Effect of vacuum tumbling and red beetroot juice incorporation on quality characteristics of marinated chicken breast and leg meats*. Nutr Food Sci. 2019;50:143–56. doi: 10.1108/NFS-03-2019-0079
- 173 Słowiński M., Florowski T., Adamczak L., Dasiewicz K., Golonko M. 2005. *Zastosowanie pomiaru barwy do oceny jakości mięsa drobiowego*. Postępy Techniki Przetwórstwa Spożywczego, 2005 tom 15-16 nr 2 s.41-43
- 174 Sobral M.M.C., Romero-Gonzalez R., Faria M.A., Cunha S.C.; Ferreira I.M., Garrido-Frenich A. 2020. *Stability of antibacterial and coccidiostat drugs on chicken meat burgers upon cooking and in vitro digestion*. Food Chem. 2020, 316, 126367.

- 175 Specian R.D., Oliver M.G. 2017. *Functional biology of intestinal goblet cells*. *Am. J. Physiol. Physiol.* 2017;260:C183–C193. doi: 10.1152/ajpcell.1991.260.2.C183
- 176 St-Pierre NR., Cobanov B., Schmitkey G. 2003 *Economic losses from heat stress by US livestock industries*. *J Dairy Sci.* (2003) 86:52–77. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(03)74040-5
- 177 Szajdek A., Borowska J., 2004. *Właściwości przeciwtleniające żywności pochodzenia roślinnego*. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość* 4, 5–28.
- 178 Szeleszczuk P., Doner S., Nerc J. 2016. *Preliminary assessment of financial losses caused by coccidiosis in broiler chicken production*. Proceedings of the 1st International Technical Conference Eimeriana Avia, Poultry Coccidiosis—Actual Challenges AD 2016; Wrocław, Poland. 26–27 February 2016; pp. 97–104.
- 179 Szentkuti L., Riedesel H., Enss M.L., Gaertner K., von Engelhardt W. 1990. *Pre-epithelial mucus layer in the colon of conventional and germ-free rats*. *Histochem J* 1990;22:491–7.
- 180 Taira K., Nagai T., Obi T., Takase K. 2014. *Effect of litter moisture on the development of footpad dermatitis in broiler chickens*. *J. Vet. Med. Sci.* 2014;76:583–586.
- 181 Tallentire C. W., Leinonen I. , Kyriazakis I. 2016. *Breeding for Efficiency in the Broiler Chicken: A Review*. *Agronomy for Sustainable Development* 36: 66.
- 182 Teirlynck E., Gussem M. D. E., Dewulf J. , Haesebrouck F., Ducatelle R., Van Immerseel F. 2011. *Morphometric evaluation of “dysbacteriosis” in broilers*, *Avian Pathology*, 40:2, 139-144, DOI: 10.1080/03079457.2010.543414
- 183 Timbermont L. , Haesebrouck F. , Ducatelle R. , Van Immerseel F. 2011. *Necrotic enteritis in broilers: an updated review on the pathogenesis*. *Avian Pathol.*, 40 (2011), pp. 341-347
- 184 Timbermont L., Lanckriet A., Dewulf J., Nollet N., Schwarzer K., Haesebrouck F., et al. 2010. *Control of Clostridium perfringens-induced necrotic enteritis in broilers by target-released butyric acid, fatty acids and essential oils*. *Avian Pathol.* (2010) 39:117–21. doi: 10.1080/03079451003610586

- 185 Tkacz K., Modzelewska-Kapituła M., Osewska A., Zduńczyk W. 2021. *Barawa mięsa - czynniki ją kształtujące i metody pomiaru*. Ogólnopolski informator masarski. Listopad 2021
- 186 Tsao R, Deng Z. 2004. *Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2004;812:85–99. doi: 10.1016/j.jchromb.2004.09.028.
- 187 Uni Z., Platin R., Sklan D. 1998. *Cell proliferation in chicken intestinal epithelium occurs both in the crypt and along the villus*. J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol. 1998;168:241–247. doi: 10.1007/s003600050142.
- 188 Uni Z., Tako E., Gal-Garber O., Sklan D. 2003. *Morphological, molecular, and functional changes in the chicken small intestine of the late-term embryo*. Poult. Sci. 2003;82:1747–1754. doi: 10.1093/ps/82.11.1747.
- 189 van der Klis, J.D., Lensing, M. 2007. *Wet litter problems relate to host–microbiota interactions*. World Poultry, 23: 20–22.
- 190 Van Laack RLJM, Liu CH, Smith MO, Loveday HD. 2000. *Characteristics of pale, soft, exudative broiler breast meat*. Poult Sci 2000;79:1057–61
- 191 Van Limbergen T., Sarrazin S., Chantziaras I. et al. 2020 *Risk factors for poor health and performance in European broiler production systems*. BMC Vet Res 16, 287. <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02484-3>
- 192 Vrba V. , Blake D.P., Poplstein M. 2010. *Quantitative real-time PCR assays for detection and quantification of all seven Eimeria species that infect the chicken*. Vet Parasitol. (2010) 174:183–90. doi: 10.1016/j.vetpar.2010.09.006
- 193 Wade B., Keyburn A. 2015. *The true cost of necrotic enteritis*. <https://www.poultryworld.net/poultry/the-true-cost-of-necrotic-enteritis/>
- 194 Wei Y., Mao J., Liu J., Zhang Y., Deng Z., Lv J., He M., Liu J., Wang H. 2021 *Encapsulated Mixture of Methyl Salicylate and Tributyrin Modulates Intestinal Microbiota and Improves Growth Performance of Weaned Piglets*. Microorganisms. 2021 Jun 21;9(6):1342. doi: 10.3390/microorganisms9061342. PMID: 34205785; PMCID: PMC8235159.
- 195 Wideman N., O’Bryan C.A., Crandall P.G. 2016. *Factors affecting poultry meat colour and consumer preferences – a review*. Worlds Poult. Sci. J., 72: 353–366.

- 196 Wilkie D.C., Van Kessel A.G., White L.J., Laarveld B., Drew M.D. 2005. *Dietary amino acids affect intestinal clostridium perfringens populations in broiler chickens*. Can. J. Anim. Sci., 85 (2005), pp. 185-193
- 197 Wilkinson K.G., Tee E., Tomkins R.B., Hepworth G., Premier R. 2011. *Effect of heating and aging of poultry litter on the persistence of enteric bacteria*. Poult. Sci. 2011;90:10–18.
- 198 Williams R.B. 1999. *A compartmentalised model for the estimation of the cost of coccidiosis to the world's chicken production industry*. Int J Parasitol. (1999) 29: 1209–29. doi: 10.1016/S0020-7519(99)00086-7
- 199 Wilson J., Tice G., Brash M.L., St Hilaire S. 2005. *Manifestations of Clostridium perfringens and related bacterial enteritides in broiler chickens*. Worlds Poultry Science Journal, 61: 435–449.
- 200 Windisch W., Schedle K., Plitzner C., Kroismayr A. . 2008. *Use of Phytogetic Products as Feed Additives for Swine and Poultry*. Journal of Animal Science 86 (14_suppl): E140–148. doi:10.2527/jas.2007-0459.
- 201 Wojtacka J., Wysok B., Wiszniewska-Łaszczych A., Gomółka-Pawlicka M., Gesek M., Chłodowska A., Tykałowski B., Różański H., Iwiński H., Koncicki A. 2023. *Effect of water supplemented with a herbal product on the internal organs of broiler chickens*. Med. Weter. 2023, 79 (8), 422-427 DOI: dx.doi.org/10.21521/mw.6785
- 202 Yamauchi, K.E., Isshiki, Y., 1991. *Scanning electron microscopic observations on the intestinal villi in growing white leghorn and broiler chickens from 1 to 30 days of age*. Br. Poultry Sci. 32 (1), 67e78
- 203 Yang C., Kabir-Chowdhury M.A., Hou Y., Gong J. 2015. *Phytogetic compounds as alternatives to in-feed antibiotics: potentials and challenges in application*. Pathogens. 4:137–156.
- 204 Yegani M., Korver D.R. 2008. *Factors affecting intestinal health in poultry*. Poult Sci. (2008) 87:2052–63. doi: 10.3382/ps.2008-00091
- 205 Yun C.H., Lillehoj H.S., Lillehoj E.P. 2000. *Intestinal immune responses to coccidiosis*. Dev Comp Immunol. (2000) 24:303–24. doi: 10.1016/S0145-305X(99)00080-4
- 206 Zdanowska-Sąsiadek Ż., Lipińska-Palka P., Damaziak K., Michalczuk M., Grzybek W., Kruzińska B., Jasińska K., Róg D., Kordos K., Ząbek K., Kosińska

- K., Łagoda M., Komorowska D., Marchewka J. 2019. *Antioxidant effects of phytogetic herbal-vegetable mixtures additives used in chicken feed on breast meat quality*. Animal Science Papers and Reports vol. 37 (2019) no. 4, 393-408
- 207 Zhang J.; Li C.; Tang X.; Lu Q.; Sa R.; Zhang H. 2015. *Proteome changes in the small intestinal mucosa of broilers (Gallus gallus) induced by high concentrations of atmospheric ammonia*. Proteome Sci. 2015, 13, 9
- 208 Zhang W.X., Zhang Y., Zhang, X.W., Deng, Z.X., Liu, J.X., He M.L., Wang H.F. 2020. *Effects of dietary supplementation with combination of tributyrin and essential oil on gut health and microbiota of weaned piglets*. Animals 2020, 10, 180.
- 209 Zhao F.Q., Zhang Z.W., Yao H.D., Wang L.L., Liu T., Yu X.Y., Li S., Xu S.W. 2013. *Effects of cold stress on mRNA expression of immunoglobulin and cytokine in the small intestine of broilers*. Research in Veterinary Science, 95 (2013), pp. 146-155
- 210 Zhou H.J. , Kong L.L. , Zhu L.X. , Hu X.Y. , Busye J. , Song Z.G. 2021. *Effects of cold stress on growth performance, serum biochemistry, intestinal barrier molecules, and adenosine monophosphate-activated protein kinase in broilers*. Animal, Volume 15, Issue 3, <https://doi.org/10.1016/j.animal.2020.100138>.
- 211 Zouari N., Elgharbi F., Fakhfakh N., Bacha A.B., Gargouri Y., Miled N., 2010. *Effect of dietary vitamin E supplementation on lipid and color stability of chicken thigh meat*. Afr. J. Biotechnol. 9, 2276–2283.
- 212 Библиотека журнала «Русин» · 2015, № 2; УДК 94(470)“1941/1945”:
378.11(571.16) UDC DOI: 10.17223/23451734/2/11; s.123-124, 129.
- 213 Наука в Сибири, газета Сибирского отделения Российской академии наук № 8 (2993) 23 апреля 2015 г., s. 8-9.

9. Spis tabel

Tab. 1	Aktualne zalecenie żywienia dla kurcząt brojlerów (Aviagen, 2022)
Tab. 2	Zadana temperatura powietrza w okresie odchowu
Tab. 3	Procentowa zawartość frakcji sypkich w mieszankach paszowych
Tab. 4	Skład surowcowy mieszanki paszowej typu starter
Tab. 5	Zawartość składników pokarmowych mieszanki paszowej typu starter
Tab. 6	Skład surowcowy mieszanki paszowej typu grower
Tab. 7	Zawartość składników pokarmowych mieszanki paszowej typu grower
Tab. 8	Skład surowcowy mieszanki paszowej typu finisz
Tab. 9	Zawartość składników pokarmowych mieszanki paszowej typu finisz
Tab. 10	Skład premiksu mineralno-witaminowego
Tab. 11	Wyniki produkcyjne tuczu kurcząt brojlerów
Tab. 12	Barwa mięsa
Tab. 13	Masa mięśni przed i po pieczeniu oraz wyciek termiczny
Tab. 14	pH, siła cięcia i TBARS
Tab. 15	Parametry sensoryczne mięsa
Tab. 16	Wyniki 1-czynnikowej analizy ANOVA dla wszystkich prób
Tab. 17	Wyniki analizy ANOVA (1-czynnikowa) osobno dla preparatu i rozpuszczalnika
Tab. 18	Średnie wyników pomiarów kosmków jelitowych i krypt
Tab. 19	Skład mieszanek paszowych zastosowanych w obserwacji terenowej
Tab. 20	Zawartość składników pokarmowych mieszanek paszowych zastosowanych w obserwacji terenowej
Tab. 21	Wyniki produkcyjne uzyskane w obserwacji terenowej

10. Spis fotografii i wykresów

- Fot. 1 Przekrój poprzeczny przez jelito biodrowe, grupa A
- Fot. 2 Przekrój poprzeczny przez jelito kręte, grupa A
- Fot. 3 Przekrój poprzeczny przez dwunastnicę, grupa A
- Fot. 4 Przekrój poprzeczny przez jelito biodrowe, grupa B
- Fot. 5 Przekrój poprzeczny przez jelito kręte, grupa B
- Fot. 6 Przekrój poprzeczny przez dwunastnicę, grupa B
- Fot. 7 Przekrój poprzeczny przez jelito biodrowe, grupa C
- Fot. 8 Przekrój poprzeczny przez jelito kręte, grupa C
- Fot. 9 Przekrój poprzeczny przez dwunastnicę, grupa C
- Fot. 10 Przekrój poprzeczny przez jelito biodrowe, grupa K
- Fot. 11 Przekrój poprzeczny przez jelito kręte, grupa K
- Fot. 12 Przekrój poprzeczny przez dwunastnicę, grupa K
- Fot. 13 Przekrój poprzeczny przez jelito biodrowe, grupa N
- Fot. 14 Przekrój poprzeczny przez jelito kręte, grupa N
- Fot. 15 Przekrój poprzeczny przez dwunastnicę, grupa N
-
- Wyk. 1 Obszar zajmowany przez komórki pozytywne dla antygenów Bu-1, CD4, CD8 w migdałkach jelitowych
- Wyk. 2 Obszar zajmowany przez komórki pozytywne dla antygenów Bu-1, CD4, CD8 w migdałkach jelitowych
- Wyk. 3 Średnie procentowe obszary (\pm SD) zajmowane przez wszystkie centra germinalne w polu widzenia