UNIWERSYTET
WARMIŃSKO-MAZURSKI
W OLSZTYNIE

WYDZIAŁ MEDYCYNY WETERYNARYJNEJ

Dziedzina: Nauki Weterynaryjne

Dyscyplina: Weterynaria

Lek. wet. Natalia Weronika Gruchała

Rozprawa doktorska

„Wpływ kultur probiotycznych na wybrane wskaźniki statusu zdrowotnego oraz wyniki produkcyjne brojlera kurzego”

„The influence of selected probiotic cultures on health parameters and production results of broiler chickens”

Katedra Prewencji Weterynaryjnej i Higieny Pasz

Promotor: dr hab. Łukasz Zielonka, prof. UWM

Olsztyn, 2025

Podziękowania

Składam serdeczne podziękowania mojemu Promotorowi, dr. hab. Łukaszowi Zielonce, prof. UWM, za opiekę naukową, nieocenione wsparcie merytoryczne oraz cierpliwość i życzliwość okazywaną na każdym etapie realizacji pracy doktorskiej. Jego zaangażowanie, trafne wskazówki oraz umiejętność inspirowania do poszukiwań naukowych miały fundamentalne znaczenie dla powstania tej rozprawy i stanowiły dla mnie nieocenione źródło wiedzy i motywacji.

Dziękuję również przedsiębiorstwu Kanvet sp. z o.o. za zapewnienie warunków organizacyjnych i technicznych niezbędnych do realizacji badań prowadzonych w ramach doktoratu wdrożeniowego, których wyniki zostały wykorzystane w niniejszej pracy.

Spis treści

Streszczenie..... 5

Abstract 7

1. Wstęp..... 9

1.1. Rozwój Drobiarstwa w Polsce i na świecie..... 9

1.2. „Zdrowie jelit" u brojlerów: definicje, biomarkery i pomiar (VH, CD,VH:CD) ... 12

1.3. Probiotyki w drobiarstwie..... 14

1.4. Ramy regulacyjne UE i Polski..... 18

1.5. Metody i interpretacja wskaźników mikrobiomu..... 21

2. Materiały i metody..... 24

2.1. Zwierzęta i utrzymanie..... 24

2.2.Warunki środowiskowe..... 26

2.3. Projekt doświadczalny i dawkowanie..... 27

2.4. Wskaźniki produkcyjne..... 31

2.5. Morfometria..... 31

2.6. Mikrobiom jelitowy..... 33

3. Wyniki..... 37

3.1. Wyniki produkcyjne..... 37

3.2. Morfometria – dwunastnica..... 38

3.3. Morfometria - jelito czcze 39

3.4. Morfometria - jelito biodrowe 39

3.5. Wyniki analizy mikrobiomu jelitowego..... 45

4. Dyskusja 57

4.1. Wyniki produkcyjne (masa ciała, FCR, śmiertelność) 57

4.2. Morfometria jelit (VH, CD, VH:CD) ……..59

4.3. Mikrobiom (alfa-różnorodność, skład taksonomiczny, korelacja z morfologią i produkcją) ……...…….....61

5. Podsumowanie i wnioski …… 65

5.1. Cel i zakres pracy ……..... 65

5.2. Najważniejsze obserwacje eksperymentalne……65

5.3. Wnioski ……... 65

Piśmiennictwo ….…… 67

Spis tabel…….. 76

Spis rycin…….. 77

Streszczenie

Produkcja brojlerów kurzych jest jednym z kluczowych segmentów światowego rolnictwa, a jej rozwój wiąże się z wyzwaniami w zakresie zdrowia jelit, efektywności wykorzystania paszy oraz ograniczenia stosowania antybiotykowych stymulatorów wzrostu (AGP). Wycofanie AGP w Unii Europejskiej wymusiło poszukiwanie alternatywnych strategii poprawy zdrowotności i wyników produkcyjnych, wśród których probiotyki zajmują szczególne miejsce. Szczepy *Lactiplantibacillus plantarum* i *Bifidobacterium animalis* odznaczają się wysoką zdolnością adhezji do nabłonka jelitowego, produkcją metabolitów o działaniu antybakteryjnym oraz korzystnym wpływem na modulację odpowiedzi immunologicznej, co czyni je obiecującymi kandydatami w żywieniu drobiu.

Celem niniejszej pracy była ocena wpływu wyselekcjonowanego preparatu probiotycznego zawierającego *Lactiplantibacillus plantarum* ATM14 oraz *Bifidobacterium animalis* ATM30 na wskaźniki zdrowotne, histomorfologię jelit, mikrobiom przewodu pokarmowego oraz wyniki produkcyjne brojlera kurzego. Założono, że suplementacja tymi szczepami probiotycznymi poprawi integralność bariery jelitowej, zwiększy różnorodność mikrobiologiczną oraz przełoży się na lepsze wykorzystanie paszy i wyższą masę końcową ptaków.

Badania przeprowadzono w warunkach doświadczalnych na 360 piskletach Cobb-500, które losowo podzielono na trzy grupy: kontrolną (bez dodatku probiotyku) oraz dwie grupy doświadczalne otrzymujące preparat probiotyczny w różnych dawkach z wodą do picia. Odchów trwał 35 dni. Oceniano parametry produkcyjne (przyrost masy ciała, FCR, przeżywalność), wskaźniki histomorfologiczne jelita cienkiego (wysokość kosmków, głębokość krypt, stosunek VH:CD), a także skład i różnorodność mikrobiomu jelitowego metodą sekwencjonowania.

Zastosowanie preparatu probiotycznego istotnie wpłynęło na poprawę wyników odchowu. W grupach doświadczalnych odnotowano wyższe przyrosty masy ciała oraz korzystniejszy współczynnik wykorzystania paszy w porównaniu z grupą kontrolną. Analiza histomorfologiczna wykazała wydłużenie kosmków, spłycenie krypt oraz wzrost wskaźnika VH:CD, co świadczy o lepszej powierzchni wchłaniania składników pokarmowych. Badania mikrobiomu jelitowego ujawniły zwiększoną różnorodność taksonomiczną oraz większy udział bakterii produkujących krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe (SCFA), zwłaszcza z rodzaju *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*.

Uzyskane wyniki potwierdzają, że suplementacja brojlerów kurzych wybranymi szczepami probiotycznymi pozytywnie wpływa na zdrowie jelit, parametry produkcyjne i stabilność mikrobiomu. Zastosowany preparat może być skuteczną alternatywą dla antybiotykowych stymulatorów wzrostu, wpisując się w koncepcję „One Health" oraz strategie ograniczania oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe. Wnioski te mają znaczenie praktyczne zarówno dla producentów pasz i hodowców, jak i dla dalszego rozwoju zrównoważonej produkcji drobiarskiej.

Słowa kluczowe: brojler kurzy, probiotyki, Lactiplantibacillus plantarum, Bifidobacterium animalis, mikrobiom jelitowy

Abstract

Broiler chicken production is one of the key sectors of global agriculture, facing major challenges related to gut health, feed efficiency, and the reduction of antibiotic growth promoters (AGPs). The ban on AGPs in the European Union has forced the search for alternative strategies to improve poultry health and productivity, with probiotics being among the most promising solutions. *Lactiplantibacillus plantarum* and *Bifidobacterium animalis* are characterized by strong adhesive capacity to the intestinal epithelium, production of antimicrobial metabolites, and beneficial modulation of immune responses, making them attractive candidates for poultry nutrition.

The aim of this study was to evaluate the effects of a selected probiotic preparation containing *Lactiplantibacillus plantarum* ATM14 and *Bifidobacterium animalis* ATM30 on broiler health indicators, intestinal histomorphology, gut microbiota composition, and production performance. It was hypothesized that supplementation with these probiotic strains would improve intestinal barrier integrity, increase microbial diversity, and result in better feed utilization and higher final body weight.

The experiment was carried out on 360 Cobb-500 chicks randomly assigned to three groups: a control group (no probiotics) and two experimental groups receiving the probiotic preparation at different dosages via drinking water. The rearing period lasted 35 days. Productive parameters (body weight gain, feed conversion ratio, survival), histomorphological indices of the small intestine (villus height, crypt depth, VH:CD ratio), and gut microbiota composition (assessed by high-throughput sequencing) were analyzed.

Probiotic supplementation significantly improved rearing performance. The experimental groups showed higher body weight gain and more favorable feed conversion compared with the control. Histomorphological analysis revealed elongated villi, shallower crypts, and an increased VH:CD ratio, indicating enhanced absorptive capacity. Microbiota analysis demonstrated greater taxonomic diversity and an increased proportion of short-chain fatty acid (SCFA)-producing bacteria, particularly *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*.

The findings confirm that supplementation with selected probiotics positively affects gut health, production performance, and microbial stability in broiler chickens. The tested preparation may serve as an effective alternative to antibiotic growth promoters, aligning with the One Health concept and global strategies to combat antimicrobial resistance. These results

have practical significance for feed producers, poultry farmers, and the advancement of sustainable poultry production.

Keywords: broiler chicken, probiotics, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Bifidobacterium animalis*, gut microbiota.

Rozdział 1. Wstęp

1.1. Rozwój drobiarstwa w Polsce i na świecie

Kontekst globalny i znaczenie sektora

W ostatnich dekadach produkcja mięsa drobiowego stała się kluczowym filarem podaży białka zwierzęcego na świecie. Zgodnie z OECD–FAO Agricultural Outlook 2024–2033, globalna produkcja drobiu (mięso *ready-to-cook*, RTC) w 2024 r. wyniosła ok. 141,3 mln ton wobec 138,7 mln ton w 2023 r., utrzymując trend wzrostowy i umacniając pozycję drobiu jako najbardziej dynamicznie rosnącej kategorii w koszyku mięs. Prognozy średniookresowe przewidują dalszy wzrost produkcji i konsumpcji, przy czym drób generuje największą część przyrostu konsumpcji mięsa w skali świata.

W ujęciu całego rynku mięs FAO wskazuje, że rok 2024 przyniósł umiarkowane zwiększenie globalnej produkcji mięsa do około 371–373 mln ton (CWE), a wzrost ten napędzany był przede wszystkim drobiem, które pozostaje najbardziej „elastycznym cenowo" źródłem białka zwierzęcego. Te ujęcia (CWE dla całego mięsa; RTC dla drobiu) różnią się definicją jednostek, ale zgodnie pokazują, że to właśnie drób „ciągnie" globalną podaż mięsa.

Unia Europejska i rola Polski

W krajach Unii Europejskiej produkcja mięsa drobiowego utrzymuje stabilny trend wzrostowy, mimo presji kosztów paszy i energii oraz epizootii wysoce zjadliwej grypy ptaków i rzekomego pomoru drobiu. Dane Eurostatu wskazują, że w 2023 r. Polska była największym producentem drobiu we Wspólnocie — odpowiadała za 20,6% całkowitej produkcji (ok. 2,7 mln ton). Kolejne miejsca zajmowały Hiszpania (12,8%), Niemcy (11,8%), Francja (11,5%) i Włochy (10,0%). Najnowsze zestawienia potwierdzają utrzymanie tej pozycji również w 2024 r., kiedy udział Polski przekroczył 20%.

Łączna produkcja drobiu w państwach członkowskich w 2024 r. osiągnęła poziom 13,2–13,3 mln ton (szacunki Eurostatu). Równocześnie sektor paszowy odnotował, że mieszanki drobiowe stanowią największy segment przemysłowych pasz w UE-27 (~49 mln ton w 2024 r.), co podkreśla znaczenie tego gatunku w strukturze produkcji zwierzęcej. Z perspektywy handlu międzynarodowego raporty USDA FAS (*EU Poultry and Products Annual 2024*) wskazują na utrzymującą się nadwyżkę eksportową oraz silną pozycję Polski w strukturze unijnej podaży.

Parametry produkcyjne: tempo wzrostu, FCR i wiek uboju

Wydajność biologiczna nowoczesnych linii brojlerów przekłada się na skrócony cykl produkcyjny oraz niskie zużycie paszy w przeliczeniu na kilogram przyrostu masy ciała. Cele wydajnościowe (*Performance Objectives*) dla linii Ross 308 (Aviagen, 2022) zakładają, że w 35. dniu odchowu ptak osiąga ok. 2,30 kg przy współczynniku wykorzystania paszy (FCR) ≈ 1,40 (w chowie mieszańców). Dalsze wydłużenie tuczu prowadzi do zwiększenia masy końcowej, przy jednoczesnym stopniowym wzroście FCR (np. do ok. 1,53 w 42. dniu). Wartości te uzyskuje się w warunkach właściwego zarządzania i prawidłowego żywienia, stanowiąc punkt odniesienia dla ferm komercyjnych.

Historycznie postęp w zakresie FCR i tempa wzrostu stanowi jeden z najlepiej udokumentowanych sukcesów w hodowli drobiu, wynikający z doskonalenia genetycznego i technologicznego. Porównania linii z lat 1957/1978/2001/2005 wykazały ponad czterokrotny wzrost masy ciała w 42. dniu oraz ok. 50% poprawę FCR w okresie 1957–2005; przy czym 85–90% przyrostu masy między 1957 a 1991 r. można przypisać postępowi genetycznemu, a pozostałą część — udoskonaleniom w zakresie żywienia i technologii utrzymania.

Współcześnie poprawa efektywności paszowej pozostaje kluczowym elementem zrównoważonej intensyfikacji produkcji drobiarskiej. Mniejsze zużycie paszy na kilogram przyrostu masy ciała ogranicza ślad środowiskowy — zużycie energii, powierzchni upraw oraz emisję gazów cieplarnianych — co szeroko omawia przegląd Zampiga et al. (2021).

Efektywność żywieniowa (FCR) w ujęciu żywieniowo-technicznym

Współczynnik wykorzystania paszy (FCR, *feed conversion ratio*) jest wskaźnikiem złożonym, zależnym od wielu czynników: genotypu, wieku i masy uboju, gęstości obsady, jakości paszy (zawartości energii i strawnych aminokwasów), mikrobiomu, zdrowia jelit, dobrostanu oraz mikroklimatu. Cele wydajnościowe dla linii Ross 308 pokazują, że wartość FCR rośnie wraz z wiekiem i masą ciała ptaków (np. ~1,40 w 35. dniu vs ~1,53 w 42. dniu), co ilustruje klasyczny kompromis między ciężarem końcowym a zużyciem paszy.

Z punktu widzenia ekonomiki fermy i analizy cyklu życia (LCA), wybór docelowej masy oraz wieku uboju stanowi decyzję strategiczną, integrującą rentowność, przepustowość ubojni i wymagania rynku (udział poszczególnych elementów w rozbiorze).

Przeglądy naukowe wskazują, że długoterminowa poprawa FCR wynika nie tylko z postępu genetycznego, lecz także z optymalizacji żywienia — poprzez precyzyjne bilansowanie

poziomów białka i energii, profilu aminokwasów, dodatków paszowych, a także jakości surowców (lepkość treści jelitowej, zawartość nieskrobiowych polisacharydów, NSP). Istotną rolę odgrywa również zarządzanie zdrowiem przewodu pokarmowego, w tym mikrobiomem, produkcją krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (SCFA) oraz integralnością bariery jelitowej.

Wzrost efektywności żywieniowej uznawany jest za jedną z głównych dźwigni zrównoważonej intensyfikacji w nowoczesnym łańcuchu drobiarskim.

Rozwój hodowlany: od „maksymalnej wydajności" do „zrównoważonej, zbalansowanej selekcji"

Klasyczne prace porównawcze (Havenstein et al., 2003) oraz nowsze analizy (Zuidhof et al., 2014) dokumentują, że selekcja genetyczna odpowiada za znaczną część uzysków w tempie wzrostu i FCR, przy jednoczesnej zmianie składu tuszy i cech anatomicznych. Z kolei przegląd Tallentire et al. (2016) podsumowuje konsekwencje selekcji dla efektywności trawiennej, składu ciała i wykorzystania energii, wskazując na długofalowe przeobrażenia fizjologii układu pokarmowego.

Od około dekady firmy hodowlane deklarują „*balanced breeding*" — włączanie do indeksów selekcyjnych szerszego zestawu cech: zdrowotnych (*robustness* – krzepkość, odporność), dobrostanowych (kondycja kończyn, chód, kontaktowe urazy skóry), przeżywalności, a nawet wskaźników powiązanych ze zrównoważonym rozwojem środowiskowym. Dokumenty programowe i raporty przeglądowe (Aviagen 2023/24; Neeteson et al., 2023) szczegółowo opisują to podejście oraz realne postępy w zakresie cech dobrostanu. Jednocześnie literatura akademicka podkreśla, że szybkie tempo wzrostu może sprzyjać problemom lokomotorycznym — co znajduje odzwierciedlenie w metaanalizach/przeglądach z okresu 2021–2024 — i wymaga stałej kontroli kompromisów selekcyjnych. Na poziomie praktycznym istnieją dowody, że parametry kończyn i zdolność poruszania się uległy poprawie równolegle z przyrostami (wskutek lepszego zarządzania i ukierunkowanej selekcji), ale czułe wskaźniki dobrostanu nadal różnicują genotypy o odmiennych krzywych wzrostu – co uzasadnia politykę „zbalansowanej selekcji" i dalsze doskonalenie środowiska utrzymania (m.in. obsada, zarządzanie zdrowiem kończyn).

1.2 „Zdrowie jelit” u brojlerów: definicje, biomarkery i pomiar (VH, CD, VH:CD)

Pojęcie „zdrowia jelit” w drobiarstwie

W literaturze „zdrowie jelit” bywa ujmowane jako zdolność przewodu pokarmowego do realizowania funkcji trawienno-wchłaniających przy jednoczesnym utrzymaniu integralności bariery, odporności miejscowej i stabilnej, korzystnej mikrobioty — tak, aby ptak mógł efektywnie znosić bodźce stresowe bez klinicznych lub subklinicznych zaburzeń (Kogut, 2016; Ducatelle et al., 2023). W praktyce badawczej pojęcie to scala wskaźniki morfometryczne (VH, CD, VH:CD), testy przepuszczalności (np. test FITC-d), markery zapalne i obraz mikrobiomu (Kogut, 2016; Ducatelle et al., 2023).

Nowsze analizy podkreślają, że zespół wskaźników *gut health* lepiej prognozuje FCR i przyrosty niż pojedyncze parametry, bo odzwierciedla sprzężenia między trawieniem, barierą i odpornością (Bedford, 2022; Rysman et al., 2023).

Anatomia czynnościowa i rozwój jelita po wylęgu

U pisklęcia pierwsze dni po wylęgu to intensywna przebudowa błony śluzowej: wzrost wysokości kosmków i powierzchni chłonnej oraz dojrzewanie enzymatyczne, przy szybkim rozroście krypt (Uni, 1999; Uni, 2000). Zmiany te są segmentowo zróżnicowane (dwunastnica/jejunum > jelito kręte) i mają charakter skokowy w 2–5 dobie życia (Uni, 1999). W jelicie cienkim populacje komórek pnia proliferują głównie w kryptach (marker PCNA/BrdU), a następnie migrują ku szczytom kosmków, co determinuje cykl odnowy nabłonka i jego wymagania energetyczne (Uni, 2000).

Okres wczesnego rozwoju (pierwsze 10–14 dni) jest zatem krytyczny dla „zaprogramowania” morfometrii i mikrobioty — wszelkie zaburzenia (opóźnienie karmienia, nadmierna lepkość treści, mykotoksyny, stres cieplny) zostawiają ślad w postaci płytszych kosmków, głębszych krypt i gorszej efektywności wchłaniania (Uni, 1999; Ducatelle et al., 2023).

Histomorfometria: definicje i interpretacja wskaźników

Najczęściej stosowane wskaźniki to:

- **VH (villus height)** – wysokość kosmka, mierzona od wierzchołka kosmka do połączenia kosmek–krypta.
- **CD (crypt depth)** – głębokość krypty (zagłębienia pomiędzy kosmkami, od powierzchni błony śluzowej do dna krypty).
- **VH:CD** – stosunek wysokości kosmka do głębokości krypty, wskaźnik „zrównoważenia" między powierzchnią chłonną a strefą proliferacji.

Zasadniczo wyższe wartości VH i wyższy stosunek VH:CD łączą się z lepszym wykorzystaniem paszy, podczas gdy pogłębione krypty sygnalizują wzmożony obrót komórkowy i kosztowną regenerację nabłonka. W wielu doświadczeniach wzrost VH i VH:CD współwystępował z poprawą FCR (Awad et al., 2009; Prakatur et al., 2019).

Czynniki modyfikujące morfometrię i integralność bariery jelitowej

Stres cieplny. Ostry i cykliczny stres cieplny zwiększa przepuszczalność jelit (*leaky gut*), modyfikuje ekspresję białek połączeń ścisłych (np. ZO-1, occludin) i prowadzi do obrzęku blaszki właściwej, zaniku kosmków oraz wzmożonej infiltracji zapalnej (Tabler et al., 2020; Ncho et al., 2025; Jiang et al., 2024).

Dieta i lepkość treści jelitowej. Składniki włókna (NDF) i nieskrobiowych polisacharydów (NSP) modulują lepkość i mikrobiotę; wysoki poziom NSP (np. w życie, jęczmieniu) bez odpowiedniej enzymatyki może skracać kosmki i pogłębiać krypty, pogarszając FCR. Zastosowanie enzymów (np. ksylanazy, β-glukanazy) oraz dodatków prebiotycznych/probiotycznych stabilizuje morfometrię (Singh et al., 2021; Bedford, 2022; Zduńczyk et al., 2015).

Dysbioza i łagodne enteropatie. Tzw. *intestinal dysbiosis* wiąże się z zanikiem kosmków, przerostem komórek kubkowych i naciekiem limfocytarnym błony śluzowej. Towarzyszące temu zmiany w mikrośrodowisku jelitowym obejmują nadprodukcję toksyn bakteryjnych, zaburzenia profilu krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (SCFA) oraz wzrost stresu oksydacyjnego w enterocytach. Tego typu zaburzenia prowadzą do rozwoju tzw. łagodnych enteropatii, które mają charakter subkliniczny — nie powodują wysokiej śmiertelności, ale objawiają się spadkiem tempa wzrostu, pogorszeniem współczynnika wykorzystania paszy (FCR) i obniżoną odpornością. Obraz ten koreluje z makroskopowymi „skoringami" jelita (oceną punktową) w rzeźni (Teirlynck et al., 2011).

Związki między morfometrią a mikrobiomem i wynikami produkcyjnymi

Metaanalizy i badania eksperymentalne wskazują, że wydłużenie kosmków jelitowych oraz wzrost wskaźnika VH:CD często współwystępują z lepszym współczynnikiem wykorzystania paszy (FCR) i wyższymi przyrostami masy ciała. Zjawisko to jest związane z korzystną modulacją mikrobiomu jelitowego, zwłaszcza wzrostem liczebności bakterii produkujących krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe (SCFA), które wspierają integralność bariery jelitowej i poprawiają efektywność trawienia. Zmiany w strukturze mikrobioty, takie jak zwiększenie udziału bakterii fermentujących włókno do SCFA, korelują ze szczelniejszą barierą jelitową i wyższymi wynikami produkcyjnymi (*Feye et al.*, 2020).

W warunkach produkcyjnych stosowanie probiotyków i synbiotyków prowadziło do zwiększenia wysokości kosmków, wyższego stosunku VH:CD oraz zmniejszenia głębokości krypt, co przekładało się na poprawę wydajności brojlerów (*Awad et al.*, 2009; *Shehata et al.*, 2022; *Jha et al.*, 2020). Efekty te są jednak ściśle zależne od szczepu mikroorganizmu, zastosowanej dawki oraz rodzaju diety, co uzasadnia projekt niniejszej pracy, obejmujący ocenę dwóch różnych dawek probiotyku oraz wieloaspektową analizę wyników w oparciu o morfometrię jelit i mikrobiom.

1.3. Probiotyki w drobiarstwie: mechanizmy działania, dobór szczepów, bezpieczeństwo (QPS/EFSA) i drogi podania

Definicje i nomenklatura – fundamenty terminologiczne

Definicja probiotyku. Współcześnie najczęściej stosuje się uściślenie ISAPP: „żywe mikroorganizmy, które podane w odpowiedniej ilości wywierają korzystny efekt zdrowotny u gospodarza" (Hill et al., 2014). Definicja ta akcentuje żywotność, dawkę i korzyść zdrowotną, natomiast nie przesądza o mechanizmie działania (Hill et al., 2014; ISAPP, 2021).

Rewizja taksonomiczna (2020). Dawny szeroki rodzaj *Lactobacillus* został podzielony na 25 nowych rodzajów, m.in. *Lactiplantibacillus*, do którego przeniesiono *L. plantarum* (Zheng et al., 2020; ISAPP, 2020). W całej rozprawie stosujemy nazwę *Lactiplantibacillus plantarum* z przypisem „dawniej *Lactobacillus plantarum*" (Zheng et al., 2020; Heczko, 2023 – przegląd).

Ramy oceny bezpieczeństwa i status QPS (EFSA)

W Unii Europejskiej bezpieczeństwo mikroorganizmów stosowanych w paszach jest oceniane przez Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA). Część taksonów uzyskała status QPS (Qualified Presumption of Safety), który umożliwia uproszczoną ocenę bezpieczeństwa na poziomie gatunku, przy jednoczesnym zachowaniu obowiązku pełnej weryfikacji poszczególnych szczepów. Wymagania te obejmują m.in. brak nabytych genów oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe (AMR) oraz potwierdzenie tożsamości genomowej badanych kultur (*EFSA FEEDAP*, 2018; *EFSA BIOHAZ*, 2023; 2025).

Gatunki *Lactiplantibacillus plantarum* i *Bifidobacterium animalis* znajdują się na aktualnej liście QPS z kwalifikacją „brak nabytych genów oporności istotnych klinicznie" (*EFSA BIOHAZ*, 2023; 2025). Dla wniosków dotyczących dodatków paszowych obowiązują ponadto szczegółowe wytyczne Panelu *FEEDAP* w zakresie charakterystyki mikroorganizmów, obejmujące identyfikację taksonomiczną, ocenę bezpieczeństwa i profil oporności na leki, a także wymóg raportowania pełnych danych sekwencjonowania genomowego (WGS) (*EFSA FEEDAP*, 2018; *EFSA*, 2024a).

Przykładowe opinie Panelu *FEEDAP* dla wybranych szczepów *L. plantarum* potwierdzają ich bezpieczeństwo „dla gatunków docelowych, konsumentów i środowiska" przy założonych warunkach stosowania (*EFSA FEEDAP*, 2023; 2024).

Mechanizmy działania – „model czterech filarów"

W literaturze mechanizmy działania probiotyków u drobiu można syntetycznie ująć w cztery komplementarne filary:

(I) Kolonizacja/adhezja i konkurencja o nisze. Adhezja szczepów probiotycznych do śluzu i nabłonka jelitowego umożliwia konkurencję przestrzenną i koagulację z patogenami. U bakterii z rodzaju *Lactobacillus* rolę odgrywają białka powierzchniowe (w tym tzw. *moonlighting proteins*), motywy LPXTG, a u niektórych gatunków pili sortazozależne (np. fimbrie SpaCBA u *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG), które dramatycznie zwiększają przyleganie do mucyny (Lebeer et al., 2012; von Ossowski et al., 2010; Muscariello et al., 2020). Dla *L. plantarum* wykazano obecność białek wiążących mucynę, zwiększających adhezję i pośredniczących w wykluczaniu patogenów (Singh et al., 2018; Wang et al., 2018).

(II) Metabolity i interakcje troficzne (SCFA, kwas mlekowy, bakteriocyny). Bakterie kwasu mlekowego (LAB) wytwarzają kwas mlekowy (który obniża pH treści jelitowej i ogranicza wzrost *Enterobacteriaceae*), SCFA (octan, propionian, maślan – paliwo dla

enterocytów, wzmacnia połączenia ścisłe) oraz bakteriocyny. U *L. plantarum* kluczową rolę odgrywa rodzina lantybiotyków zwanych plantarycynami (*pln*), których aktywność wobec licznych patogenów obejmuje mechanizmy tworzenia porów w błonie i hamowania syntezy ściany komórkowej (Rocchetti et al., 2021; Xu et al., 2023; Butorac et al., 2023; Azzahra et al., 2025; Li et al., 2023). SCFA (zwłaszcza maślan) zwiększają ekspresję białek ZO-1, okludyny i klaudyn, ograniczając przepuszczalność bariery jelitowej (Liu et al., 2021; Melaku et al., 2021).

(III) Integralność bariery jelitowej. Probiotyki oraz ich metabolity modulują ekspresję białek połączeń ścisłych i stabilność cytoszkieletu, redukując zjawisko „cieknącego jelita". W modelach drobiarskich i liniach komórkowych wykazano, że maślan oraz suplementacja baktrii kwasu mlekowego (LAB) podnoszą poziomy mRNA i białek ZO-1, okludyny i klaudyn, co łączy się z poprawą morfometrii jelit (zwiększenie VH i stosunku VH:CD) oraz lepszym FCR (Yosi et al., 2023 – metaanaliza; Ren et al., 2023; Liu et al., 2021).

(IV) Immunomodulacja (TLR/NOD, cytokiny, IgA). Liczne badania z udziałem *L. plantarum* pokazują spadek poziomu cytokin prozapalnych (IL-1β, IL-6, TNF-α) i wzrost IL-10 oraz IgA, zwłaszcza pod presją wyzwań infekcyjnych (np. *Salmonella*, *Clostridium perfringens*), co przekłada się na lepsze wyniki produkcyjne i łagodniejszy przebieg reakcji zapalnej (Chen et al., 2023; Xiao et al., 2024; Yang et al., 2024; Yin et al., 2024).

Wniosek cząstkowy: Powyższe mechanizmy łączą się w ciąg przyczynowy: *kolonizacja/konkurencja → metabolity (SCFA, bakteriocyny) → szczelność bariery i morfometria → odporność → poprawa FCR i zdrowotności stada.*

Efekty wobec patogenów żywnościowych (Salmonella, Campylobacter) i konsekwencje „One Health"

W fermach drobiowych redukcja kolonizacji *Campylobacter*/*Salmonella* przed ubojem jest kluczowa dla bezpieczeństwa żywności. U brojlerów suplementacja *L. plantarum* (i innych LAB) obniżała liczebność *Campylobacter jejuni* w treści jelitowej i modulowała mikrobiotę w kierunku korzystnym (Valečková et al., 2023; Deng et al., 2020), a preparaty probiotyczne lub synbiotyczne ograniczały kolonizację *Salmonella*, dodatkowo poprawiając parametry wzrostowe (Shanmugasundaram et al., 2019; Naeem et al., 2024; 2025). Efekty nie są jednak absolutnie stałe (wpływ szczepu, dawki, matrycy) i wymagają precyzyjnego doboru szczepów (Madej et al., 2025 – brak redukcji *C. jejuni* po podaniu in ovo).

Specyfika taksonów użytych w projekcie: *Lactiplantibacillus plantarum i Bifidobacterium animalis*

Lactiplantibacillus plantarum to gatunek eurytopowy, dobrze tolerujący kwaśne pH i żółć, znany z wytwarzania plantarycyn, wysokiej konkurencyjności o miejsca adhezji oraz zdolności modulacji odpowiedzi zapalnej (Rocchetti et al., 2021; Butorac et al., 2023). W badaniach na brojlerach różne szczepy *L. plantarum* poprawiały przyrosty, obniżały FCR, zmieniały morfometrię jelit (wydłużenie kosmków, zwiększenie VH:CD) i profil cytokin (Xiao et al., 2024; Chen et al., 2023; Saeed et al., 2025 – przegląd).

Bifidobacterium animalis preferuje środowisko jelit ślepych, fermentuje oligo- i polisacharydy do SCFA (zwłaszcza octanu, istotnego w zjawisku *cross-feeding* do maślanu). U brojlerów kapsułkowane *B. animalis* poprawiało wyniki produkcyjne i wskaźniki odpornościowe, wspierając korzystną morfometrię jelit (Hernández-Granados et al., 2021). Nowsze prace przeglądowe syntetyzują dane na temat mechanizmów działania i uwarunkowań technologicznych tego gatunku.

Synergia mieszanki (LAB + bifidobakterie). Bakterie LAB dominują w proksymalnych odcinkach jelita cienkiego (gdzie wykorzystują cukry proste i obniżają pH), natomiast bifidobakterie – w jelitach ślepych (fermentacja resztkowych substratów błonnikowych). Preparaty wieloszczepowe mogą zatem „pokrywać" różne nisze wzdłuż osi przewodu pokarmowego i oferować efekty komplementarne.

Drogi podania i stabilność technologiczna (pasza, woda, wylęgarnia/in ovo)

Pasza granulowana to najczęstsza forma podania probiotyków, ale temperatura i ciśnienie podczas granulowania paszy redukują przeżywalność bakterii – efekt ten można łagodzić metodami mikroenkapsulacji (Sun et al., 2023; Li et al., 2023).

Podanie z wodą ułatwia interwencje w okresach stresu oraz w pierwszych 1–2 tygodniach życia, pod warunkiem kontroli jakości wody i weryfikacji liczby żywych CFU „na końcu linii".

Wylęgarnia/in ovo: pojawiają się dowody, że aplikacja probiotyków poprzez oprysk w wylęgarni lub podanie in ovo może poprawiać jakość piskląt i wczesną kolonizację przewodu pokarmowego, choć wyniki w zakresie redukcji patogenów są zmienne (Gao et al., 2024; Leão et al., 2021; Ayalew et al., 2023; Madej et al., 2025).

Dawkowanie i relacje dawka–odpowiedź

W praktyce fermowej stosuje się dawki rzędu 10^7–10^9 CFU/kg paszy (w zależności od preparatu i szczepu). Analizy eksperymentalne wskazują na nieliniowość efektów: po przekroczeniu pewnego progu kolonizacji często obserwuje się efekt plateau – dalsze zwiększanie dawki nie przynosi dodatkowych korzyści produkcyjnych, a jedynie podnosi koszty (Hashemitabar et al., 2024; Yosi et al., 2023). Wiele badań z lat 2023–2025 wykazuje zróżnicowanie wyników przy różnych dawkach, co podkreśla konieczność badania zależności dawka–efekt zarówno w warunkach doświadczalnych, jak i praktyce przemysłowej.

Czynniki modulujące skuteczność: dieta, środowisko, wiek

Efekty działania probiotyków u drobiu są heterogeniczne i zależą od wielu czynników, w tym składu diety (zawartości nieskrobiowych polisacharydów, poziomu włókna oraz obecności dodatków enzymatycznych), warunków środowiskowych takich jak stres cieplny i gęstość obsady, a także momentu zastosowania preparatu (np. podanie perinatalne w wylęgarni versus w późniejszym okresie odchowu). Istotne znaczenie mają również forma technologiczna i droga podania (np. mikroenkapsulacja) oraz wyjściowy skład mikrobiomu jelitowego (*baseline* flory jelitowej), który determinuje odpowiedź gospodarza na suplementację (*Naeem et al.*, 2025; *Hashemitabar et al.*, 2024). Z tego względu interpretacja wyników badań nad probiotykami wymaga uwzględnienia *interakcji pomiędzy dietą, probiotykiem i środowiskiem utrzymania.*

1.4. Ramy regulacyjne UE i Polski: ograniczanie antybiotyków, probiotyki jako dodatki paszowe i paradygmat „One Health”

Dlaczego regulacje? „One Health” jako wspólny mianownik

W Unii Europejskiej polityka ograniczania oporności drobnoustrojów (AMR) prowadzona jest w logice *One Health* — zdrowie ludzi, zwierząt i środowiska jest współzależne (EC, 2017; WHO/FAO/WOAH/UNEP, 2022–2026; EC, 2023). Dokumenty ramowe i zalecenia Rady UE z 2023 r. wzywają państwa członkowskie do skoordynowanych działań w całym łańcuchu żywnościowym (Health EC, 2023; ECDC et al., 2024). Strategia „Od pola do stołu” wpisuje się w ten paradygmat i wprowadza konkretny cel: redukcję sprzedaży antybiotyków dla zwierząt gospodarskich i akwakultury o 50% do 2030 r. (względem 2018 r.) (EC, 2020).

Reżim prawny dla dodatków paszowych z mikroorganizmami (probiotyki)

Podstawy: Regulacja (WE) nr 1831/2003.

Podstawy prawne dotyczące autoryzacji, wprowadzania do obrotu i znakowania dodatków paszowych określa rozporządzenie (WE) nr 1831/2003 Parlamentu Europejskiego i Rady. Zgodnie z jego przepisami probiotyki są klasyfikowane jako dodatki zootechniczne, należące do grupy funkcjonalnej *stabilizatorów flory jelitowej*. W procesie autoryzacji wymagane jest przedstawienie danych dotyczących bezpieczeństwa, skuteczności, identyfikacji szczepu oraz warunków jego stosowania (*DG SANTE*, *Legislation on feed additives*; *EUR-Lex* – tekst skonsolidowany; *Feed Additives Register – FIP*, 2024–2025).

Równolegle Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA), za pośrednictwem Panelu *BIOHAZ*, utrzymuje listę taksonów objętych statusem QPS (Qualified Presumption of Safety), obejmującą m.in. *Lactiplantibacillus plantarum* i *Bifidobacterium animalis*. Status QPS umożliwia uproszczenie oceny bezpieczeństwa na poziomie gatunku, jednak każdorazowo wymagana jest szczegółowa weryfikacja szczepu, obejmująca analizę profilu oporności na antybiotyki oraz pełną charakterystykę genomową (*EFSA BIOHAZ*, 2023; 2025).

Oczekiwania UE w zakresie ograniczenia użycia antybiotyków oraz stan ich realizacji w Europie i w Polsce

Cel polityki UE: 50% redukcji do 2030 r. (paradygmat „Farm to Fork" i One Health).

W ramach Europejskiego Zielonego Ładu strategia „Od pola do stołu" (*Farm to Fork*) ustanowiła cel redukcji o 50% łącznej sprzedaży środków przeciwdrobnoustrojowych stosowanych u zwierząt gospodarskich i w akwakulturze w państwach UE-27 do roku 2030, w porównaniu z poziomem bazowym z 2018 r. wynoszącym 118,3 mg/PCU. Oznacza to docelową wartość 59,2 mg/PCU na 2030 r. (*Komisja Europejska*, 2020; *EMA/ESVAC*, 2023).

Zgodnie z koncepcją One Health, ograniczenie stosowania antybiotyków w sektorze zwierzęcym pozostaje nierozerwalnie związane z bezpieczeństwem żywności, ochroną zdrowia publicznego i przeciwdziałaniem rozwojowi oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe (*ECDC/WHO/EU-Obs*, 2024).

Jednostka PCU (Population Correction Unit) normalizuje wielkość sprzedaży leków przeciwdrobnoustrojowych do masy biomasy zwierzęcej w danym kraju, co umożliwia porównania między państwami oraz analizę trendów w czasie (*EEA*, 2024).

Jak mierzy się postęp? Od ESVAC do ESUAvet (ASU Platform).

Po ponad dekadzie gromadzenia danych dotyczących sprzedaży środków przeciwdrobnoustrojowych w ramach projektu ESVAC (*European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption*), od 2023 roku Europejska Agencja Leków (EMA) uruchomiła nowy system monitoringu ESUAvet. Program ten obejmuje coroczne raporty prezentujące zarówno dane dotyczące sprzedaży, jak i rzeczywistego zużycia antybiotyków w państwach członkowskich Unii Europejskiej. System jest zasilany danymi z platformy ASU (Antimicrobial Sales and Use), stanowiącej zintegrowane źródło informacji o stosowaniu środków przeciwdrobnoustrojowych w produkcji zwierzęcej (*EMA*, 2025).

Pierwszy raport ESUAvet 2023 zawiera skonsolidowane dane dla krajów UE-27 oraz EOG, obejmujące rok sprawozdawczy 2023 (*EMA*, 2025).

Stan realizacji w UE (2018–2024/2025): gdzie jesteśmy względem celu?

Poziom bazowy zużycia środków przeciwdrobnoustrojowych w państwach UE-27 w 2018 roku wynosił 118,3 mg/PCU. W 2022 roku wskaźnik ten spadł do 84,8 mg/PCU, co odpowiada redukcji o 28,3% w porównaniu z poziomem bazowym, a więc ponad połowie wymaganej redukcji do 59,2 mg/PCU planowanej na rok 2030 (*ESVAC*, 2023).

W 2023 roku, według danych systemu ESUAvet, średni poziom zużycia wyniósł 88,5 mg/PCU w UE-27 — nieco więcej niż w roku poprzednim, lecz nadal istotnie poniżej wartości z 2018 roku. Szacunki EMA wskazują, że około połowa docelowej redukcji została już zrealizowana (*ESUAvet*, 2023; *FVE*, 2025).

Trend ten potwierdzają także dane Europejskiej Agencji Środowiska (EEA), według których do 2022 roku odnotowano spadek o 28% względem poziomu z 2018 roku (*EEA*, 2024).

Polska na tle UE: punkt wyjścia i zadania wdrożeniowe

Na poziomie krajowym (dane sprzedażowe za 2022 r.) Polska osiągnęła wskaźnik 196,0 mg/PCU (*ESVAC*, 2022), co stanowi wartość istotnie wyższą od mediany europejskiej i jeden z najwyższych poziomów wśród państw Unii Europejskiej (*EMA/ESVAC*, 2023). W latach 2011–2022 obserwowano w Polsce wzrost tego wskaźnika, co kontrastuje z tendencją spadkową odnotowywaną w wielu innych krajach europejskich (*ESVAC*, 2022; raporty przeglądowe).

Nadzór nad obrotem i stosowaniem weterynaryjnych produktów leczniczych w Polsce sprawuje Inspekcja Weterynaryjna, w tym Główny Lekarz Weterynarii (GLW) oraz wojewódzcy lekarze weterynarii (WLW). GLW publikuje wytyczne dotyczące m.in. zasad tzw. „kaskady" i obrotu detalicznego produktami leczniczymi, natomiast Urząd Rejestracji Produktów Leczniczych (URPL) w 2022 r. ogłosił rozpoczęcie stosowania rozporządzenia (UE) 2019/6, wprowadzającego nowy system regulacyjny dla weterynaryjnych produktów leczniczych, stanowiący implementację przepisów unijnych (*GLW*, 2022–2024; *URPL*, 2022).

Wysoki poziom zużycia antybiotyków w Polsce, wyrażony wskaźnikiem mg/PCU, wskazuje na znaczące wyzwanie adaptacyjne w zakresie realizacji celów Europejskiego Zielonego Ładu i strategii *One Health*. Sytuacja ta podkreśla potrzebę wdrożenia skutecznych działań ograniczających stosowanie antybiotyków, w tym poprawy bioasekuracji, rozszerzenia diagnostyki, intensyfikacji programów szczepień oraz poszukiwania alternatywnych strategii żywieniowych — zwłaszcza z wykorzystaniem probiotyków.

1.5. Metody i interpretacja wskaźników mikrobiomu (niefachowy skrót dla czytelnika)

Wskaźniki różnorodności mikrobiomu interpretujemy jako miary bogactwa i wyrównania wspólnot bakteryjnych (wewnątrz próbki – różnorodność alfa, między próbkami lub grupami – różnorodność beta). W niniejszej pracy posłużono się nimi, aby powiązać mechanizmy działania probiotyków (w tym *Lactiplantibacillus plantarum* i *Bifidobacterium animalis*) z wynikami produkcyjnymi, morfometrią jelit (VH, CD, VH:CD) oraz profilem mikrobiomu, przy dwóch różnych dawkach preparatu.

Różnorodność alfa – co jest w próbce?

Najczęściej raportowane są cztery wskaźniki alfa-różnorodności:

- **Observed (liczba ASV/OTU)** – liczba wykrytych taksonów (miara bogactwa). Wskaźnik wrażliwy na głębokość sekwencjonowania i sposób filtrowania rzadkich cech.
- **Chao1** – estymator „ukrytego" bogactwa oparty o udział taksonów rzadkich (singletony/doubletony); uzupełnia wartość *Observed*. (Chao, 1984; przegląd: Gwinn et al., 2016).

- **Shannon** – tzw. różnorodność informacyjna; łączy bogactwo i wyrównanie (evenness) w jedną miarę (Shannon, 1948/1949).
- **Simpson (1–D lub InvSimpson)** – miara dominacji/wyrównania; jej wartość rośnie, gdy żadna grupa taksonów nie dominuje nadmiernie (Simpson, 1949).

Interpretacja zmian tych wskaźników wymaga ostrożności. Wzrost wartości Observed i Chao1 przy niezmienionych wartościach Shannon i Simpson oznacza większą liczbę rzadkich taksonów, lecz bez istotnej zmiany struktury dominacji. Natomiast wzrost wskaźnika Shannon przy stabilnym Observed wskazuje na bardziej wyrównany rozkład liczebności taksonów, czyli mniejszą dominację pojedynczych grup („mniej monokultury").

Nie zawsze jednak „wyższa różnorodność" oznacza „lepszy" stan mikrobiomu. W jelicie cienkim brojlera fizjologiczna dominacja bakterii z rodziny Lactobacillaceae może być zjawiskiem korzystnym. Interpretacja różnorodności mikrobiologicznej musi zatem uwzględniać odcinek przewodu pokarmowego, wiek ptaków oraz skład diety.

Różnorodność beta – *jak bardzo* różnią się grupy próbek?

Różnorodność beta odnosi się do miar odległości lub niepodobieństwa między próbkami bądź grupami, odzwierciedlając różnice w składzie i strukturze wspólnot mikrobiologicznych.

Najczęściej stosowaną metryką ilościową jest **Bray–Curtis**, której wartość mieści się w przedziale od 0 (identyczne próbki) do 1 (całkowicie odmienne wspólnoty). Miara ta reaguje na różnice w względnej liczebności taksonów i stanowi klasyczny wskaźnik ekologiczny wykorzystywany w analizie różnorodności (*Bray & Curtis*, 1957; *Ricotta & Podani*, 2017).

Alternatywnym podejściem są miary filogenetyczne **UniFrac** – w wersji *unweighted* i *weighted*. Obie uwzględniają długość gałęzi drzewa filogenetycznego niewspółdzielonych między porównywanymi próbkami, przy czym wersja *weighted* dodatkowo bierze pod uwagę względną obfitość taksonów (*Lozupone & Knight*, 2005; *Lozupone et al.*, 2007; przegląd, 2010).

Łączenie z wynikami morfometrii i produkcji

Hipoteza robocza

Poprawa wskaźników morfometrii jelita cienkiego, takich jak wysokość kosmków (VH) i stosunek VH:CD, a także wzrost różnorodności mikrobiologicznej (wskaźniki Shannon i Simpson), wskazują na bardziej stabilne środowisko jelitowe i mniejsze ryzyko dysbiozy. Zmiany te powinny przekładać się na lepsze wykorzystanie paszy (niższy FCR) oraz wyższy wskaźnik efektywności produkcji (EPEF).

Cel główny

Celem badania była ocena wpływu suplementacji probiotycznej - w dwóch poziomach dawki - preparatem zawierającym *Lactiplantibacillus plantarum* (dawniej *Lactobacillus plantarum*) oraz *Bifidobacterium animalis* na trzy obszary:

1. parametry produkcyjne brojlerów kurzych,
2. morfometrię jelita cienkiego (VH, CD, VH:CD),
3. strukturę i różnorodność mikrobiomu jelitowego.

W pracy zastosowano aktualną nomenklaturę taksonomiczną wprowadzoną po rewizji rodzaju *Lactobacillus* w 2020 roku, zgodnie z którą gatunek *L. plantarum* został przeniesiony do rodzaju *Lactiplantibacillus*.

Hipotezy badawcze

H1: Zastosowanie preparatu probiotycznego poprawia wyniki produkcyjne brojlerów w porównaniu z grupą kontrolną (bez dodatku).

H2: Efekt działania probiotyku jest zależny od zastosowanej dawki (odpowiedź typu „dawka–efekt").

H3: Suplementacja probiotyczna korzystnie wpływa na morfometrię jelita cienkiego (zwiększenie VH, zmniejszenie CD, wzrost stosunku VH:CD).

H4: Probiotyk modyfikuje skład i różnorodność mikrobiomu jelitowego (zwiększenie alfa-różnorodności, zmiany w beta-różnorodności i strukturze taksonomicznej).

Rozdział 2. Materiały i metody

2.1. Zwierzęta i utrzymanie

Badanie przeprowadzono zgodnie z Dyrektywą 2010/63/UE oraz obowiązującymi przepisami krajowymi. (LKE w Olsztynie 2022.06.12).

Doświadczenie przeprowadzono w zwierzętarni Wydziału Bioinżynierii Zwierząt Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie na 360 jednodniowych kurczętach brojlerach rasy Cobb-500 (płeć mieszana). Pisklęta pochodziły z komercyjnej wylęgarni i po przybyciu zostały losowo przydzielone do trzech grup doświadczalnych (po 120 ptaków w każdej). W ramach każdej grupy wyodrębniono 10 klatek (replikacji), po 12 ptaków w klatce. Pisklęta pochodzące z jednolitego stada hodowlanego zostały zaszczepione przeciwko chorobie Mareka (MD) i zakaźnemu zapaleniu oskrzeli (IB) w wylęgarni drobiu.

Klatki o powierzchni 1,1 m² zapewniały docelową obsadę około 25–27 kg/m² w 35. dobie odchowu (co mieści się w przyjętych normach dobrostanu dla brojlerów). Żywienie: Ptaki otrzymywały pełnoporcjową paszę komercyjną opartą na kukurydzy i śrucie sojowej, podawaną w czterech fazach żywienia. Pasza była zbilansowana zgodnie z normami żywieniowymi NRC i spełniała wymagania pokarmowe brojlerów we wszystkich fazach odchowu.

Tabela 1. Skład surowcowy mieszanek paszowych (%) dla kurcząt brojlerów

Składnik	Starter	Grower 1	Grower 2	Finisher
Okres skarmiania (dni)	0-8	9-18	19-28	pow. 29
Pszenica 10,7 % b.o.	29,9	36,55	24,56	25,01
Pszenżyto 9,5 % b.o.	0	0	13	15
Kukurydza 7,8 % b.o.	30	25	25	25
Poekstrakcyjna śruta sojowa 46% b.o.	31,43	27,71	26,06	24
Przedmieszka Sacox 0,25%	0	0	0,25	0,25
Przedmieszka Maxiban 0,25%	0,25	0,25	0	0
Poekstrakcyjna śruta słonecznikowa 36% b.o.	2	3	2,59	2,74
Premiks Brojler	1	1	1	1
Olej sojowy	2,09	3,48	4,75	4,78
Kreda 0,8-1,4 mm / luz	1,05	0,88	1,06	0,52
Fosforan jednowapniowy luz	0,63	0,6	0,41	0,33
Sól kamienna / big-bag	0,2	0,19	0,22	0,24
Wodorowęglan sodu / big bag	0,25	0,2	0,17	0,14
L-Lizyna HCL	0,38	0,38	0,32	0,31
L-Metionina	0,35	0,3	0,28	0,28
L-Treonina	0,09	0,17	0,13	0,15
L-Walina	0,13	0,09	0,06	0,08
L-Arginina	0,11	0,08	0,04	0,04
L-Izoleucyna	0,07	0,05	0,02	0,05
Chlorek choliny 70% (3a890)	0,07	0,07	0,08	0,08
Suma składników	100	100	100	100

Program kokcydiostatykowy : Starter–Grower 1: Maxiban® (narazyna + nikarbazyna), Grower 2–Finisher: Sacox® (salinomycyna). Docelowe poziomy w paszy zgodne z UE: Maxiban® 40–50 mg narazyny/kg + 40–50 mg nikarbazyny/kg; Sacox® 50–70 mg salinomycyny/kg; karencja 0 dni (UE). Salinomycyny nie łączyć w jednej paszy z innymi kokcydiostykami.

Tabela 2. Skład chemiczny i poziom składników odżywczych (na kg paszy)

Parametr	Jednostka	Starter	Grower 1	Grower 2	Finisher
Sucha masa	g	894,77	893,93	894,71	892,95
Białko surowe (metoda Kjeldahla)	g	222,84	205	194	188
Tłuszcz surowy	g	43,85	56	68,23	68,5
Popiół surowy	g	55,3	50,9	49,81	40,92
Włókno surowe	g	30,42	31,21	30	30
Wapń ogólny	g	9	7	6,4	6
PP-Fosfor przyswajalny	g	5	4	3,6	3,4
Sód	g	1,6	1,4	1,4	1,4
Lizyna	g	14,16	12,9	11,97	11,41
Metionina	g	6,79	6,04	5,76	5,66
Metionina+Cystyna ogólna	g	10,34	9,44	9,02	8,85
Treonina	g	10,17	8,91	8,15	8,05
Walina ogólna	g	11,36	10,2	9,42	9,34
Tryptofan	g	2,61	2,4	2,27	2,23
Arginina ogólna	g	15,54	14,02	12,98	12,44
Izoleucyna ogólna	g	9,76	8,75	8,11	8,01
Witamina A (3a672a)	IU	12000	10000	10000	9000
Witamina D3 (3a671)	IU	4500	3750	3750	3375
Witamina E-(3a700i) octan	IU	60	50	50	45
EM Drób Kcal	Kcal	2990	3070	3160	3200
Lizyna strawna drób	g	12,97	11,79	10,9	10,38

2.2. Warunki środowiskowe

Ptaki utrzymywano w warunkach ścisłej kontroli mikroklimatu. Temperatura w hali doświadczalnej była regulowana automatycznie zgodnie z zaleceniami dotyczącymi dobrostanu. Systemem grzewczym były nagrzewnice gazowe. W celu odpowiedniego przygotowania obiektu rozpoczęto nagrzewanie 24 godziny przed przybyciem piskląt. W założonym czasie osiągnięto temperaturę powietrza 30°C (mierzona na wysokości pisklęcia w

okolicy poidła), a temperatura posadzki wynosiła 28°C przy wilgotności względnej 71%. Następnie temperatura była obniżana zgodnie z zaleceniami firmy genetycznej.

Tabela 3. Zalecane warunki termiczne dla kurcząt brojlerów linii COBB 500.

wiek (dni)	temperatura
0	33°C
7	31°C
14	28°C
28	24°C

Tabela 4. Parametry powietrza wymagane dla kurcząt brojlerów COBB 500.

Parametry powietrza	
tlen %	> 19.6%
dwutlenek węgla (CO_2)	< 0.3% / 3,000 ppm
tlenek węgla	< 10 ppm
amoniak	< 10 ppm
zapylenie	< 3.4 mg/m3
wilgotność względna	< 70%

Ptaki miały stały dostęp do paszy i świeżej wody ad libitum przez cały 35-dniowy okres odchowu.

2.3. Projekt doświadczalny i dawkowanie

Eksperyment prowadzono w układzie całkowicie losowym z trzema grupami: K (kontrola, bez dodatku), D1 (dawka standardowa) i D2 (dawka podwojona). W każdej grupie było 10 klatek (replik) po 12 ptaków (1,1 m²/klatkę). Probiotyk podawano z wodą do picia w zaplanowanych oknach aplikacji w trakcie 35-dniowego tuczu:

- dzień 0 (po zasiedleniu),

- dni 6–8,

- dni 14–17,

- dni 21–23.

Nominalne dawki (na ptaka i dzień aplikacji):

D1: 0,006 g/ptaka/dzień (okna: d 0; d 6–8; d 14–17), zwiększona do 0,012 g/ptaka/dzień w oknie d 21–23.

D2: 0,012 g/ptaka/dzień (okna: d 0; d 6–8; d 14–17), zwiększona do 0,017 g/ptaka/dzień w oknie d 21–23. W każdym oknie aplikacji dawkę przeliczano na stężenie w wodzie, tak aby rzeczywista dostarczona ilość/ptaka była zgodna z planem mimo zmiennego dobowego pobrania wody.

Skład preparatu i przechowywanie

Preparat zawierał Lactiplantibacillus plantarum ATM14 (dawniej Lactobacillus plantarum) 1×10^{10} CFU/g oraz Bifidobacterium animalis ATM30 1×10^{10} CFU/g. Oba szczepy zostały zdeponowane w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM) przy Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu.

Preparat przechowywano w 4 °C, w suchym i ciemnym miejscu. Czas kontaktu z wodą przed podaniem ograniczano do minimum (por. wpływ temperatury/chloru na żywotność; Leão et al., 2021; Li et al., 2023; Sun et al., 2023).

Preparat probiotyczny – przygotowanie roztworu w wodzie, podanie i weryfikacja stężenia

Lactiplantibacillus plantarum ATM14 1×10^{10} CFU/g + Bifidobacterium animalis ATM30 1×10^{10} CFU/g ⇒ łącznie 2×10^{10} CFU/g mieszaniny.

1) Ilość CFU/ptaka/dzień.

(dla obu szczepów łącznie; w nawiasie - na jeden szczep)

- 0,006 g/pt/d ⇒ $1{,}2\times10^{8}$ CFU/pt/d ($6{,}0\times10^{7}$/pt/d na szczep)
- (*Obliczenie:* 0,006 g × 2×10^{10} CFU/g = $1{,}2\times10^{8}$ CFU)
- 0,012 g/pt/d ⇒ $2{,}4\times10^{8}$ CFU/pt/d ($1{,}2\times10^{8}$/pt/d na szczep)
- 0,017 g/pt/d ⇒ $3{,}4\times10^{8}$ CFU/pt/d ($1{,}7\times10^{8}$/pt/d na szczep)

Suma podaży w całym zaplanowanym harmonogramie (okna: d 0; d 6–8; d 14–17; d 21–23)

- D1 (0,006; 0,006; 0,006; 0,012 g/pt/d): $1\times1{,}2\times10^{8}$ + $3\times1{,}2\times10^{8}$ + $4\times1{,}2\times10^{8}$ + $3\times2{,}4\times10^{8}$ = $1{,}68\times10^{9}$ CFU/pt łącznie (oba szczepy).
- D2 (0,012; 0,012; 0,012; 0,017 g/pt/d): $1\times2{,}4\times10^{8}$ + $3\times2{,}4\times10^{8}$ + $4\times2{,}4\times10^{8}$ + $3\times3{,}4\times10^{8}$ = $2{,}94\times10^{9}$ CFU/pt łącznie.

Poniżej gotowe wartości dla typowego pobrania wody 0,20 / 0,30 / 0,40 / 0,50 L/pt/d:

A) Dawka 0,006 g/pt/d (D1 w oknach d0; d6–8; d14–17)

Pobranie (L/pt/d)	g/L	CFU/L (oba szczepy)	CFU/mL
0,20	0,0300	$6{,}0\times10^{8}$	$6{,}0\times10^{5}$
0,30	0,0200	$4{,}0\times10^{8}$	$4{,}0\times10^{5}$
0,40	0,0150	$3{,}0\times10^{8}$	$3{,}0\times10^{5}$
0,50	0,0120	$2{,}4\times10^{8}$	$2{,}4\times10^{5}$

B) Dawka 0,012 g/pt/d (D1 w d21–23 oraz D2 w d0; d6–8; d14–17)

Pobranie (L/pt/d)	g/L	CFU/L	CFU/mL
0,20	0,0600	$1{,}2\times10^{9}$	$1{,}2\times10^{6}$
0,30	0,0400	$8{,}0\times10^{8}$	$8{,}0\times10^{5}$
0,40	0,0300	$6{,}0\times10^{8}$	$6{,}0\times10^{5}$
0,50	0,0240	$4{,}8\times10^{8}$	$4{,}8\times10^{5}$

C) Dawka 0,017 g/pt/d (D2 w d21–23)

Pobranie (L/pt/d)	g/L	CFU/L	CFU/mL
0,20	0,0850	$1,7\times10^{9}$	$1,7\times10^{6}$
0,30	0,0567	$1,13\times10^{9}$	$1,13\times10^{6}$
0,40	0,0425	$8,5\times10^{8}$	$8,5\times10^{5}$
0,50	0,0340	$6,8\times10^{8}$	$6,8\times10^{5}$

2) Kontrola stężenia i żywotności (CFU) w wodzie

Oznaczanie CFU:

Liczbę żywych komórek bakterii określano metodą posiewów powierzchniowych, wyrażając wyniki jako jednostki tworzące kolonie (CFU).

Dla szczepu Lactiplantibacillus plantarum posiew prowadzono na podłożu MRS agar (de Man, Rogosa & Sharpe), w temperaturze 37 °C, w warunkach mikroaerofilnych przez 48 h (*de Man et al.*, 1960).

Dla szczepu Bifidobacterium animalis zastosowano selektywne podłoże TOS Propionate Agar zgodne z normą ISO 29981:2010, w warunkach beztlenowych, w temperaturze 37 °C przez 48–72 h.

Kryteria akceptacji i procedura korekty:

Stabilność preparatu w roztworze wodnym oceniano na podstawie parametrów liczby żywych komórek (CFU).

Kryterium akceptacji przyjęto jako wartość *End of Life (EoL)* $T_0 \geq 80\%$ ($-0,1$ $\log_{10}$) względem stężenia początkowego (T_0 *Zbiornik*), przy dopuszczalnym spadku $\leq 1,0$ $\log_{10}$ w ciągu 6 h od przygotowania roztworu.

Korektę stosowano w przypadku niespełnienia powyższych warunków:

– gdy wartość *EoL* T_0 spadała poniżej 80%, stężenie preparatu zwiększano o 15–20% podczas kolejnej aplikacji,

– gdy spadek liczby żywych komórek przekraczał 1,0 $\log_{10}$ w ciągu 6 h, skracano czas rozprowadzania preparatu (np. przez porcjowanie), obniżano temperaturę roztworu lub wykonywano dodatkową aplikację („booster") po 3–4 h.

2.4. Wskaźniki produkcyjne

Podczas doświadczenia monitorowano podstawowe wyniki produkcyjne brojlerów, obejmujące parametry wzrostu, wykorzystania paszy oraz zdrowotności. Do ocenianych wskaźników należały:

Masa ciała – ważona indywidualnie co tydzień (np. w 7., 14., 21., 28. dniu życia) oraz końcowa masa w 35. dniu odchowu.

Przyrost masy ciała – obliczony na podstawie różnicy masy początkowej i końcowej; wyrażony jako średni dzienny przyrost masy.

Pobranie paszy – rejestrowane per klatka (kolektywnie dla 12 ptaków) w ujęciu tygodniowym i łącznym, poprzez pomiar podanej paszy i paszy pozostającej (niewyjedzonej).

Współczynnik konwersji paszy (FCR) – obliczony jako stosunek skumulowanego pobrania paszy do przyrostu masy ciała w danym okresie (kg paszy na 1 kg przyrostu masy).

Śmiertelność – odnotowywana codziennie; padłe sztuki usuwano, ważono i notowano przyczynę padnięcia (o ile była możliwa do ustalenia).

Pomiary masy ciała przeprowadzano w godzinach porannych; spożycie paszy monitorowano w ujęciu klatkowym – paszę zadawaną oraz pozostałą ważono, a różnicę wyrażano jako dzienne pobranie paszy na ptaka w klatce. Na podstawie tych danych obliczono FCR, wykorzystując średni przyrost masy i skumulowane spożycie paszy w danej grupie. Wszelkie upadki rejestrowano na bieżąco (śmiertelność w okresie 35 dni nie przekroczyła założonego poziomu w żadnej grupie). Liczba padłych ptaków w danej klatce została uwzględniona przy kalkulacji skorygowanego FCR oraz śr. masy ciała (dane z padłych sztuk wyłączono z dalszych analiz).

2.5. Morfometria

Badania morfometryczne zostały wykonane w Katedrze Anatomii Patologicznej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UWM w Olsztynie.

Pod koniec trwania doświadczenia (w 35. dniu) po uboju ptaków pobrano fragmenty jelit do badań morfometrycznych w celu oceny wpływu probiotyku na strukturę błony śluzowej przewodu pokarmowego. Z każdej grupy wybrano losowo po 6 ptaków.

Z dwunastnicy, jelita czczego oraz jelita biodrowego (krętego) wycięto fragmenty o długości ~2 cm. Przyjęto ujednolicone miejsca pobrania: dwunastnica – środkowy odcinek pętli dwunastniczej; jelito czcze – odcinek w połowie odległości między końcem dwunastnicy a uchyłkiem Meckela; jelito biodrowe – odcinek proksymalny przed ujściem do jelita ślepego

Pobrane próbki przepłukano solą fizjologiczną i utrwalono w 10% buforowanej formalinie obojętnej na co najmniej 48 godzin. Następnie materiały poddano standardowej procedurze histologicznej – odwodnieniu w ciągu alkoholowym, zatopieniu w parafinie i skrojeniu na mikrotomie na skrawki o grubości ~5 µm. Skrawki barwiono hematoksyliną i eozyną (H+E)

Preparaty histologiczne analizowano pod mikroskopem świetlnym wyposażonym w system analizy obrazu (przy powiększeniu 100×). Na otrzymanych przekrojach oceniono kluczowe parametry morfometryczne kosmków i krypt jelitowych: wysokość kosmków (VH, ang. villus height), głębokość krypt (CD, ang. crypt depth) oraz stosunek wysokości kosmków do głębokości krypt (VH:CD). Pomiary wykonywano na dobrze wyprostowanych, nietkniętych strukturach – w każdej próbce mierzono co najmniej 10 najlepiej uwidocznionych kosmków i odpowiadających im krypt, a z uzyskanych wartości obliczano średnią dla danego ptaka. Definicje pomiarów: wysokość kosmka definiowano jako odległość od szczytu kosmka do miejsca połączenia z kryptą, natomiast głębokość krypty – jako odległość od dna krypt do podstawy kosmka. Na podstawie tych dwóch wielkości wyliczano następnie wartość wskaźnika VH:CD dla każdej próbki. Uzyskane parametry morfometryczne posłużyły jako wskaźniki stanu i funkcjonalności błony śluzowej jelit. Struktura kosmków jelitowych bezpośrednio przekłada się na efektywność wchłaniania składników pokarmowych – długie kosmki i stosunkowo płytkie krypty świadczą o większej powierzchni absorpcyjnej i lepszym stanie zdrowotnym jelit. Wysokość kosmków oraz stosunek VH:CD są uznawane za kluczowe indykatory potencjału trawiennego i absorpcyjnego jelita cienkiego. Zwiększenie tych parametrów (przy jednoczesnym spłyceniu krypt) oznacza usprawnienie procesów trawienia i wchłaniania. W literaturze wykazano, że suplementacja probiotyków może korzystnie modulować te wskaźniki – brojlery otrzymujące probiotyk miewają wyższe kosmki oraz wyższy stosunek wysokości kosmków do krypt, a ich krypty jelitowe są płytsze w porównaniu

z kontrolą. Dlatego też ocena morfometrii jelit stanowiła istotny element analizy wpływu zastosowanego probiotyku na kondycję przewodu pokarmowego ptaków.

2.6. Mikrobiom jelitowy

Równolegle z analizą histologiczną przeprowadzono badanie mikrobioty jelitowej, koncentrując się na mikrobiomie jelita ślepego i czczego. Bezpośrednio po uboju ptaków z każdej grupy z ich jelit ślepych aseptycznie pobrano próbki treści (około 1–2 g z każdego ptaka). Materiał z każdego ptaka umieszczono w oddzielnej probówce jałowej i natychmiast zamrożono (–80 °C) do czasu analizy laboratoryjnej DNA. Izolacja DNA: genomy DNA bakterii wyekstrahowano z próbek treści jelitowej za pomocą metody z detergentem CTAB (heksadecylotrimetyloamoniowy bromek) w wersji dostosowanej do izolacji z kału. Jakość i integralność pozyskanego DNA sprawdzono w żelu agarozowym (1% agarozy w buforze TBE), a stężenie oznaczono spektrofotometrycznie.

Sekwencjonowanie 16S rRNA zostało wykonane w firmie Genomed ul. Ponczowa 02-971 Warszawa.

Analiza metagenomiczna populacji bakterii i archeonów została przeprowadzona na bazie hiperzmiennego regionu V3-V4 genu 16S rRNA. Do amplifikacji wybranego regionu i przygotowania biblioteki użyto specyficznych sekwencji primerów 341F oraz 785R (analiza 16S). PCR przeprowadzono z użyciem Q5 Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix, a warunki reakcji dostosowano zgodnie z zaleceniami producenta. Sekwencjonowanie wykonano na aparacie MiSeq w technologii paired-end (PE), 2x300 nt, z użyciem zestawu v3 Illumina. Szczegółowe informacje są dostępne na stronach internetowych producentów odczynników. Automatyczna analiza danych wstępnych została przeprowadzona na sekwenatorze MiSeq z użyciem oprogramowania MiSeq Reporter (MSR).

Analiza składała się z dwóch etapów:

I. Automatyczne demultipleksowanie próbek.

II. Generowanie plików fastq z surowymi odczytami. Analiza bioinformatyczna, zapewniająca klasyfikację odczytów do poziomu gatunku, została wykonana pakietem oprogramowania QIIME 2 w oparciu o bazę sekwencji referencyjnych Silva 138. Wykorzystano również pakiet DADA2, który umożliwił wyodrębnienie sekwencji o pochodzeniu biologicznym od tych powstałych w trakcie sekwencjonowania. Pakiet ten posłużył także do wyodrębnienia

unikalnych sekwencji biologicznego pochodzenia, czyli tzw. sekwencji ASV (ang. amplicon sequence variant). Analiza obejmowała następujące etapy:

1. Kontrola jakości odczytów:

- analiza profilu błędu poszczególnych próbek oraz dynamiczne generowanie parametrów do kontroli jakości (narzędzie FIGARO).
- przeprowadzenie kontroli jakości w oparciu o współczynnik maksymalnych oczekiwanych błędów próbki (ang. maximum expected errors).

2. Wstępna obróbka danych przy użyciu narzędzia Cutadapt:

• usunięcie sekwencji adaptorowych

• odrzucenie zbyt krótkich odczytów (minimalna długość 30 nt)

3. Wyselekcjonowanie unikalnych sekwencji ASV (przy użyciu pakietu DADA2) poprzez:

• odfiltrowanie sekwencji zawierających błędy powstałe w trakcie procesu sekwencjonowania (ang. denoising)

• łączenie sparowanych odczytów - w celu zwiększenia dokładności sekwencjonowania przeprowadza się je w trybie paired-end, przez co na późniejszych etapach analizy odpowiadające sobie odczyty forward i reverse muszą zostać połączone,

• dereplikację - scalenie identycznych, unikalnych sekwencji przy zachowaniu liczby ich wystąpień oraz profilu jakości,

• filtrowanie chimer - pozbycie się konstruktów powstałych z nieprawidłowego złożenia sekwencji w trakcie PCR,

4. Przyporządkowanie taksonomii do sekwencji ASV na podstawie referencyjnej bazy Silva, stosując podejście hybrydowe:

• porównanie sekwencji ASV względem bazy w poszukiwaniu identycznych sekwencji referencyjnych (vsearch),

• nietypowe sekwencje pozostałe po poprzednim kroku zostają zaklasyfikowane w oparciu o metody wykorzystujące uczenie maszynowe (sklearn).

W badaniach produkcyjności jednostką doświadczalną była klatka (grupa 12 ptaków utrzymywana razem stanowiła jeden zestaw powtórzeniowy dla danego traktowania). Tym samym wszystkie wyniki produkcyjne analizowano w ujęciu średnich wartości z klatek (np. średnia masa ciała ptaków w klatce, łączna pasza zjedzona przez ptaki w klatce itp.).

W przypadku danych, które dotyczyły indywidualnych ptaków (np. parametry morfometryczne jelit czy skład mikrobiomu), z każdej klatek losowo pobierano jednego reprezentatywnego osobnika. Do analizy danych ilościowych zastosowano modele liniowe uwzględniające strukturę losową doświadczenia. Wyniki produkcyjne (przyrosty masy, zużycie paszy, FCR) porównano między grupami za pomocą liniowego modelu mieszanego (LMM), w którym traktowanie (grupa) było efektem stałym, a efekt losowy stanowiła „klatka" (uwzględnienie różnic między klatkami).

Ujęcie losowego czynnika klatkowego w modelu pozwala kontrolować powtarzalne obserwacje w obrębie jednej jednostki doświadczalnej i zapobiega pseudoreplikacji wyników.

Dla zmiennych mierzonych wielokrotnie w czasie (np. masa ciała w kolejnych tygodniach) wykorzystano rozszerzony model LMM dla pomiarów powtarzanych, z czasem jako czynnikiem wewnątrz-obiektowym (ang. repeated measures). Analizę przeprowadzono z użyciem pakietu lme4 w środowisku R (v.4.2.2), a do weryfikacji istotności efektów zastosowano test Walda typu F. W przypadku stwierdzenia istotnych efektów głównych, wykonano porównania parami pomiędzy grupami post-hoc z korekcją na wielokrotność testów (procedura Tukey HSD, realizacja w pakiecie emmeans). Dane morfometryczne jelit (VH, CD, VH:CD) analizowano analogicznie za pomocą LMM – dla każdego odcinka jelita (dwunastnica, czcze, biodrowe) obliczono średnie wartości na ptaka i porównano między grupami (czynnik stały: traktowanie; efekt losowy: klatka). Dodatkowo zweryfikowano interakcję między traktowaniem a odcinkiem jelita w modelu dwuczynnikowym. W przypadku braku istotnych interakcji, raportowano główne efekty traktowania, a gdy interakcja była istotna – analizowano efekty proste w ramach każdego odcinka z osobna.

Analiza mikrobiomu: Różnice w strukturze społeczności mikrobiologicznej jelit między grupami oceniono za pomocą nieparametrycznego testu permutacyjnej analizy wariancji – PERMANOVA (Permutational Multivariate ANOVA). Test ten przeprowadzono na macierzach odległości β-różnorodności (np. dystans Bray-Curtisa) z wykorzystaniem 999 permutacji dla oceny istotności efektu grupy. PERMANOVA pozwala sprawdzić hipotezę

zerową o braku różnic w składzie mikrobiomów między grupami, uwzględniając jednocześnie odległości wewnątrz i między grupami w przestrzeni wielowymiarowej.

W niniejszej analizie odrzucenie H_0 oznaczało, że co najmniej jedna grupa probiotykowa różniła się pod względem składu mikroflory jelitowej od kontroli. Różnorodność alfa (np. indeksy Shannon, liczba gatunków) porównano między grupami za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) lub – w razie niespełnienia założeń – testu Kruskala-Wallisa. Różnice w liczebności (obfitości) poszczególnych taksonów mikrobioty pomiędzy grupami eksperymentalnymi określono z wykorzystaniem metody ANCOM-BC (Analysis of Composition of Microbiomes with Bias Correction)

ANCOM-BC to nowoczesna procedura porównawcza dla danych mikrobiomicznych, która szacuje i koryguje tzw. fraction bias wynikający z różnic w ułamku próbkowania między próbkami, umożliwiając bardziej rzetelne wykrywanie różnic w absolutnej liczebności taksonów. Metoda ta opiera się na modelu liniowym (w skali log) z wprowadzonym offsetem korygującym i pozwala na przeprowadzenie klasycznych testów istotności dla każdego taksonu z osobna, dostarczając jednocześnie przedziałów ufności dla oszacowanych różnic. Istotnym atutem ANCOM-BC jest kontrola odsetka fałszywych odkryć (FDR) – w przeciwieństwie do wielu standardowych metod różnice wykryte przez ANCOM-BC zachowują zadany poziom istotności statystycznej ($\alpha=0,05$) nawet przy analizie wielu taksonów jednocześnie. Wszystkie analizy statystyczne wykonywano w środowisku R (wersja 4.2) oraz Python (pakiet Qiime2 do obróbki sekwencji). Za istotne statystycznie uznawano efekty przy $p < 0,05$. Wyniki przedstawiono jako średnie wartości z odchyleniem standardowym (Mean ± SD) lub w formie graficznej, odpowiednio do charakteru danych. Wszystkie wykresy i tabele zostały wygenerowane z użyciem programów GraphPad Prism 9 oraz R ggplot2.

Rozdział 3. Wyniki

3.1. Wyniki produkcyjne

Tabela 5**.** Wyniki produkcyjne brojlerów (masa ciała w czasie, śmiertelność, FI, FCR) w grupie kontrolnej (K) oraz grupach otrzymujących pojedynczą (D1) lub podwójną (D2) dawkę preparatu. Wartości przedstawiono jako średnie ± SD; różnice istotne statystycznie oznaczono różnymi literami (a, b) przy średnich w wierszach.

Wiek (dni) / Wskaźnik (35 dni)	**Grupa K**	**Grupa D1**	**Grupa D2**
7 dni – masa ciała (g)	186,3 ± 7,3[a]	192,1 ± 6,1[a]	191,0 ± 6,9[a]
14 dni – masa ciała (g)	529,8 ± 12,4[a]	555,2 ± 9,8[b]	547,6 ± 8,2[b]
21 dni – masa ciała (g)	1059,6 ± 18,2[a]	1130,4 ± 16,7[b]	1114,9 ± 17,8[b]
28 dni – masa ciała (g)	1699,8 ± 154,3[a]	1839,6 ± 67,2[a]	1799,8 ± 112,3[a]
35 dni – masa ciała (g)	2279,4 ± 164,8[a]	2431,7 ± 102,8[b]	2409,1 ± 123,9[ab]
Przyrost masy (g) (0–35 dni)	2237,4 ± 164,8[a]	2389,7 ± 102,8[b]	2367,1 ± 123,9[ab]
Zużycie paszy (FI, g/ptaka)	3490 ± 257[a]	3585 ± 154[a]	3622 ± 189[a]
Współczynnik konwersji paszy (FCR)	1,56 ± 0,08[a]	1,50 ± 0,14[a]	1,53 ± 0,12[a]
Śmiertelność (%)	3,3% (4/120)[a]	1,7% (2/120)[a]	3,3% (4/120)[a]

Uwaga: Różne litery przy wartościach w tym samym wierszu oznaczają różnice istotne statystycznie ($p < 0,05$). FI – średnie pobranie paszy na kurczę; FCR – współczynnik wykorzystania paszy. FI i FCR obliczono według wzorów: FCR = FI / przyrost masy ciała; FI = FCR × (masa ciała 35. dnia – 42 g). Początkowa masa pisklęcia (dzień 0) została przyjęta jako 42 g.

Dane poddano jednoczynnikowej analizie wariancji ANOVA lub testowi Kruskala–Wallisa – w zależności od spełnienia założeń testów parametrycznych. Masa ciała brojlerów w

7. i 28. dobie życia nie różniła się istotnie między grupami (odpowiednio $p = 0,147$ i $p = 0,077$; ANOVA dla 7. doby, test Kruskala–Wallisa dla 28. doby). Począwszy od 14. doby odnotowano istotne zróżnicowanie masy ciała między grupami (ANOVA, $p < 0,001$ w 14. dobie; test Kruskala–Wallisa, $p < 0,001$ w 21. dobie; ANOVA, $p = 0,035$ w 35. dobie). W 14. i 21. dniu życia kurczęta z grup D1 i D2 osiągnęły istotnie wyższą masę ciała niż grupa kontrolna K (post hoc Tukey/Dunn, $p < 0,05$), przy braku różnic między grupami D1 i D2. W 35. dniu życia największą masę ciała uzyskały brojlery z grupy D1, istotnie wyższą od kontroli ($p = 0,042$), natomiast masa ciała grupy D2 była pośrednia i nie różniła się statystycznie od pozostałych grup. Analiza pozostałych wskaźników produkcyjnych (liczonych za cały okres 35 dni) nie wykazała istotnych różnic między grupami. Przyrost masy ciała był statystycznie wyższy w grupie D1 niż w grupie K (ANOVA, $p = 0,034$; Tukey, $p = 0,042$), zaś grupa D2 uzyskała wynik pośredni (nieistotny względem K i D1). Zużycie paszy (FI) na jedno zwierzę oraz współczynnik konwersji paszy (FCR) kształtowały się na zbliżonym poziomie we wszystkich grupach (ANOVA, odpowiednio $p = 0,35$ i $p = 0,53$). Śmiertelność była niska we wszystkich grupach (1,7–3,3%) i nie różniła się istotnie (test χ^2, $p = 0,67$).

3.2. Morfometria - dwunastnica

W dwunastnicy stwierdzono wyraźne różnice morfometryczne między grupami. Wysokość kosmków (VH) była najwyższa w grupie D1 i istotnie większa ($p < 0,05$) od wartości notowanych w grupie kontrolnej oraz D2. Kosmki dwunastnicy brojlerów otrzymujących pojedynczą dawkę dodatku (D1) były średnio o około 10% wyższe niż u kontrolnych, co wskazuje na zwiększoną powierzchnię chłonną. Natomiast w grupie D2 wysokość kosmków była najniższa – dwukrotna dawka dodatku spowodowała obniżenie średniej wysokości kosmków w porównaniu z kontrolą (różnica istotna statystycznie).

Analogiczne, przeciwstawne efekty zaobserwowano dla głębokości krypt (CD). Najpłytsze krypty występowały u brojlerów D1, istotnie płytsze niż w kontroli ($p < 0,05$). Średnia głębokość krypt zmniejszyła się w D1 o ok. 10% względem kontrolnych, co sugeruje mniejszą intensywność proliferacji nabłonka. Z kolei w grupie D2 odnotowano pogłębienie krypt – krypty były istotnie głębsze niż w grupie kontrolnej.

W efekcie stosunek wysokości kosmków do głębokości krypt (VH:CD) przyjął najwyższe wartości w grupie D1, a najniższe w grupie D2. U brojlerów D1 stosunek VH:CD zwiększył się istotnie ($p < 0,05$) w porównaniu z kontrolą (świadcząc o korzystnym wydłużeniu

kosmków przy płytszych kryptach). Natomiast u ptaków D2 stosunek ten był istotnie niższy od kontrolnego, co odzwierciedla skrócenie kosmków i pogłębienie krypt. Można zatem wnioskować, że pojedyncza dawka dodatku (D1) poprawiła architekturę błony śluzowej dwunastnicy, zwiększając potencjalną powierzchnię wchłaniania, podczas gdy podwójna dawka (D2) wpłynęła negatywnie na morfometrię jelita (ograniczenie rozwoju kosmków, hiperplazja krypt).

3.3. Morfometria - jelito czcze

W odcinku czczym zaobserwowano mniej wyraźne zmiany morfometryczne. Wysokość kosmków jelitowych (VH) pozostawała na zbliżonym poziomie we wszystkich grupach, a różnice nie były istotne statystycznie. Średnia wartość VH w grupie D1 była nieznacznie wyższa niż w kontroli (trend wzrostowy o około 4–8%), natomiast w grupie D2 – nieco niższa. Jednakże duża zmienność osobnicza w obrębie grup ograniczała istotność statystyczną obserwowanych różnic.

Istotne różnice odnotowano natomiast w głębokości krypt jelita czczego. Brojlery z grupy D1 miały płytsze krypty niż kontrolne ($p < 0,05$), wskazując na korzystny efekt pojedynczej dawki – redukcję proliferacji krypt. Średnia głębokość krypt w D1 obniżyła się o ok. 15–20% względem kontroli. Z kolei w grupie D2 nastąpiło pogłębienie krypt jelita czczego – średnia głębokość krypt była większa niż u kontrolnych i różnica ta okazała się istotna statystycznie.

Zmiany te wpłynęły na stosunek VH:CD w jelicie czczym. Najwyższy średni stosunek zanotowano w grupie D1, co oznacza poprawę relacji wysokości kosmków do głębokości krypt. Stosunek VH:CD w D1 był istotnie wyższy od kontrolnego ($p < 0,05$). W grupie D2 wartość tego wskaźnika uległa obniżeniu (zgodnie z oczekiwaniem, biorąc pod uwagę krótsze kosmki i głębsze krypty), jednak spadek ten nie osiągnął istotności statystycznej – wartości VH:CD dla D2 pozostały zbliżone do kontrolnych. Ogółem w jelicie czczym pojedyncza dawka dodatku (D1) przyniosła korzystne zmiany histologiczne (płytsze krypty, tendencja do wyższych kosmków i większego VH:CD), natomiast podwójna dawka (D2) spowodowała pogorszenie niektórych parametrów (głębsze krypty) bez wyraźnego efektu poprawy kosmków.

3.4. Morfometria - jelito biodrowe

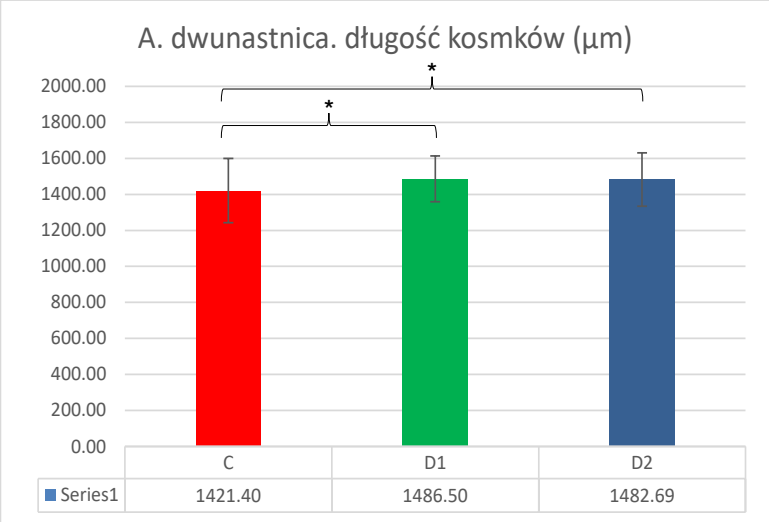
W jelicie biodrowym zaobserwowano wyraźne, przeciwstawne efekty między grupą D1 a D2, choć zmienność wyników sprawiła, że nie wszystkie różnice okazały się istotne.

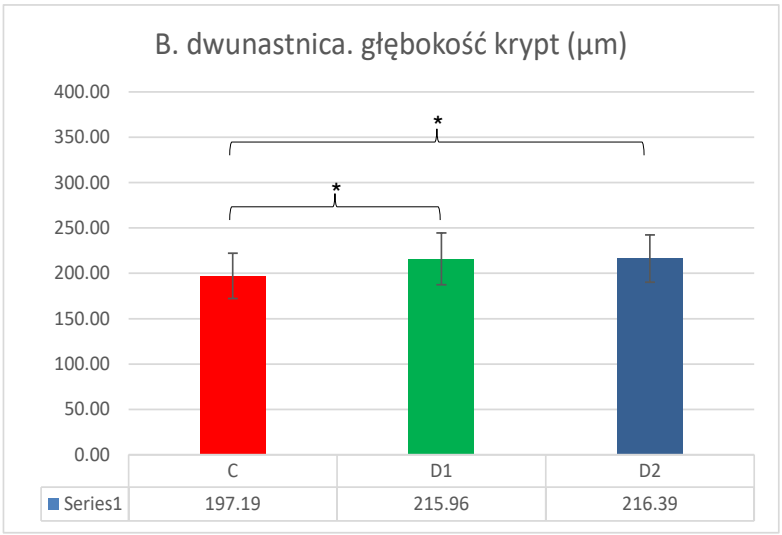
Wysokość kosmków w grupie D1 była najwyższa spośród badanych (średnio o ok. 15% wyższa niż w kontroli) i różniła się istotnie od wartości kontrolnej ($p < 0,05$). Natomiast w grupie D2 stwierdzono obniżenie kosmków – były one średnio niższe niż u brojlerów kontrolnych (różnica istotna). Oznacza to, że podawanie podwójnej dawki mogło skutkować pewnym ograniczeniem rozwoju kosmków w jelicie biodrowym.

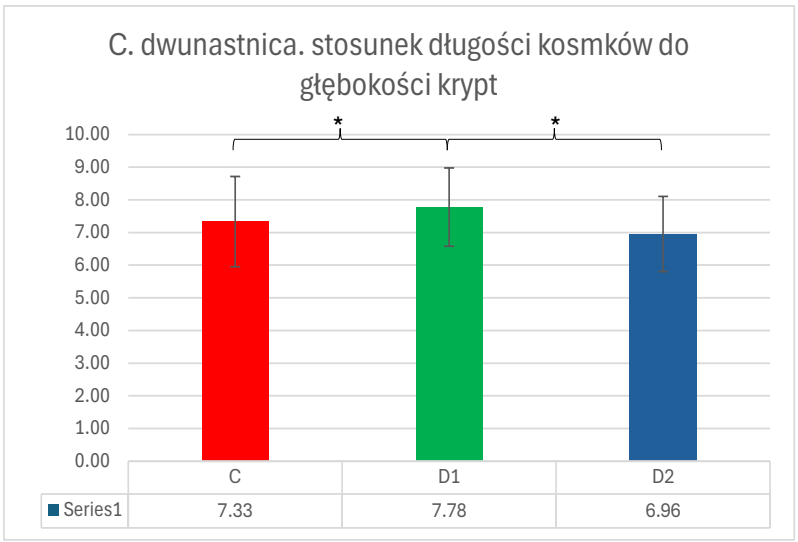
W przypadku głębokości krypt odnotowano analogiczny wzorzec zmian. Najpłytsze krypty występowały w grupie D1 (istotnie płytsze od kontrolnych), podczas gdy u brojlerów D2 krypty jelita biodrowego były znacznie głębsze niż w grupie K ($p < 0,05$). Różnice pomiędzy wszystkimi trzema grupami były tutaj wyraźne, co sugeruje, że dawka dodatku silnie wpływa na tempo odnowy nabłonka w końcowym odcinku jelit.

Stosunek VH:CD w jelicie biodrowym wykazał tendencję do zmian zgodnych z powyższymi obserwacjami – najwyższy średnio w D1, najniższy w D2 – jednak różnice te nie zostały potwierdzone statystycznie. Pomimo zauważalnej różnicy wartości bezwzględnych (w grupie D1 stosunek VH:CD był ok. 15% wyższy niż w kontroli, a w D2 ok. 20% niższy), wysoka zmienność między osobnikami sprawiła, że nie stwierdzono istotnych różnic dla tego parametru. Tendencje te wskazują jednak na potencjalną poprawę architektury błony śluzowej w D1 (wydłużenie kosmków przy nieznacznym spłyceniu krypt) oraz jej pogorszenie w D2 (skrócenie kosmków, pogłębienie krypt), nawet jeśli w analizie statystycznej pozostają one na poziomie zmian nieistotnych.

Podsumowując, morfometria jelit brojlerów wykazała korzystny wpływ pojedynczej dawki suplementu (D1) na rozwój kosmków i strukturę krypt w całym jelicie cienkim, co przekładało się na zwiększenie potencjalnej powierzchni wchłaniania. Z kolei podwójna dawka (D2) nie przyniosła dalszej poprawy – przeciwnie, zaobserwowano cechy sugerujące pogorszenie stanu morfologicznego jelit (m.in. cechy ograniczenia rozwoju kosmków i hiperplazji krypt).

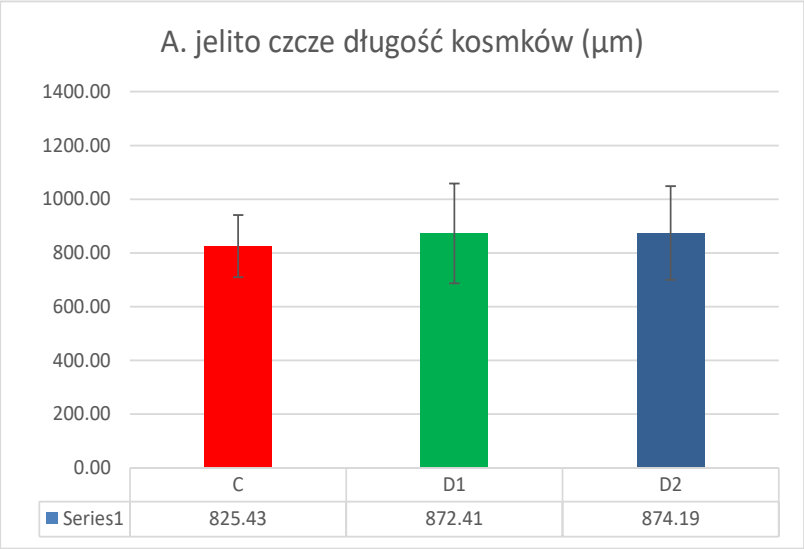

A. dwunastnica. długość kosmków (µm)
2000.00
1800.00
1600.00
1400.00
1200.00
1000.00
800.00
600.00
400.00
200.00
0.00
*
*
C
D1
D2
Series1
1421.40
1486.50
1482.69

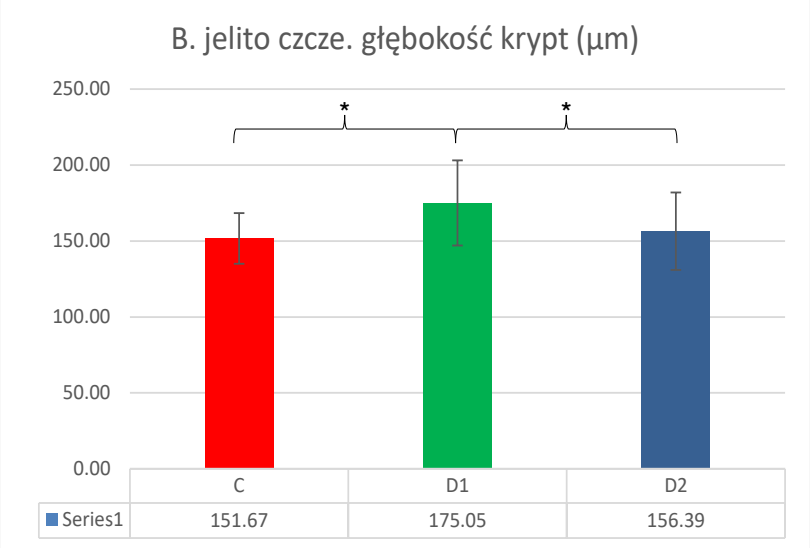

B. dwunastnica. głębokość krypt (µm)
400.00
350.00
300.00
250.00
200.00
150.00
100.00
50.00
0.00
*
*
C
D1
D2
Series1
197.19
215.96
216.39

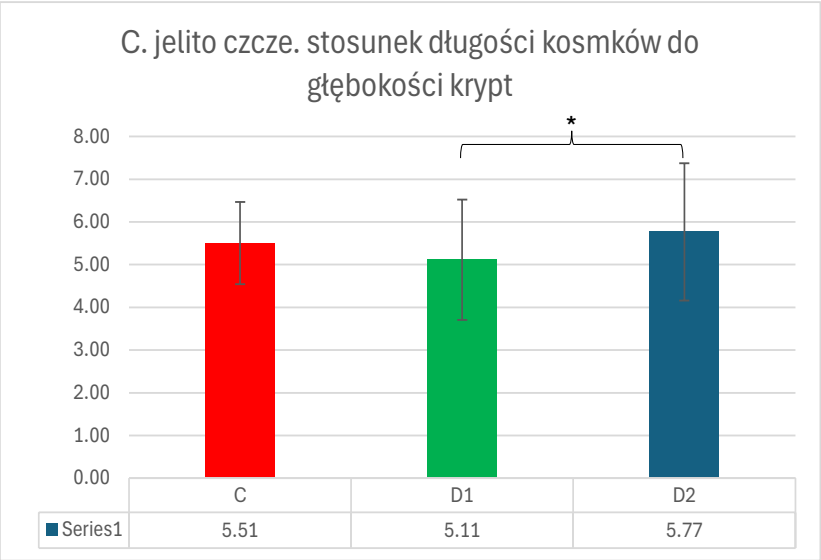

C. dwunastnica. stosunek długości kosmków do głębokości krypt
10.00
9.00
8.00
7.00
6.00
5.00
4.00
3.00
2.00
1.00
0.00
*
*
C
D1
D2
Series1
7.33
7.78
6.96

Ryc. 1. Parametry morfometrii jelit: wysokość kosmków (VH), głębokość krypt (CD) i stosunek VH:CD.

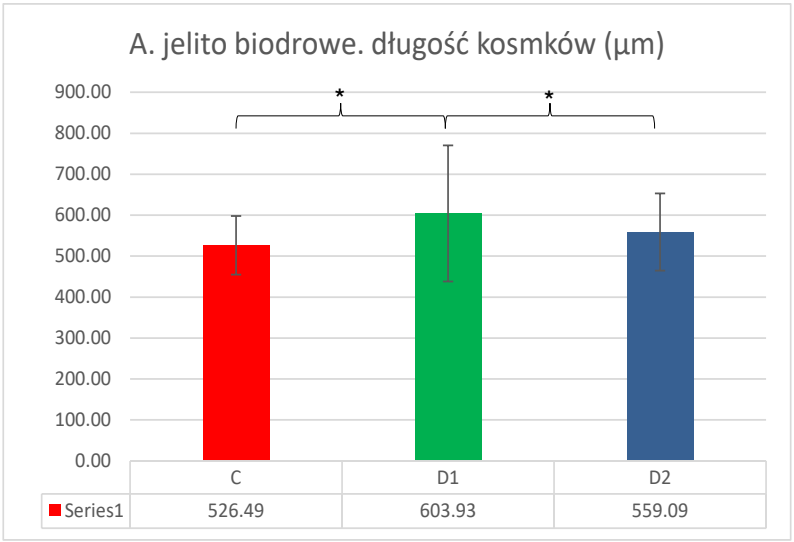
(A–C) dwunastnica

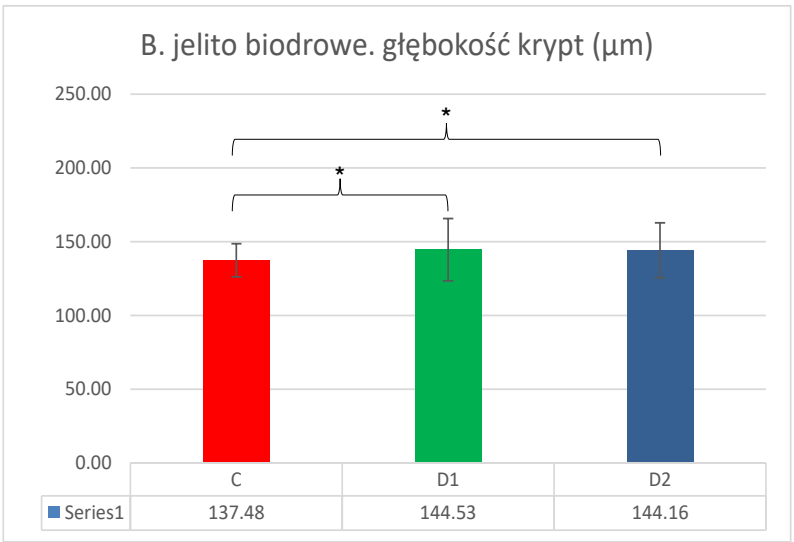


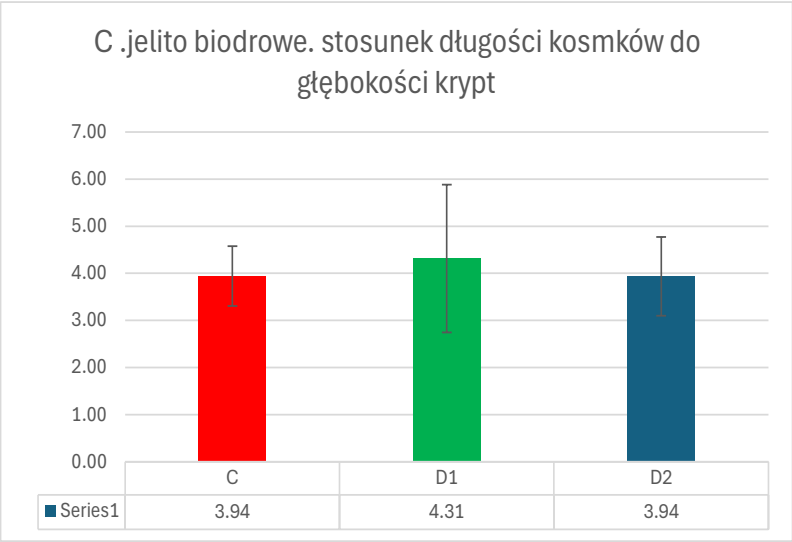




Ryc. 2. Parametry morfometrii jelit: wysokość kosmków (VH), głębokość krypt (CD) i stosunek VH:CD. (A–C) jelito czcze.





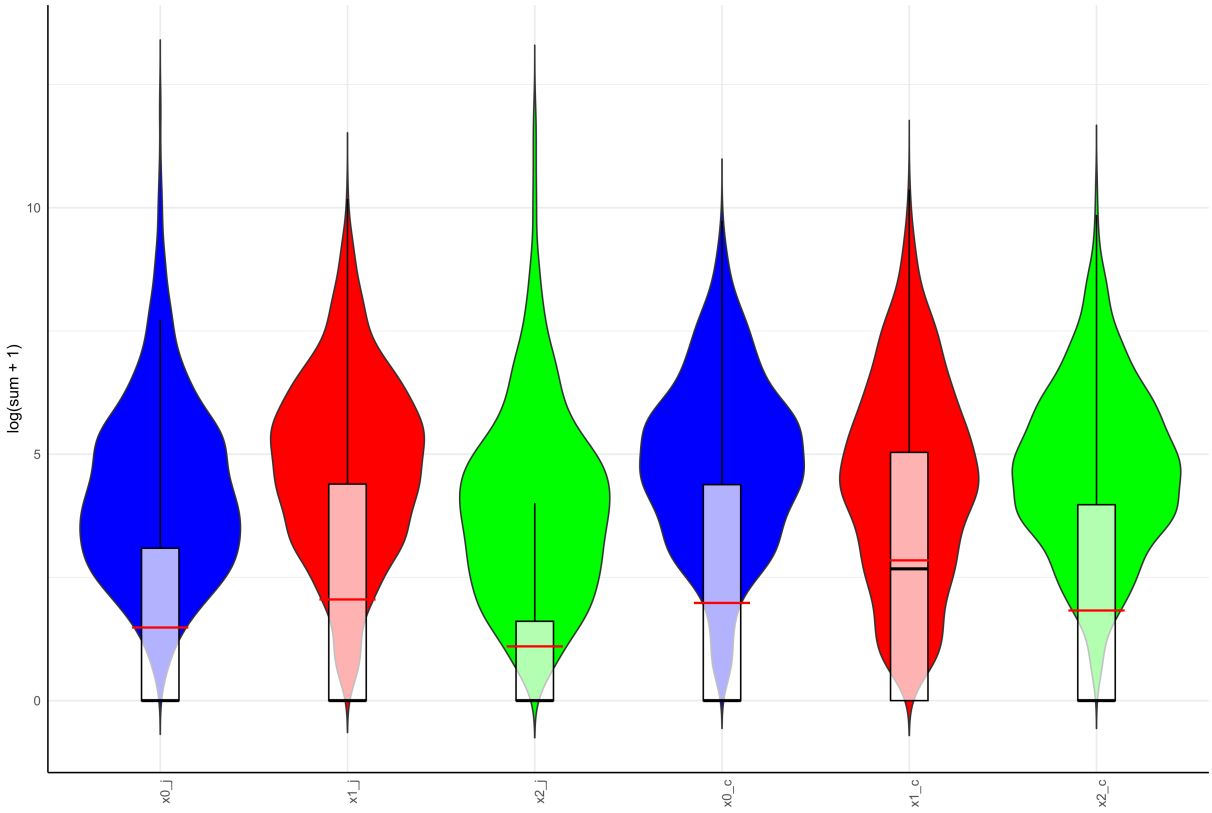


Ryc. 3. Parametry morfometrii jelit: wysokość kosmków (VH), głębokość krypt (CD) i stosunek VH:CD. (A–C) jelito biodrowe.

3.5. Wyniki analizy mikrobiomu jelitowego

SampleID	location	dose	d__Bacteria
x0_c1	cecum	ctrl	58231
x0_c2	cecum	ctrl	61381
x0_c3	cecum	ctrl	55968
x0_c4	cecum	ctrl	72821
x0_c5	cecum	ctrl	69268
x0_j1	jejunum	ctrl	92872
x0_j2	jejunum	ctrl	78905
x0_j3	jejunum	ctrl	133781
x0_j4	jejunum	ctrl	66331
x0_j5	jejunum	ctrl	81492
x1_c1	cecum	single	123354
x1_c2	cecum	single	83202
x1_c3	cecum	single	119120
x1_c4	cecum	single	120913
x1_c5	cecum	single	153467
x1_j1	jejunum	single	54848
x1_j2	jejunum	single	140834
x1_j3	jejunum	single	55898
x1_j4	jejunum	single	57886
x1_j5	jejunum	single	74349
x2_c1	cecum	double	52586
x2_c2	cecum	double	62387
x2_c3	cecum	double	67049
x2_c4	cecum	double	77165
x2_c5	cecum	double	50078
x2_j1	jejunum	double	112194
x2_j2	jejunum	double	57472
x2_j3	jejunum	double	69746
x2_j4	jejunum	double	106132
x2_j5	jejunum	double	87056

Tabela 6**.** Ogólna charakterystyka analizowanych próbek, obejmująca identyfikator próbki, lokalizację jelitową (jelito ślepe lub czcze), wariant doświadczenia (kontrola, pojedyncza dawka, podwójna dawka) oraz liczbę sekwencji przypisanych do domeny *Bacteria* (d__Bacteria). Tabela przedstawia układ doświadczenia oraz potwierdza wystarczające pokrycie sekwencjonowania we wszystkich próbach.



Ryc. 4. Wykresy skrzypcowe logarytmicznie przekształconych sum liczebności ASV (log(suma+1)) w jelicie czczym (j) i jelicie ślepym (c) brojlera kurzego w grupach: kontrolnej (x0), w dawce pojedynczej (x1) i w dawce podwójnej (x2). Pojedyncza dawka suplementu mikrobiologicznego znacząco zwiększyła obserwowane wartości ASV w obu segmentach jelita w porównaniu z grupą kontrolną, podczas gdy podwójna dawka nie nasiliła tego efektu i skutkowała wartościami zbliżonymi lub niższymi niż w grupie kontrolnej.

Interpretacja:

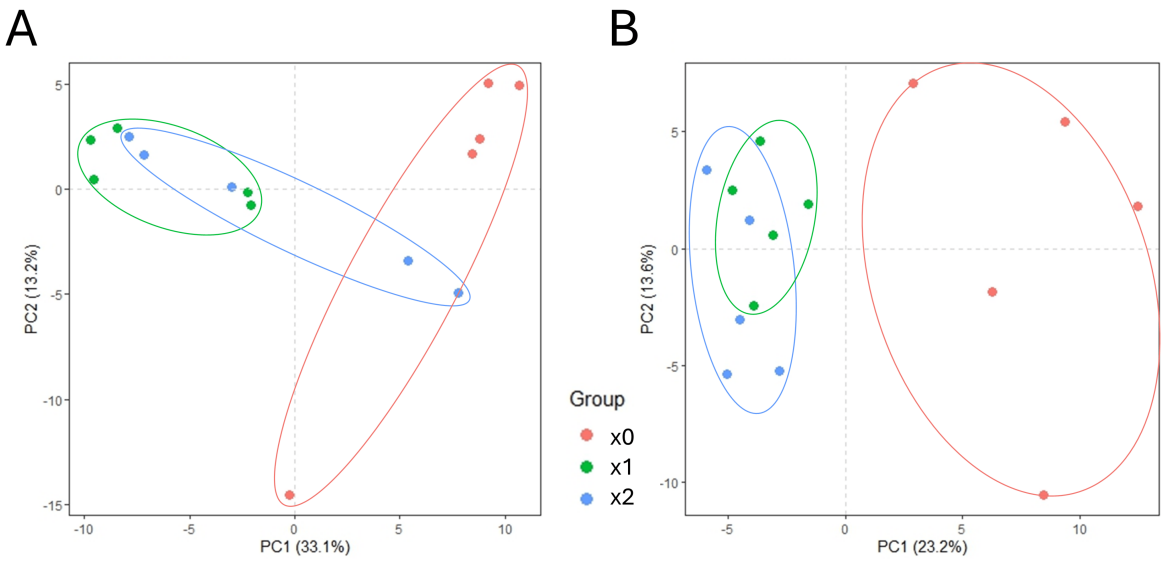
x0_c, x0_j – kontrola (c – jelito ślepe, j – jelito czcze),

x1_c, x1_j – grupa D1,

x2_c, x2_j – grupa D2.

Wykres pudełkowo-wiolinowy ma charakter poglądowy i obrazuje, że dane po transformacji logarytmicznej rozkładają się w sposób zbliżony do rozkładu normalnego. Rozrzut wartości jest spójny między grupami, co potwierdza, że dane dobrze nadają się do dalszych porównań statystycznych. Mimo tej ogólnej zgodności, już na poziomie sum ASV widoczne są wyraźne różnice pomiędzy grupami doświadczalnymi.

W obu odcinkach jelit pojedyncza dawka (x1) prowadziła do wyraźnego wzrostu wartości ASV w porównaniu z kontrolą (x0). W jelicie czczym (x1_j) oraz ślepym (x1_c) wartości są najwyższe, co jest zgodne z wcześniejszymi analizami alfa-różnorodności (Shannon, Simpson), gdzie pojedyncza dawka zwiększała bogactwo i równomierność mikrobioty. Podwójna dawka (x2) w obu odcinkach nie wzmacniała efektu – wartości wracały do poziomów zbliżonych do kontroli (x0), a w niektórych przypadkach były nawet niższe. Kształt violinów pokazuje, że rozrzut wartości w grupie pojedynczej dawki jest większy, ale średnia (czerwona linia) pozostaje wyraźnie wyższa niż w grupach kontrolnych i podwójnej dawki.



Ryc. 5. Analiza głównych składowych (PCA) składu mikrobiomu w jelicie czczym (A) i jelicie ślepym (B) kurcząt. Próbki grupują się według grup suplementacji: kontrolnej (x0, czerwony), pojedynczej dawki (x1, zielony) i podwójnej dawki (x2, niebieski). W jelicie czczym grupa pojedynczej dawki wyraźnie różni się od grupy kontrolnej, podczas gdy grupa podwójnej dawki wykazuje pośredni wzorzec. W jelicie ślepym obie grupy suplementacji wyraźnie różnią się od grupy kontrolnej, co wskazuje na silny efekt modulacyjny suplementacji mikrobiologicznej.

Interpretacja:

Jelito czcze (A):

- Próbki wyraźnie separują się pomiędzy grupą kontrolną (x0) a grupą pojedynczej dawki (x1).
- Grupa z podwójną dawką (x2) plasuje się pomiędzy nimi, częściowo pokrywając się z obiema grupami.
- Oznacza to, że najsilniejszy efekt różnicujący mikrobiotę jelita czczego daje pojedyncza dawka suplementu, a podwójna nie prowadzi do jednoznacznej separacji – społeczność mikrobiologiczna przypomina częściowo kontrolę, a częściowo pojedynczą dawkę.

Jelito ślepe (B):

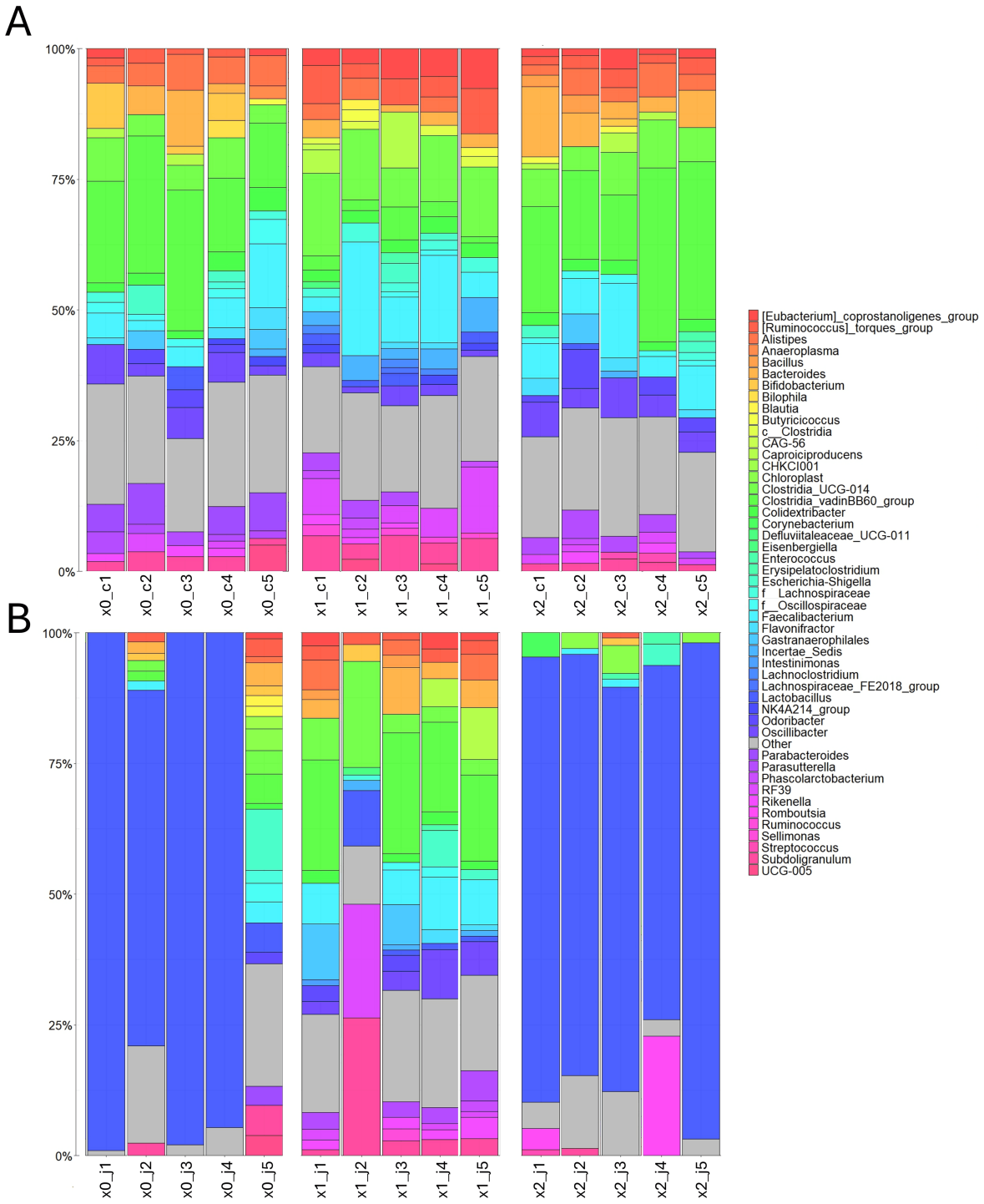
- Kontrola (x0) wyraźnie oddziela się od obu grup suplementacyjnych.
- Pojedyncza dawka (x1) i podwójna dawka (x2) tworzą dwa blisko położone, ale wciąż rozróżnialne klastry.

- Widać, że suplementacja – niezależnie od dawki – znacząco zmienia skład mikrobioty jelita ślepego, przy czym pojedyncza i podwójna dawka mają bardziej zbliżony efekt niż w jelicie czczym.

Wniosek ogólny:

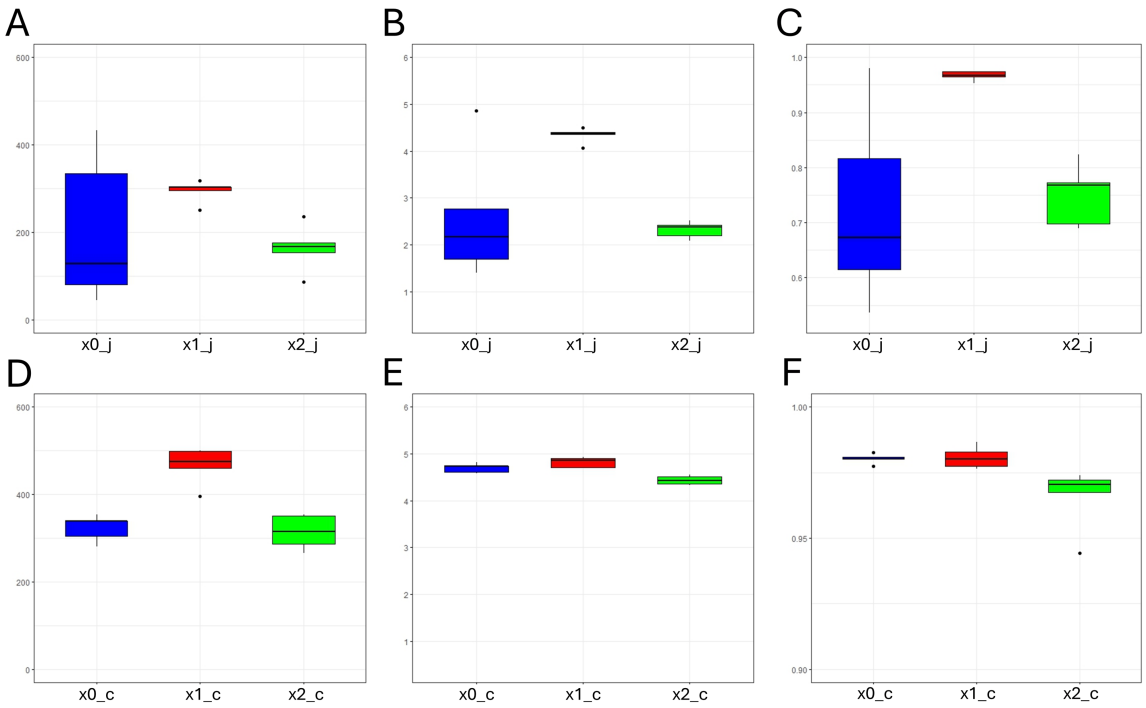
PCA potwierdza, że suplementacja wpływa na skład mikrobioty obu odcinków jelit, ale w różny sposób:

- w jelicie czczym pojedyncza dawka działa wyraźnie, a podwójna częściowo niweluje ten efekt,
- w jelicie ślepym każda dawka wyraźnie odróżnia się od kontroli, a obie dawki mają podobny kierunek działania.



Ryc. 6. Profil taksonomiczny mikrobioty (poziom rodzaju) w jelicie ślepym (A) i jelicie czczym (B) brojlerów z grup: kontrolnej K (*x0*), probiotyk – dawka standardowa D1 (*x1*) oraz dawka podwojona D2 (*x2*). Oznaczenia próbek: *c* – cecum, *j* – jejunum; cyfry 1–5 – repliki (np. *x1_c3*). Wysokość segmentów słupka przedstawia udział względny [%] danego taksonu (kolor = rodzaj wskazany w legendzie); „Other" = taksony o niskiej obfitości i/lub

nieprzypisane na poziomie rodzaju. Słupki sumują się do 100%. Dane uzyskano metodą 16S rRNA (region V3–V4), z przypisaniem taksonomicznym wg SILVA v138.



Ryc. 7. Alfa-różnorodność mikrobioty jelitowej brojlerów po suplementacji probiotyku. (A–C) jelito czcze (jejunum), (D–F) jelito ślepe (cecum). A, D – bogactwo taksonomiczne (*Observed ASVs*); B, E – indeks Shannona; C, F – indeks Simpsona.

Grupy: x0 = K (kontrola), x1 = D1 (dawka standardowa), x2 = D2 (dawka podwojona); sufiksy _j i _c oznaczają odpowiednio jelit oczcze i ślepe. Pudełka przedstawiają IQR (Q1–Q3), pozioma linia w pudełku – medianę, wąsy – 1,5× IQR, punkty – obserwacje odstające.

Interpretacja dla jelita czczego

1. ASV observed (bogactwo gatunkowe)

- Test globalny (One-way ANOVA): **p = 0.17** → brak istotnych różnic pomiędzy grupami.

- Na wykresie: grupa kontrolna (K-cz) ma dużą rozpiętość wyników (część prób wysokie, część niskie), natomiast grupy I-cz i II-cz są bardziej zwarte.
- Interpretacja: suplementacja (ani pojedyncza, ani podwójna dawka) nie wpływała istotnie na ogólną liczbę obserwowanych taksonów w jelicie czczym.

2. Shannon index (różnorodność z uwzględnieniem równomierności)

- Test globalny (One-way ANOVA): **p = 0.00369** → różnice istotne.
- Post-hoc (Tukey):
    - II–I: **p = 0.0049** → istotna różnica
    - K–I: **p = 0.0125** → istotna różnica
    - K–II: **p = 0.863** → brak różnicy
- Na wykresie: I-cz ma najwyższą różnorodność, istotnie wyższą od K-cz i II-cz, które są do siebie podobne.
- Interpretacja: pojedyncza dawka suplementu zwiększała różnorodność mikrobioty w jelicie czczym, natomiast podwójna dawka już tego efektu nie dawała (wracała do poziomu zbliżonego do kontroli).

3. Simpson index (różnorodność z naciskiem na dominację gatunków)

- Test globalny (Welch ANOVA): **p = 0.00007** → różnice istotne.
- Post-hoc (Games–Howell):
    - II–I: istotna różnica
    - K–I: istotna różnica
    - K–II: brak różnicy
- Na wykresie: I-cz ma najwyższy wskaźnik (bliski 1 → brak dominacji pojedynczych gatunków, bardzo równomierna społeczność). K-cz i II-cz są podobne, z większą dominacją pojedynczych ASV.
- Interpretacja: efekt pojedynczej dawki suplementu to bardziej równomierny i zbalansowany skład mikrobioty w jelicie czczym. Podwójna dawka tego efektu nie utrzymuje.

Podsumowanie dla jelita czczego:

- Bogactwo gatunkowe (ASV observed) – brak różnic.
- Różnorodność (Shannon, Simpson) – pojedyncza dawka suplementu zwiększa różnorodność i równomierność mikrobioty, natomiast podwójna dawka nie daje dodatkowego efektu i społeczność mikrobiologiczna wygląda podobnie jak w kontroli.

Interpretacja dla jelita ślepego

1. ASV observed (bogactwo gatunkowe)

- Test globalny (One-way ANOVA): **p = 4.72e-05** → różnice istotne.
- Post-hoc (Tukey):
  - II–I: $p < 0.001$ → istotna różnica
  - K–I: $p < 0.001$ → istotna różnica
  - K–II: $p = 0.927$ → brak różnicy
- Na wykresie: I-s (pojedyncza dawka) ma wyraźnie najwyższe bogactwo gatunkowe. K-s i II-s są podobne, niższe.
- **Interpretacja:** pojedyncza dawka suplementu zwiększa liczbę taksonów w jelicie ślepym, podczas gdy podwójna dawka tego efektu nie utrzymuje (wraca do poziomu kontroli).

2. Shannon index (różnorodność z uwzględnieniem równomierności)

- Test globalny (One-way ANOVA): $p = 0.000252$ → różnice istotne.
- Post-hoc (Tukey):
  - II–I: $p = 0.00021$ → istotna różnica
  - K–I: $p = 0.183$ → brak różnicy
  - K–II: $p = 0.0049$ → istotna różnica
- Na wykresie: I-s ma najwyższy poziom Shannon index, II-s najniższy. K-s pośredni, bliżej I-s niż II-s.

- **Interpretacja**: pojedyncza dawka suplementu poprawia różnorodność mikrobioty, podwójna dawka ją obniża (istotnie mniej niż kontrola).

3. Simpson index (różnorodność z naciskiem na dominację)

- Test globalny (Kruskal–Wallis): **p = 0.0090** → różnice istotne.
- Post-hoc (Dunn, BH adjustment):
    - II–I: **p = 0.0082** → istotna różnica
    - K–I: **p = 0.416** → brak różnicy
    - K–II: **p = 0.0087** → istotna różnica
- Na wykresie: I-s ma najwyższy indeks (bliski 1 → równomierna struktura mikrobioty), II-s niższy, co sugeruje większą dominację pojedynczych gatunków. K-s jest podobny do I-s.
- **Interpretacja**: pojedyncza dawka zwiększa równomierność społeczności mikrobiologicznej, natomiast podwójna dawka prowadzi do spadku tej równomierności (silniejsza dominacja kilku taksonów).

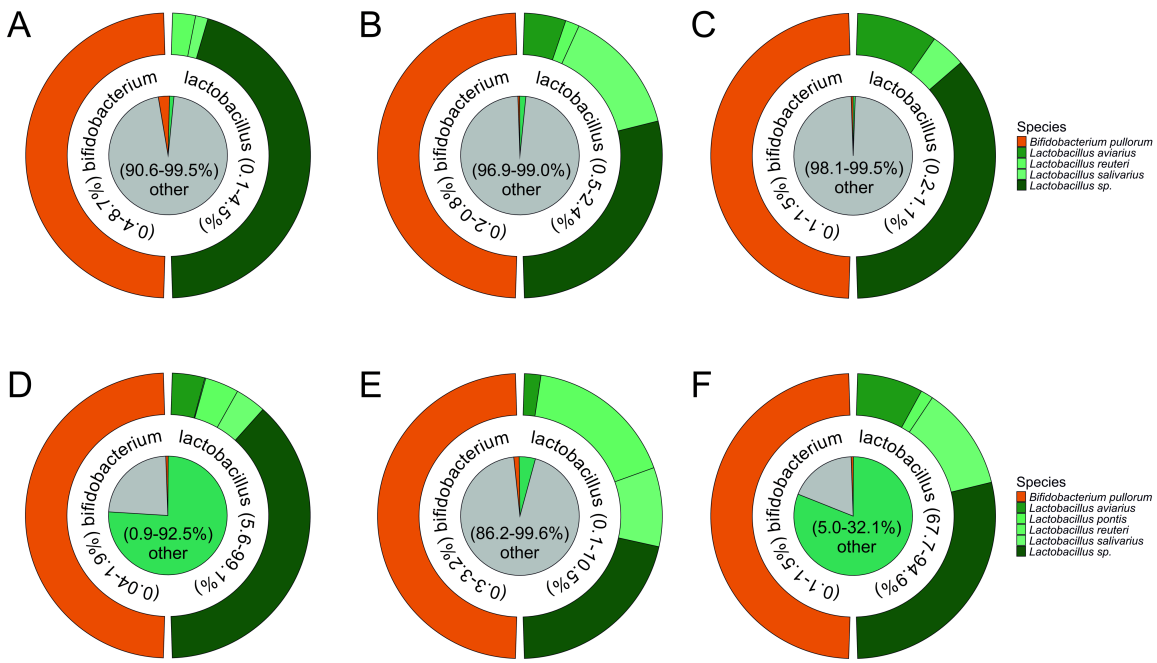
<u>Podsumowanie dla jelita ślepego:</u>

- Bogactwo gatunkowe (ASV observed) – pojedyncza dawka znacząco zwiększa liczbę taksonów; podwójna dawka nie daje efektu (poziom jak w kontroli).
- Shannon index – pojedyncza dawka poprawia różnorodność, podwójna dawka obniża ją poniżej kontroli.
- Simpson index – pojedyncza dawka sprzyja równomiernemu składowi społeczności, podwójna dawka obniża równomierność i zwiększa dominację pojedynczych taksonów.

Wniosek ogólny (jelito czcze + ślepe):

- Pojedyncza dawka suplementu drobnoustrojów ma korzystny wpływ na mikrobiotę – zwiększa jej różnorodność i równomierność zarówno w jelicie czczym, jak i ślepym.
- Podwójna dawka nie wzmacnia efektu, a wręcz może działać negatywnie (obniżenie różnorodności i równomierności, efekt zbliżony do kontroli lub gorszy).

Analiza alfa-różnorodności mikrobioty w jelicie czczym i ślepym wykazała zbieżny wzorzec reakcji na suplementację drobnoustrojami. W obu odcinkach przewodu pokarmowego pojedyncza dawka suplementu istotnie zwiększała różnorodność i równomierność mikrobioty, co przejawiało się wzrostem indeksów Shannona i Simpsona oraz wyraźnie wyższą liczbą obserwowanych ASV (szczególnie w jelicie ślepym). Z kolei podwójna dawka nie potęgowała tego efektu – w jelicie czczym prowadziła do poziomu zbliżonego do kontroli, natomiast w jelicie ślepym wiązała się wręcz z istotnym spadkiem różnorodności i równomierności w stosunku do grupy kontrolnej. Wyniki te sugerują, że korzystny wpływ suplementacji występuje wyłącznie przy umiarkowanej dawce, natomiast jej zwiększenie może działać niekorzystnie na stabilność i złożoność społeczności mikrobiologicznej kur.



Ryc. 8. Udział procentowy dominujących taksonów bakteryjnych w jelicie ślepym (A–C) i czczym (D–F) kur w zależności od zastosowanego wariantu suplementacji. Panele A i D przedstawiają grupy kontrolne, panele B i E grupy z pojedynczą dawką suplementu, a panele C i F grupy z podwójną dawką. Wewnętrzne koło zostało podzielone na trzy rodzaje: Lactobacillus (zielony), Bifidobacterium (pomarańczowy) oraz pozostałe bakterie (szary). Zewnętrzny pierścień obrazuje proporcje poszczególnych gatunków zidentyfikowanych w obrębie tych rodzajów. Wartości liczbowe oznaczają zakres procentowego udziału (od–do) obserwowanego w próbach indywidualnych, natomiast przedstawione graficznie segmenty odpowiadają średnim wartościom uzyskanym dla każdej grupy.

Rozdział 4. Dyskusja

4.1. Wyniki produkcyjne (masa ciała, FCR, śmiertelność)

Zastosowanie badanych probiotyków (Lactiplantibacillus plantarum ATM14 i Bifidobacterium animalis ATM30) korzystnie wpłynęło na wyniki produkcyjne brojlerów kurzych, przy czym najbardziej korzystne efekty uzyskano w grupie z dawką pojedynczą (D1). W 35. dniu życia D1 charakteryzowała się wyższą masą ciała (≈ +6–7% vs K) oraz niższym FCR (≈ –4% vs K) niż pozostałe grupy; D2 dawała wyniki pośrednie i nie przewyższała D1. Taki wzorzec („sweet spot" dawki) jest spójny z doniesieniami, że działanie probiotyków u drobiu nie zawsze rośnie liniowo z dawką – często występuje poziom optymalny, po którego przekroczeniu korzyści nie narastają (Mountzouris et al., 2010; Yadav & Jha, 2019; Gaggia et al., 2010). Mechanistycznie efekt D1 można wiązać z lepszą stabilizacją mikrobioty, większą produkcją SCFA i mniejszym kosztem immunologicznym przy zachowanej równomierności społeczności (Awad et al., 2009; Markowiak & Śliżewska, 2018). Literatura potwierdza, że suplementacja paszy probiotykami często skutkuje przyspieszeniem wzrostu i lepszym FCR drobiu rzeźnego. Przykładowo, Awad i in. (2009) wykazali istotny wzrost masy ciała oraz poprawę FCR u brojlerów otrzymujących preparat probiotyczny lub synbiotyczny w porównaniu z grupą kontrolną – wydajność była zbliżona do efektu stymulatora antybiotykowego. Podobnie Samli i wsp. (2007) stwierdzili, że dodatek Enterococcus faecium do paszy poprawił przyrosty masy i obniżył FCR w ciągu 21 dni odchowu brojlerów. Mechanizmami stojącymi za lepszymi przyrostami mogą być m.in. usprawnienie trawienia i wchłaniania składników pokarmowych pod wpływem probiotyków oraz redukcja liczby patogenów, co zmniejsza obciążenie immunologiczne zwierząt. Probiotyki produkują krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe (SCFA), takie jak octowy, propionowy czy masłowy, zakwaszając środowisko jelit. Obniżenie pH treści pokarmowej sprzyja aktywności enzymów trawiennych i hamuje rozwój bakterii patogennych, co przekłada się na lepsze wykorzystanie paszy (Dittoe et al., 2018). Dodatkowo SCFA (zwłaszcza maślan) stanowią źródło energii dla enterocytów oraz stymulują regenerację nabłonka jelitowego, co wspiera procesy trawienia i wzrostu brojlerów (Bedford & Gong, 2018). Probiotyki mogą też zwiększać aktywność enzymów bakteryjnych rozkładających składniki paszy – Mountzouris i in. (2007) odnotowali wyższą aktywność enzymów glikozydaz bakteryjnych (np. β-galaktozydazy) oraz poprawę strawności składników w jelicie ślepym brojlerów suplementowanych mieszanką Lactobacillus

i Bifidobacterium. W efekcie zaobserwowano u tych kurcząt przyrosty i FCR porównywalne do grupy otrzymującej antybiotykowy stymulator wzrostu (awilamycynę).

Istotnym aspektem jest zależność efektu probiotycznego od dawki. Doniesienia literaturowe nie zawsze wskazują jednak na liniową zależność – istnieje optymalny poziom dodatku probiotyku, powyżej którego korzyści mogą się zatracać. Mountzouris i in. (2010), stosując trzy poziomy dawki mieszanki pięciu szczepów bakterii, odnotowali najlepsze przyrosty masy i FCR przy średniej dawce (10^8 jtk/kg paszy), podczas gdy dalsze zwiększenie dawki do 10^10 jtk/kg nie poprawiło, a wręcz pogorszyło te wskaźniki w porównaniu z optymalnym poziomem. Sugeruje to, że nadmiar bakterii probiotycznych może zaburzać homeostazę mikroflory lub zwiększać konkurencję o składniki odżywcze w świetle jelita, nie przekładając się na dalszą poprawę wzrostu. W większości badań umiarkowane dawki przynoszą najlepsze efekty produkcyjne, dlatego dobór odpowiedniej dawki (D1 vs D2) ma kluczowe znaczenie dla praktycznego zastosowania probiotyku.

Z punktu widzenia koncepcji One Health, poprawa wyników produkcyjnych uzyskana dzięki probiotykom jest szczególnie cenna w kontekście ograniczania stosowania antybiotyków w chowie zwierząt. Przez dziesięciolecia antybiotyki podawane w dawkach podterapeutycznych jako stymulatory wzrostu poprawiały przyrosty i FCR brojlerów, lecz odbywało się to kosztem selekcji opornych szczepów bakterii i obecności pozostałości leków w produktach drobiarskich (Garcia-Migura et al., 2014; Maron et al., 2013). Od 2006 roku obowiązuje w Unii Europejskiej zakaz stosowania antybiotykowych stymulatorów wzrostu u zwierząt produkcyjnych, co wymusiło poszukiwanie alternatywnych, bezpiecznych rozwiązań. Probiotyki stanowią jedno z kluczowych rozwiązań zastępujących antybiotyki – ich podawanie może zapewnić zbliżony efekt produkcyjny (lepsze tempo wzrostu, wykorzystanie paszy) bez negatywnych konsekwencji zdrowotnych i środowiskowych (Gadde et al., 2017). Jak wykazały przytoczone badania, odpowiednio dobrane szczepy bakterii mogą poprawić wydajność produkcyjną na poziomie porównywalnym z antybiotykami (Awad et al., 2009; Mountzouris et al., 2007). Tym samym ich stosowanie wpisuje się w ideę One Health – wspólną troskę o zdrowie zwierząt, ludzi i środowiska poprzez redukcję zużycia antybiotyków w łańcuchu żywnościowym. Warto podkreślić, że poprawa zdrowotności stada wskutek podawania probiotyków przekłada się także na niższą śmiertelność i mniejszą potrzebę interwencji farmakologicznych. W naszym eksperymencie śmiertelność brojlerów we wszystkich grupach była niska (rytm produkcyjny przebiegał bez poważniejszych upadków), lecz w warunkach

wyzwania patogennego probiotyki mogą znacząco ograniczać straty. Przykładowo, El-Sharkawy i wsp. (2020) zaobserwowali, że podanie mieszanki *Lactobacillus casei* i *Bifidobacterium breve* pisklętom przed zakażeniem *Salmonella typhimurium* nie tylko poprawiło przyrosty masy i FCR, ale też zmniejszyło kolonizację jelit przez salmonellę i ograniczyło śmiertelność w porównaniu z kurczętami bez ochrony probiotycznej. Zdolność probiotyków do zapobiegania infekcjom i wspierania wydajności produkcji nawet w obliczu patogenów podkreśla ich znaczenie jako profilaktycznej alternatywy dla antybiotyków (El-Sharkawy et al., 2020).

4.2. Morfometria jelit (VH, CD, VH:CD)

Analiza histomorfologiczna jelit wykazała korzystne zmiany u brojlerów otrzymujących probiotyki, najbardziej wyraźne w grupie D1**:** wydłużenie kosmków (VH)**,** spłycenie krypt (CD) i wzrost VH:CD (zwłaszcza w dwunastnicy i jelicie biodrowym). W D2 nie obserwowano dalszej poprawy, a miejscami efekt się spłaszczał – zgodnie z koncepcją optymalnej dawki znaną z literatury (Awad et al., 2009; Pelicano et al., 2005; Baurhoo et al., 2007). Zaobserwowano wydłużenie kosmków jelitowych (VH) oraz poprawę stosunku wysokości kosmków do głębokości krypt (VH:CD) w dwunastnicy i jelicie czczym w porównaniu z grupą kontrolną. Świadczy to o lepszym stanie morfologicznym błony śluzowej jelit i potencjalnie większej powierzchni chłonnej dla wchłaniania składników pokarmowych. Wyniki te są spójne z doniesieniami innych autorów. Awad i in. (2009) stwierdzili, że suplementacja diety brojlerów preparatem probiotycznym (mieszanka *Lactobacillus*) lub synbiotycznym skutkowała istotnym zwiększeniem wysokości kosmków oraz wartości wskaźnika VH:CD zarówno w dwunastnicy, jak i w jelicie krętym. Jednocześnie odnotowali zmniejszenie głębokości krypt jelita krętego, co sugeruje mniejsze zapotrzebowanie na intensywną regenerację nabłonka wskutek poprawy jego stanu. Podobnie Pelicano i wsp. (2005) wykazali, że dodatek probiotyku *Bacillus subtilis* do paszy spowodował zwiększenie wysokości kosmków w jelicie czczym i krętym kurcząt brojlerów, a mikroskopowo kosmki przybrały korzystną pofałdowaną strukturę zwiększającą powierzchnię chłonną nabłonka. Również Samli et al. (2007) zaobserwowali wydłużenie kosmków w jelicie krętym u brojlerów otrzymujących *E. faecium* wraz z paszą. Co ważne, lepsze parametry morfometryczne jelit często korelują z poprawą wyników produkcyjnych ptaków – w cytowanym badaniu Awada wzrost VH:CD szedł w parze z lepszym przyrostem masy ciała kurcząt. Można to wyjaśnić tym, że dłuższe kosmki dysponują większą ilością enterocytów

zdolnych do absorpcji składników odżywczych, zaś płytsze krypty oznaczają mniejszą utratę energii na ciągłą odbudowę nabłonka (mniej nasilona proliferacja kompensacyjna).

Mechanizmy, dzięki którym probiotyki wpływają na strukturę błony śluzowej jelit, są złożone i wieloczynnikowe. Jednym z nich jest produkcja krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych, zwłaszcza maślanu, który działa troficznie na nabłonek jelitowy – stymuluje różnicowanie się enterocytów i wydłużanie kosmków oraz może zmniejszać częstość podziałów komórkowych w kryptach poprzez regulację procesów apoptotycznych (Canani et al., 2011). Probiotyczne *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* fermentują włókno pokarmowe i wydzielają kwasy organiczne (mlekowy, octowy, masłowy), co obniża pH w świetle jelita. Niższe pH sprzyja uwalnianiu związków mineralnych i może modulować aktywność enzymów trawiennych, poprawiając w ten sposób odżywienie enterocytów. Ponadto, drobnoustroje probiotyczne konkurują z patogenami o receptory na powierzchni nabłonka i o składniki odżywcze (zjawisko konkurencyjnego wykluczania). Dzięki temu zmniejsza się kolonizacja jelit przez bakterie chorobotwórcze uszkadzające błonę śluzową i zaburzające strukturę kosmków. El-Sharkawy i wsp. (2020) wykazali np. że probiotyczne szczepy *L. casei* i *B. breve* zapobiegły zniszczeniu kosmków jelitowych przez *Salmonella* u zakażonych brojlerów poprzez zablokowanie adherencji patogenu do enterocytów i konkurencyjne wyparcie go ze środowiska jelita. Innym istotnym czynnikiem jest immunomodulacja wywołana przez probiotyki. Bakterie te potrafią modulować lokalny układ odpornościowy jelit – zwiększać wydzielanie ochronnej immunoglobuliny A na powierzchni błony śluzowej oraz indukować produkcję cytokin przeciwzapalnych (np. IL-10) przy jednoczesnym obniżeniu poziomu cytokin prozapalnych (jak TNF-α). Takie działanie wykazano m.in. dla niektórych szczepów *Lactobacillus*, które pobudzały układ GALT do wydajniejszej odpowiedzi nieswoistej, ograniczając stan zapalny w ścianie jelita (Kiczorowska et al., 2017). Zrównoważona odpowiedź immunologiczna zapobiega uszkodzeniu tkanki przez przewlekły stan zapalny i sprzyja utrzymaniu prawidłowej architektury kosmków. Konieczka i wsp. (2022) donoszą, że probiotyki przynależące do rodzaju *Bacillus* poprawiły integralność bariery jelitowej u brojlerów poddanych czynnikom stresowym, m.in. poprzez zwiększenie ekspresji białek ścisłych połączeń między komórkami nabłonka. Wskazuje to, że probiotyki nie tylko zmieniają wymiary kosmków i krypt, ale także jakościowo wzmacniają połączenia międzykomórkowe, czyniąc błonę śluzową bardziej odporną na uszkodzenia i translokację drobnoustrojów.

Należy zauważyć, że nie wszystkie badania raportują identyczne zmiany w kryptach jelitowych pod wpływem probiotyków – niekiedy obserwuje się nawet lekkie pogłębienie krypt przy jednoczesnym wydłużeniu kosmków. W naszym doświadczeniu głębokość krypt (CD) nie uległa istotnej zmianie albo nieznacznie wzrosła w grupach probiotycznych, co może wynikać z intensywniejszej proliferacji komórek macierzystych krypt kompensującej szybszy wzrost kosmków. Bogucka i in. (2019), badając wpływ probiotyku i synbiotyku na jelita brojlerów, odnotowali wydłużenie kosmków oraz zwiększenie ich powierzchni w jelicie cienkim, a jednocześnie nieco głębsze krypty u ptaków otrzymujących dodatki bioaktywne. Autorzy interpretują pogłębienie krypt jako zjawisko pozytywne – oznakę intensywniejszej odnowy i większego potencjału regeneracyjnego nabłonka, co w dłuższej perspektywie może wspierać ciągłość wyściółki jelitowej. Mimo tych rozbieżności, większość prac zgodnie potwierdza korzystny wpływ probiotyków na stosunek VH:CD, który uchodzi za jeden z lepszych wskaźników zdrowia jelit. Wyższy VH:CD implikuje przewagę procesów anabolicznych w błonie śluzowej (wydłużanie kosmków) nad katabolicznymi (utrata komórek, konieczność ich szybkiej regeneracji), co przekłada się na wydajniejsze wykorzystanie paszy przez gospodarza (Abd El-Hack et al., 2022). Podsumowując, probiotyki w dawkach D1 i D2 poprawiły strukturę mikroskopową jelit brojlerów, co tłumaczy obserwowaną równolegle lepszą produktywność tych kurcząt. Z punktu widzenia One Health, zdrowsza i prawidłowo ukształtowana błona śluzowa jelit u zwierząt hodowlanych oznacza mniejsze ryzyko przenikania drobnoustrojów chorobotwórczych do krwiobiegu i dalej do środowiska czy łańcucha pokarmowego człowieka. Wzmacnianie bariery jelitowej poprzez dodatki probiotyczne może więc pośrednio chronić przed rozprzestrzenianiem się zoonotycznych patogenów i redukować zapotrzebowanie na antybiotyki lecznicze, co stanowi kolejny element przewagi probiotyków w holistycznym ujęciu zdrowia ludzi i zwierząt.

4.3. Mikrobiom (alfa-różnorodność, skład taksonomiczny, korelacja z morfologią i produkcją)

Suplementacja *L. plantarum* ATM14 i *B. animalis* ATM30 wywarła istotny wpływ na mikrobiom jelitowy brojlerów. Zaobserwowano korzystne zmiany w składzie taksonomicznym – w jelitach kurcząt z grup probiotycznych wzrosła liczebność bakterii pożądanych, w tym zapewne rodzajów podawanych w preparacie (Lactobacillus, Bifidobacterium), przy jednoczesnym zmniejszeniu udziału potencjalnie patogennych lub niepożądanych mikroorganizmów (np. z rodziny *Enterobacteriaceae*). Ponadto probiotyki wpłynęły na

wskaźniki różnorodności mikrobiologicznej. Alfa-różnorodność (liczba gatunków i wyrównanie ich udziałów) była wyższa u ptaków otrzymujących dodatek bakterii, co świadczy o bogatszym i bardziej zrównoważonym ekosystemie jelitowym w porównaniu z kontrolą. Wyniki te są zgodne z trendami opisywanymi w literaturze. Mountzouris i in. (2007) wykazali, że podawanie brojlerom wieloszczepowego probiotyku (zawierającego m.in. *Lactobacillus, Bifidobacterium* i *Enterococcus*) znacząco zwiększyło liczebność bakterii fermentacji mlekowej (Lactobacillaceae), bifidobakterii oraz ogółem Gram-dodatnich ziarniaków w jelicie ślepym, w porównaniu z kurczętami kontrolnymi. Równocześnie odnotowano istotne obniżenie populacji bakterii z grupy koli i innych Gram-ujemnych (coliforms) u ptaków z dodatkiem kultur probiotycznych – podobne wyniki uzyskali Mountzouris et al. (2010) wskazując, że wyższe dawki probiotyku skutkowały silniejszą redukcją liczby pałeczek jelitowych (np. *E. coli*) oraz zwiększeniem koncentracji korzystnych bakterii kwasu mlekowego w jelicie cienkim brojlerów. W naszym badaniu przypuszczalnie również doszło do zjawiska konkurencyjnego wykluczania – bakterie probiotyczne zasiedlając nisze ekologiczne w przewodzie pokarmowym ograniczyły dostęp przestrzeni i składników pokarmowych dla drobnoustrojów patogennych. Dodatkowo produkując kwasy organiczne i bakteriocyny, hamowały wzrost konkurentów. Józefiak i wsp. (2012) opisali, że niektóre szczepy probiotyczne wytwarzają silne peptydy przeciwdrobnoustrojowe (bakteriocyny), które potrafią ograniczyć namnażanie *Clostridium perfringens* – groźnej bakterii wywołującej nekrozę jelit u drobiu. Ich zastosowanie w żywieniu brojlerów zmniejszyło wysiew *C. perfringens* i ochroniło struktury jelit przed uszkodzeniem, co w efekcie poprawiło zdrowotność i wyniki produkcyjne ptaków (Grilli et al., 2009; Józefiak et al., 2012). Nasze wyniki sugerują także korzystny wpływ badanych probiotyków na stabilność społeczności mikrobiologicznej, przejawiający się wyższą alfa-różnorodnością. Bogatszy mikrobiom zwykle oznacza większą odporność ekosystemu jelitowego na zakłócenia (np. stres, patogeny) i lepsze wykorzystanie potencjału fermentacyjnego paszy. Probiotyki mogą stymulować rozwój zróżnicowanej mikroflory poprzez tworzenie środowiska (pH, metabolity) sprzyjającego wielu symbiotycznym drobnoustrojom oraz poprzez dostarczanie enzymów rozkładających składniki trudno strawne, co udostępnia nisze pokarmowe kolejnym mikroorganizmom. W rezultacie w jelicie probiotykowanych kurcząt obserwuje się bardziej zbilansowany skład taksonomiczny, w którym dominują bakterie pożyteczne (Firmicutes, Actinobacteria) nad potencjalnie szkodliwymi Proteobacteriami (Oakley et al., 2014).

Zmiany mikrobiomu wywołane przez probiotyki mają bezpośrednie przełożenie na morfologię jelit oraz na parametry produkcyjne brojlerów, co potwierdzają zarówno nasze wyniki, jak i prace innych autorów. Zaobserwowaliśmy, że osobniki o wyższej liczebności *Lactobacillus/Bifidobacterium* w jelitach cechowały się lepszymi wartościami VH:CD oraz większą masą ciała końcową. Można to interpretować jako pozytywną korelację między zasiedleniem przewodu pokarmowego przez bakterie fermentacji mlekowej a stopniem rozwoju kosmków i efektywnością wzrostu. Samli i wsp. (2007) również odnotowali, że brojlery z dodatkiem *E. faecium* miały nie tylko dłuższe kosmki jelitowe, ale też znacznie większą liczebność bakterii kwasu mlekowego (LAB) w jelicie krętym – wzrost z 4,2 do 7,8 log jtk/g w porównaniu z kontrolą Wskazuje to, że rozrost populacji bakterii probiotycznych w jelicie sprzyja przebudowie nabłonka w kierunku zwiększenia powierzchni wchłaniania. Co więcej, ci sami autorzy wykazali poprawę przyrostów masy ciała i FCR w grupie z *E. faecium*, co koreluje ze wzrostem LAB i wydłużeniem kosmków. Z kolei Wang i Gu (2010) zaobserwowali, że suplementacja probiotyku u brojlerów zwiększyła aktywność enzymów trawiennych i liczebność *Lactobacillus* w jelicie, co przekładało się na lepsze wykorzystanie paszy. Te zależności potwierdzają holistyczny wpływ probiotyków: poprzez modulację mikrobioty jelitowej dochodzi do usprawnienia trawienia, poprawy struktury jelit i w konsekwencji lepszych wyników produkcyjnych gospodarza.

W kontekście One Health zmiany w mikrobiomie jelitowym brojlerów wywołane dodatkiem probiotyków mają wiele pozytywnych implikacji. Przede wszystkim, zwiększenie udziału korzystnych bakterii i ograniczenie patogenów w przewodzie pokarmowym drobiu przekłada się na mniejsze ryzyko skażenia produktów drobiarskich chorobotwórczymi drobnoustrojami. Na przykład redukcja kolonizacji *Salmonella* czy *Campylobacter* u kurcząt rzeźnych dzięki zastosowaniu probiotyków oznacza mniejsze zagrożenie zatruciami pokarmowymi u ludzi (El-Sharkawy et al., 2020). Korzystna mikrobiota jelitowa drobiu to także mniej szczepów antybiotykoopornych emitowanych do środowiska. Jak wykazały badania, nadużywanie antybiotyków w produkcji zwierzęcej prowadzi do rozprzestrzeniania się genów oporności na bakterie komensalne i patogenne, które mogą przenieść się na ludzi (Marshall & Levy, 2011; Van den Bogaard et al., 2002). Regularne stosowanie preparatów probiotycznych ogranicza to zjawisko u źródła – w jelitach brojlerów utrzymuje się mniejsza presja selekcyjna na rozwój szczepów lekoopornych. Co więcej, bogatsza i bardziej stabilna mikrobiota u ptaków przekłada się na lepszą odporność stada, co zmniejsza potrzebę interwencji leczniczych. Beirao i wsp. (2018) zaobserwowali, że kurczęta otrzymujące *E.*

faecium miały zmienioną kompozycję mikroflory i podwyższony poziom przeciwciał IgA, co zwiększało ich odporność na czynniki patogenne. Ostatecznie więc kształtowanie korzystnego mikrobiomu przez probiotyki sprzyja zarówno zdrowiu zwierząt, jak i bezpieczeństwu żywności oraz zdrowiu publicznemu. Jest to zgodne z podejściem One Health, podkreślającym wzajemne powiązania między mikrobiologicznym ekosystemem zwierząt hodowlanych a zdrowiem ludzi i ekosystemem środowiskowym. Wprowadzenie probiotyków do żywienia brojlerów można zatem postrzegać jako element strategii ograniczania antybiotyków i poprawy zdrowia na wszystkich poziomach – od mikrobiomu jelitowego po globalne problemy oporności i bezpieczeństwa żywności.

Rozdział 5. Podsumowanie i wnioski

5.1. Cel i zakres pracy

Zbadano wpływ dodatku probiotycznego zawierającego *Lactiplantibacillus plantarum (AMT 14)* i *Bifidobacterium animalis (AMT 30)*, podawanego z wodą przez 35 dni od odchowu, na wybrane wskaźniki zdrowotne oraz wyniki produkcyjne brojlerów Cobb. Użyto trzech grup: kontrolnej (K), standardowej dawki (D1: 0,006 g/ptaka/dzień) i podwójnej dawki (D2: 0,012 g/ptaka/dzień). Oceny obejmowały: (I) wyniki produkcyjne (masa ciała, FCR, zużycie paszy, śmiertelność), (II) morfometrię jelit (wysokość kosmków, głębokość krypt, stosunek VH:CD w dwunastnicy, jelicie czczym i biodrowym) oraz (III) mikrobiom (ze szczególnym naciskiem na *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*).

5.2. Najważniejsze obserwacje eksperymentalne

- Wyniki produkcyjne. W grupie D1 uzyskano najwyższą masę ciała w 35. dniu oraz najniższy FCR (korzystniejszy niż w K i D2). W grupie D2 poprawiono te parametry względem K, ale efektywność nie przewyższała grupy D1. Śmiertelność pozostawała niska i porównywalna między grupami.
- Morfometria jelit. W D1 odnotowano wydłużenie kosmków, spłycenie krypt oraz wzrost stosunku VH:CD w jelicie czczym i biodrowym; w D2 efekt był słabszy i miejscami neutralny.
- Mikrobiom. D1 sprzyjała wzrostowi udziału pożytecznych taksonów (Lactobacillus, Bifidobacterium) i umiarkowanemu wzrostowi różnorodności; w D2 nie obserwowano dalszej poprawy – pojawiła się raczej nieliniowa, „odwrócona U-kształtna" odpowiedź dawka – efekt.

5.3. Wnioski

1. Umiarkowana dawka probiotyku (D1) najskuteczniej wspiera funkcje jelit i przekłada się na realny zysk produkcyjny (wyższa masa, niższy FCR) – zgodnie z koncepcją „sweet spot" dla probiotyku.
2. Brak dodatkowej korzyści po podwojeniu dawki (D2) wskazuje na nieliniowość odpowiedzi oraz potrzebę precyzyjnego doboru poziomu podaży.

3. Poprawa morfometrii (wyższe VH, większy VH:CD) jest spójna z hipotezą lepszej wydajności absorpcyjnej jelit oraz ze zmianą składu mikrobiomu sprzyjającą kolonizacji przez bakterie fermentacji mlekowej. Zbieżne tendencje raportowali m.in. Awad i wsp. (2009), Mountzouris i wsp. (2007, 2010) oraz Pelicano i wsp. (2005).
4. Wyniki wpisują się w literaturę nt. modulacji mikrobiomu i poprawy integralności bariery jelitowej przez *Lactobacillus/Bifidobacterium* u brojlerów oraz wynikających z tego korzyści produkcyjnych.
5. Uzyskane efekty wspierają praktyki ograniczania stosowania antybiotyków i użycia zarejestrowanych szczepów o statusie bezpieczeństwa (QPS) w żywieniu drobiu.

Piśmiennictwo

1. Anderson, M. J. (2001). A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. Austral Ecology, 26(1), 32–46. https://doi.org/10.1111/j.1442-9993.2001.01070.pp.x
2. Anderson, M. J. (2006). Distance-based tests for homogeneity of multivariate dispersions. Biometrics, 62(1), 245–253. https://doi.org/10.1111/j.1541-0420.2005.00440.x
3. Ayalew, H., et al. (2023). Biophysiology of in ovo administered bioactive substances. Frontiers in Veterinary Science, 10, 1160804.
4. Aviagen. (2022). Ross 308 Performance Objectives.
5. Bedford, A., & Gong, J. (2018). Implications of butyrate and its derivatives for gut health and animal production. *Animal Nutrition,* *4*(2), 151–159. https://doi.org/10.1016/j.aninu.2017.08.010
6. Awad, W. A., Ghareeb, K., Abdel-Raheem, S., & Böhm, J. (2009). Effects of dietary inclusion of probiotic and synbiotic on growth performance, organ weights, and intestinal histomorphology of broiler chickens. Poultry Science, 88(1), 49–56. https://doi.org/10.3382/ps.2008-00244
7. Azzahra, R.N. et al. (2025). Plantaricin: production, applications and prospects. Journal of Food Processing and Preservation.
8. Bedford, M. R. (2022). The role of feed enzymes in maintaining poultry intestinal health. Journal of the Science of Food and Agriculture, 102(1), 8–14.
9. Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., et al. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. Nature Biotechnology, 37(8), 852–857. https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9
10. Bray, J. R., & Curtis, J. T. (1957). An ordination of the upland forest communities of southern Wisconsin. Ecological Monographs, 27(4), 325–349. https://doi.org/10.2307/1942268
11. Butorac, K., et al. (2023). Modulation of microbiota by Lactiplantibacillus plantarum D13. Microorganisms, 11, 245.
12. Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., et al. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from amplicon data. Nature Methods, 13(7), 581–583. https://doi.org/10.1038/nmeth.3869
13. Callahan, B. J., McMurdie, P. J., & Holmes, S. P. (2017). Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. The ISME Journal, 11, 2639–2643. https://doi.org/10.1038/ismej.2017.119

14. Cao, G. T., Zeng, X. F., Chen, A. G., Zhou, L., Zhang, L., Xiao, Y. P., & Yang, C. M. (2013). Effects of a probiotic, *Enterococcus faecium*, on growth performance, intestinal morphology, immune response and cecal microflora in broilers challenged with *Escherichia coli* K88. *Poultry Science, 92*(11), 2949–2955. https://doi.org/10.3382/ps.2013-03366
15. Castanon, J. I. R. (2007). History of the use of antibiotic growth promoters in European poultry feeds. Poultry Science, 86(11), 2466–2471. https://doi.org/10.3382/ps.2007-00249
16. Chao, A. (1984). Non-parametric estimation of the number of classes in a population. Scandinavian Journal of Statistics, 11(4), 265–270. https://doi.org/10.2307/4615964
17. Chen, P., Huang, L., Luo, Y., et al. (2023). Lactiplantibacillus plantarum HW1 alleviates intestinal inflammation in broilers. Animals, 13(21), 3810.
18. Deng, W., Dittoe, D. K., Pavilonis, B., et al. (2020). Interventions to reduce Campylobacter colonization in poultry: A review. Frontiers in Microbiology, 11, 595.
19. Ducatelle, R., Goossens, E., De Meyer, F., & Van Immerseel, F. (2023). Poultry gut health and beyond. Current Opinion in Biotechnology, 79, 102874. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2023.102874
20. EFSA (European Food Safety Authority). (2024). Statement on the requirements for whole-genome sequencing of micro-organisms to be used in the food chain. EFSA Journal, 22(8), e08912. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2024.8912
21. EFSA BIOHAZ Panel. (2020). Scientific Opinion on the update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed. *EFSA Journal, 18*(2), 5966. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.5966
22. EFSA BIOHAZ Panel. (2023). Update of the list of QPS-recommended biological agents. EFSA Journal, 21(1), e07747. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2023.7747
23. EFSA BIOHAZ Panel. (2025). QPS list update. EFSA Journal, 23, e09510. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2025.9510
24. EFSA FEEDAP Panel. (2018). Guidance on the characterisation of microorganisms used as feed additives. EFSA Journal, 16(3), e05206. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5206
25. El-Sharkawy, H., Tahoun, A., Rizk, A. M., Suzuki, T., Elmonir, W., Nassef, E., Shukry, M., Germoush, M. O., Farrag, F., Bin-Jumah, M., & Mahmoud, A. M. (2020). Evaluation of *Bifidobacteria* and *Lactobacillus* probiotics as alternative therapy for *Salmonella typhimurium* infection in broiler chickens. *Animals, 10*(6), 1023. https://doi.org/10.3390/ani10061023
26. EMA/ESVAC. (2023). Sales of veterinary antimicrobial agents in 31 European countries in 2022 (13th ESVAC report). European Medicines Agency.

27. Estaki, M., Jiang, L., Bokulich, N. A., et al. (2020). QIIME 2 enables comprehensive end-to-end analysis of diverse microbiome data. Current Protocols in Bioinformatics, 70(1), e100. https://doi.org/10.1002/cpbi.100
28. European Commission. (2005). Ban on antibiotics as growth promoters in animal feed enters into effect.
29. European Commission. (2020). A Farm to Fork Strategy for a fair, healthy and environmentally-friendly food system.
30. European Commission. (2024). Poultry meat production statistics (Eurostat).
31. FEFAC. (2024). Annual Report 2024.
32. Fesseha, H., Ali, G., Alemu, A., et al. (2021). Probiotics improve intestinal morphology and productivity in broilers. Veterinary Medicine and Science, 7(4), 1251–1260.
33. Feye, K. M., Baxter, M. F. A., Tellez, G., & Hargis, B. M. (2020). Influential factors on the composition of the broiler microbiome. Poultry Science, 99(12), 6536–6553.
34. Gaggia, F., Mattarelli, P., & Biavati, B. (2010). Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *International Journal of Food Microbiology, 141*(Suppl. 1), S15–S28. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.02.031
35. Gao, M., et al. (2024). In ovo probiotics: Effects on hatchability and chick quality. Poultry Science, 103(6), 102293.
36. Grilli, E., Messina, M. R., Catelli, E., Morlacchini, M., & Piva, A. (2009). Pediocin A improves growth performance of broilers challenged with *Clostridium perfringens*. *Poultry Science, 88*(10), 2152–2158. https://doi.org/10.3382/ps.2009-00160
37. Gwinn, D. C., Allen, M. S., Bonvechio, K. I., Hoyer, M. V., & Beesley, L. S. (2016). Evaluating estimators of species richness: The importance of considering statistical error rates. *Methods in Ecology and Evolution, 7*(3), 294–302. https://doi.org/10.1111/2041-210X.12462
38. Hashemitabar, S. H., & Hosseinian, S. A. (2024). The comparative effects of probiotics on growth, antioxidant indices and intestinal histomorphology of broilers under heat stress condition. *Scientific Reports, 14*, 23471. https://doi.org/10.1038/s41598-024-59753-3
39. Havenstein, G. B., Ferket, P. R., & Qureshi, M. A. (1994). Growth, feed efficiency, and livability of 1957 vs 1991 broilers. Poultry Science, 73(12), 1785–1794. https://doi.org/10.3382/ps.0731785
40. Havenstein, G. B., Ferket, P. R., & Qureshi, M. A. (2003). Growth, livability, and feed conversion of 1957 vs 2001 broilers. Poultry Science, 82(10), 1500–1508. https://doi.org/10.1093/ps/82.10.1500

41. Heczko, P. B. (2023). Taksonomia bakterii fermentacji mlekowej – aktualizacja nomenklatury. Medycyna Weterynaryjna, 79(7), 395–402.
42. Hernández-Granados, M. J., Vázquez-Flores, A. A., & Vicente, J. L. (2021). Encapsulated Bifidobacterium animalis with agave fructans in broilers. Frontiers in Veterinary Science, 8, 798464. https://doi.org/10.3389/fvets.2021.798464
43. Hill, C., Guarner, F., Reid, G., et al. (2014). The ISAPP consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology, 11(8), 506–514. https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66
44. Jha, R., Das, R., Oak, S., & Mishra, P. (2020). Probiotics (direct-fed microbials) in poultry nutrition and their effects on nutrient utilization, growth and laying performance, and gut health: A systematic review. *Animals, 10*(10), 1863. https://doi.org/10.3390/ani10101863
45. Jiang, H., Liu, Z., Wang, X., et al. (2024). Heat stress, intestinal permeability and morphology in broilers. Poultry Science, 103(5), 103037.
46. Józefiak, D., Sip, A., Rutkowski, A., Rawski, M., Kaczmarek, S., Wołuń-Cholewa, M., & Czarnecki, R. (2012). Lyophilized *Carnobacterium divergens* AS7 bacteriocin preparation improves performance of broiler chickens challenged with *Clostridium perfringens*. *Poultry Science, 91*(8), 1899–1907. https://doi.org/10.3382/ps.2012-02151
47. Kelly, B. J., Gross, R., Bittinger, K., et al. (2015). Power and sample-size estimation for microbiome studies using PERMANOVA. Bioinformatics, 31(15), 2461–2468. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv183
48. Kogut, M. H. (2016). The concept of gut health: A new paradigm for food-animal production. Frontiers in Veterinary Science, 3, 71. https://doi.org/10.3389/fvets.2016.00071
49. Leão, J. A., et al. (2021). Hatchery spray application of probiotics improves broiler performance. Poultry Science, 100(6), 101136. https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101136
50. Lei, X., Piao, X., Ru, Y., Zhang, H., Péron, A., & Zhang, H. (2015). Methodology for intestinal morphology assessment in broilers. Animal Bioscience, 28(6), 935–941.
51. Li, Z., Guo, X., Zhang, H., et al. (2023). Protective effects of microencapsulation on probiotic viability during feed pelleting. Animal Feed Science and Technology, 295, 115515. https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2023.115515
52. Lin, H., & Peddada, S. D. (2020). ANCOM-BC: Analysis of compositions of microbiomes with bias correction. Nature Communications, 11, 3514. https://doi.org/10.1038/s41467-020-17041-7
53. Liu, J., Zhang, L., Ren, Y., et al. (2021). FITC-dextran as a marker for intestinal permeability in poultry. Poultry Science, 100(4), 100485.

54. Liu, L., Wang, H., Zhang, C., et al. (2021). Short-chain fatty acids and tight junctions. International Journal of Molecular Sciences, 22(19), 10392.
55. Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). DESeq2. Genome Biology, 15, 550. https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8
56. Lozupone, C., & Knight, R. (2005). UniFrac: A new phylogenetic method for comparing microbial communities. Applied and Environmental Microbiology, 71(12), 8228–8235. https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.8228-8235.2005
57. Lozupone, C. A., Hamady, M., Kelley, S. T., & Knight, R. (2007). Quantitative and qualitative β-diversity measures lead to different insights. Applied and Environmental Microbiology, 73(5), 1576–1585. https://doi.org/10.1128/AEM.01996-06
58. Madej, J.P. et al. (2025). In ovo administration of probiotics and early feeding – mixed effects on Campylobacter jejuni colonization. Microorganisms, 13(6), 1219.
59. Malmo, C., et al. (2021). Microencapsulation improves L. plantarum survival. Foods, 10(10), 217.
60. Mallo, J. J., et al. (2021). Protected sodium butyrate and gut function in broilers. Animals, 11(10), 3084.
61. Markowiak, P., & Śliżewska, K. (2018). The role of probiotics, prebiotics and synbiotics in animal nutrition. *Gut Pathogens, 10*, 21. https://doi.org/10.1186/s13099-018-0250-0
62. Marshall, B. M., & Levy, S. B. (2011). Food animals and antimicrobials: Impacts on human health. *Clinical Microbiology Reviews, 24*(4), 718–733. https://doi.org/10.1128/CMR.00002-11
63. Mátis, G., Neogrády, Z., Csikó, G., et al. (2022). Butyrate and tight junctions in chickens. Animals, 12(15), 2069.
64. McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2014). Waste not, want not: Why rarefying microbiome data is inadmissible. PLoS Computational Biology, 10(4), e1003531. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003531
65. Melaku, S., et al. (2021). Short-chain fatty acids improve gut barrier function in heat-stressed broilers. International Journal of Molecular Sciences, 22(5), 2537.
66. Micciche, A. C., Foley, S. L., Pavlidis, H. O., & Ricke, S. C. (2018). A review of prebiotics against *Salmonella* in poultry: Current and future potential for microbiome research applications. *Frontiers in Veterinary Science, 5*, 191. https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00191
67. Mirzayi, C., Renson, A., Genomic Standards Consortium, et al. (2021). Reporting guidelines for human microbiome research (STORMS). Nature Medicine, 27, 1885–1887. https://doi.org/10.1038/s41591-021-01552-x

68. Mountzouris, K. C., Tsirtsikos, P., Kalamara, E., et al. (2007). Evaluation of a multi-species probiotic in broilers. Poultry Science, 86(2), 309–317.
69. Mountzouris, K. C., Tsitrsikos, P., Palamidi, I., Arvaniti, A., Mohnl, M., Schatzmayr, G., & Fegeros, K. (2010). Effects of probiotic inclusion levels in broiler nutrition on growth performance, nutrient digestibility, plasma immunoglobulins, and cecal microflora composition. *Poultry Science, 89*(1), 58–67. https://doi.org/10.3382/ps.2009-00308
70. Muscariello, L., et al. (2020). Surface proteins of lactobacilli: Adhesion and host interactions. International Journal of Molecular Sciences, 21(18), 7073.
71. Naeem, M., et al. (2024). Probiotics as alternatives to antibiotics in poultry. Microorganisms, 12(1), 84.
72. Naeem, M., et al. (2025). Probiotics in poultry with a focus on Salmonella control. Microorganisms, 13(2), 315.
73. Ncho, C. M., et al. (2025). Heat stress and the chicken gastrointestinal microbiota. Journal of Animal Science and Biotechnology, 16, 73.
74. Neeteson, A. M., et al. (2023). Balanced breeding in broilers. Poultry Science, 102(7), 102723.
75. OECD–FAO. (2024). Agricultural Outlook 2024–2033.
76. Oakley, B. B., Lillehoj, H. S., Kogut, M. H., Kim, W. K., Maurer, J. J., Pedroso, A., Lee, M. D., Collett, S. R., Johnson, T. J., & Cox, N. A. (2014). The chicken gastrointestinal microbiome. *FEMS Microbiology Letters, 360*(2), 100–112. https://doi.org/10.1111/1574-6968.12608
77. Ouwehand, A. C., Salminen, S., & Isolauri, E. (2002). Probiotics: Mechanisms and in vivo effects. Antonie van Leeuwenhoek, 82(1–4), 279–289. https://doi.org/10.1023/A:1020620607611
78. Patterson, J. A., & Burkholder, K. M. (2003). Application of prebiotics and probiotics in poultry production. Poultry Science, 82(4), 627–631. https://doi.org/10.1093/ps/82.4.627
79. Pelicano, E. R. L., Souza, P. A., Souza, H. B. A., Figueiredo, D. F., Boiago, M. M., Carvalho, S. R., & Bordon, V. F. (2005). Intestinal mucosa development in broiler chickens fed natural growth promoters. *Brazilian Journal of Poultry Science, 7*(4), 221–229. https://doi.org/10.1590/S1516-635X2005000400005
80. Prakatur, I., Miskulin, M., Pavic, M., et al. (2019). Intestinal morphology in broilers supplemented with propolis and bee pollen. Animals, 9(6), 301. https://doi.org/10.3390/ani9060301
81. Rehman, H., Vahjen, W., Awad, W. A., & Zentek, J. (2020). Effects of heat stress on poultry gut health. Journal of Thermal Biology, 94, 102–119.

82. Ren, Y., Chen, J., Wang, Y., et al. (2023). Butyrate enhances tight junctions via AMPK signaling in broiler intestine. Poultry Science, 102(2), 102366.
83. Ricotta, C., & Podani, J. (2017). On some properties of the Bray–Curtis dissimilarity. Ecological Complexity, 31, 201–205. https://doi.org/10.1016/j.ecocom.2017.07.003
84. Rocchetti, M. T., Bonomi, F., & Marcone, M. F. (2021). Antimicrobial activity of Lactiplantibacillus plantarum metabolites. International Journal of Molecular Sciences, 22(22), 12076.
85. Rysman, K., et al. (2023). Broiler performance, gut morphology and intestinal inflammation under field conditions. Avian Pathology, 52(4), 232–241. https://doi.org/10.1080/03079457.2023.2201169
86. Saeed, M. et al. (2025). Lactiplantibacillus plantarum as poultry probiotic – a comprehensive review. Microorganisms, 13(2), 330.
87. Saleem, W., et al. (2023). ImageJ protocols for villus height/crypt depth measurements. Veterinary Research, 54, 99.
88. Shannon, C. E. (1948). A mathematical theory of communication. Bell System Technical Journal, 27, 379–423. https://doi.org/10.1002/j.1538-7305.1948.tb01338.x
89. Shanmugasundaram, R., Mortada, M., Cosby, D. E., et al. (2019). Synbiotic supplementation to decrease Salmonella colonization… PLOS ONE, 14(10), e0223577. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223577
90. Shehata, A. A., Yalçın, S., Latorre, J. D., et al. (2022). Probiotics, prebiotics and phytogenics to optimize poultry gut health. Microorganisms, 10(2), 395.
91. Simpson, E. H. (1949). Measurement of diversity. Nature, 163(4148), 688. https://doi.org/10.1038/163688a0
92. Singh, A. K., Tiwari, U. P., Berrocoso, J. D., & Jha, R. (2021). Dietary fiber and intestinal health in poultry. Frontiers in Veterinary Science, 8, 665372.
93. Singh, K. S., et al. (2018). Mucus-binding protein of L. plantarum contributes to pathogen exclusion. Scientific Reports, 8, 14198.
94. Smiałek, M., Binek, M., & Dolka, B. (2018). Probiotics reduce Campylobacter and Salmonella contamination in poultry meat. Medycyna Weterynaryjna, 74(11), 716–720.
95. Sun, W., et al. (2023). Microencapsulation of L. plantarum 299v for pelleting stability. Microorganisms, 11(5), 947.
96. Tabler, T., et al. (2020). Heat stress and intestinal integrity (VH, tight junctions, FITC-d). Frontiers in Veterinary Science, 7, 249.

97. Tallentire, C. W., Leinonen, I., & Kyriazakis, L. (2016). Breeding for efficiency in the broiler chicken. Agronomy for Sustainable Development, 36, 66.
98. Teirlynck, E., De Gussem, M., Dewulf, J., Haesebrouck, F., Ducatelle, R., & Van Immerseel, F. (2011). Morphometric evaluation of dysbacteriosis in broilers. Avian Pathology, 40(2), 139–144. https://doi.org/10.1080/03079457.2010.543414
99. Uni, Z. (1999). Post-hatch development of small intestine function in chicks. Poultry Science, 78(2), 215–222. https://doi.org/10.1093/ps/78.2.215
100. Uni, Z. (2000). Small intestinal development post-hatch (PCNA/BrdU). British Poultry Science, 41(5), 544–551.
101. USDA FAS. (2024). EU Poultry and Products Annual 2024.
102. Valečková, R., Botek, P., Jakubcová, K., et al. (2023). Lactiplantibacillus plantarum reduces Campylobacter jejuni in broilers. Frontiers in Microbiology, 14, 1205797. https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1205797
103. Vicuña, E. A., Kuttappan, V. A., Galarza-Seeber, R., et al. (2015). Dose titration of FITC-dextran in broiler chicks. Poultry Science, 94(6), 1353–1359. https://doi.org/10.3382/ps/pev111
104. Vimon, S., et al. (2023). Microencapsulation of L. plantarum MB001 improves viability. Animals, 13(12), 1973.
105. von Ossowski, I., et al. (2010). Sortase-assembled pili in L. rhamnosus GG enhance mucosal adherence. Microbial Biotechnology, 3(4), 407–417.
106. Wang, G., et al. (2018). Surface proteins of L. plantarum and adhesion. Frontiers in Microbiology, 9, 2858. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02858
107. Wang, G., et al. (2020). Multi-strain probiotics improve broiler performance. Journal of Applied Poultry Research, 29(2), 362–378.
108. Wang, Y., & Gu, Q. (2010). Effect of probiotic on growth performance and digestive enzyme activity of Arbor Acres broilers. *Research in Veterinary Science, 89*(2), 163–167. https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.03.009
109. WHO/FAO/WOAH/UNEP. (2022–2026). Global Action Plan on Antimicrobial Resistance – One Health framework.
110. Xiao, X., et al. (2024). L. plantarum improves performance and modulates cytokines in broilers. Poultry Science, 103(7), 102360.
111. Yadav, S., & Jha, R. (2019). Strategies to modulate the intestinal microbiota and their effects on nutrient utilization, performance and health of poultry. *Journal of Animal Science and Biotechnology, 10*, 2. https://doi.org/10.1186/s40104-018-0310-9

112. Yang, C., et al. (2024). L. plantarum HJLP1: Immunity and antioxidant status. Animals, 14, 2020.

113. Yaqoob, M. U., et al. (2022). Probiotics to improve growth, gut health and immunity in broilers: Meta-analysis. Journal of Applied Poultry Research, 31(4),100258.

114. Yin, Y. et al. (2024). *Probiotics and functional feed additives in broiler nutrition: optimizing gut health.* Microorganisms, 12(3), 577.

115. Yosi, F., et al. (2023). Meta-analysis of probiotics' effects on gut barrier, morphology and gene expression. Animals, 13(13), 1970.

116. Zampiga, M., Laghi, L., Petracci, M., et al. (2021). Environmental impacts of poultry production and nutrition strategies. Italian Journal of Animal Science, 20(1), 1160–1173.

117. Zduńczyk, Z., Jankowski, J., Kaczmarek, S., & Juśkiewicz, J. (2015). Post-ileal fermentation and microbiota modulation in broilers and turkeys. World's Poultry Science Journal, 71(1), 37–51.

118. Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., et al. (2020). A taxonomic note on the genus Lactobacillus. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 70(4), 2782–2858. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107

119. Zuidhof, M. J., Schneider, B. L., Carney, V. L., et al. (2014). Growth, efficiency and yield of commercial broilers (1957, 1978, 2005). Poultry Science, 93(12), 2970–2982.

Spis tabel

Tabela 1. Skład surowcowy mieszanek paszowych (%) dla kurcząt brojlerów.

Tabela 2. Skład chemiczny i poziom składników odżywczych (na kg paszy).

Tabela 3. Zalecane warunki termiczne dla kurcząt brojlerów linii COBB 500.

Tabela 4. Parametry powietrza wymagane dla kurcząt brojlerów COBB 500.

Tabela 5**.** Wyniki produkcyjne brojlerów.

Tabela 6**.** Ogólna charakterystyka analizowanych próbek, obejmująca identyfikator próbki, lokalizację jelitową (jelito ślepe lub czcze), wariant doświadczenia (kontrola, pojedyncza dawka, podwójna dawka) oraz liczbę sekwencji przypisanych do domeny *Bacteria.*

Spis rycin

Ryc. 1. Parametry morfometrii jelit: wysokość kosmków (VH), głębokość krypt (CD) i stosunek VH:CD. (A–C) dwunastnica.

Ryc. 2. Parametry morfometrii jelit: wysokość kosmków (VH), głębokość krypt (CD) i stosunek VH:CD. (A–C) jelito czcze.

Ryc. 3. Parametry morfometrii jelit: wysokość kosmków (VH), głębokość krypt (CD) i stosunek VH:CD. (A–C) jelito biodrowe.

Ryc. 4. Wykresy skrzypcowe logarytmicznie przekształconych sum liczebności ASV (log(suma+1)) w jelicie czczym (j) i jelicie ślepym (c) brojlera kurzego w grupach: kontrolnej (x0), w dawce pojedynczej (x1) i w dawce podwójnej (x2).

Ryc. 5. Analiza głównych składowych (PCA) składu mikrobiomu w jelicie czczym (A) i jelicie ślepym (B) kurcząt.

Ryc. 6**.** Profil taksonomiczny mikrobioty (poziom rodzaju) w jelicie ślepym (A) i jelicie czczym (B) brojlerów z grup: kontrolnej K (*x0*), probiotyk – dawka standardowa D1 (*x1*) oraz dawka podwojona D2 (*x2*).

Ryc. 7. Alfa-różnorodność mikrobioty jelitowej brojlerów po suplementacji probiotyku. (A–C) jelito czcze (jejunum)**,** (D–F**)** jelito ślepe (cecum)**.** A, D – bogactwo taksonomiczne (*Observed ASVs*); B, E **–** indeks Shannona**;** C, F **–** indeks Simpsona**.**

Ryc. 8. Udział procentowy dominujących taksonów bakteryjnych w jelicie ślepym (A–C) i czczym (D–F) kur w zależności od zastosowanego wariantu suplementacji.