



UNIWERSYTET TECHNOLOGICZNO-PRZYRODNICZY  
im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich w Bydgoszczy

**RADA NAUKOWA DYSCYPLINY  
ZOOTECHNIKA I RYBACTWO**

## **ROZPRAWA DOKTORSKA**

w formie zbioru opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów  
naukowych w dyscyplinie zootechnika i rybactwo

**mgr inż. Kamil Stęczny**

**WPŁYW PREPARATÓW PROBIOTYCZNYCH (EM)  
NA WYNIKI PRODUKCYJNE, WYBRANE CECHY  
ANATOMICZNE, SKŁAD TUSZKI I JAKOŚĆ MIĘSA  
KURCZĄT BROJLERÓW ROSS 308**

*Effect of probiotic preparations (EM) on productive  
performance, selected anatomical features, carcass  
composition and meat quality of Ross 308 broiler chickens*

**DZIEDZINA: nauki rolnicze  
DYSCYPLINA: zootechnika i rybactwo**

**PROMOTOR**

DR HAB. INŻ. DARIUSZ KOKOSZYŃSKI  
KATEDRA HODOWLI ZWIERZĄT  
WYDZIAŁ HODOWLI I BIOLOGII ZWIERZĄT  
UNIWERSYTET TECHNOLOGICZNO-PRZYRODNICZY IM. J. J. ŚNIADECKICH W BYDGOSZCZY

**BYDGOSZCZ  
2020**



*Panu*

*dr. hab. inż. Dariuszowi Kokoszyńskiemu, prof. uczelni  
za okazaną pomoc w trakcie realizacji prac badawczych  
cenne uwagi, oraz życzliwość i wyrozumiałość  
w trakcie pisania niniejszej rozprawy doktorskiej  
dziękuję.*



## SPIS TREŚCI

1. Wstęp .....	7
2. Wykaz artykułów naukowych stanowiących cykl publikacji rozprawy doktorskiej .....	12
3. Uzasadnienie spójności tematycznej cyklu publikacji rozprawy .....	13
3.1. Hipoteza badawcza, cel i zakres badań .....	13
3.1.1. Hipoteza badawcza .....	13
3.1.2. Cel i zakres badań .....	13
3.2. Materiał i metody badań .....	14
3.3. Wyniki .....	21
3.3.1. Wyniki produkcyjne .....	21
3.3.2. Wartość rzeźna .....	21
3.3.3. Skażenie mikrobiologiczne fermy .....	21
3.3.4. Jakość mięsa .....	22
3.3.5. Cechy anatomiczne .....	24
3.3.6. Mikroflora jelit ślepych .....	25
3.4. Dyskusja .....	26
3.5. Podsumowanie wyników i wnioski .....	29
3.6. Literatura .....	30
4. Streszczenie .....	37
5. Abstract .....	40
6. Załączniki .....	43
6.1. Kopie artykułów naukowych stanowiących cykl publikacji rozprawy doktorskiej ...	44
6.2. Oświadczenie Autora rozprawy doktorskiej .....	73
6.3. Oświadczenie Współautora artykułów naukowych .....	74



## 1. WSTĘP

Mięso drobiowe jest chętnie i często spożywane ze względu na walory odżywcze i dietetyczne. Produkcja kurcząt rzeźnych z uwagi na ich szybkie tempo wzrostu jest konkurencyjna co powoduje stały wzrost tej gałęzi rolnictwa. Mięso drobiowe cieszy się dużym uznaniem wśród konsumentów [Zduńczyk, 2014]. Producenci kurcząt rzeźnych kładą duży nacisk na uzyskanie dużej masy ciała ptaków w stosunkowo jak najkrótszym czasie. Z tego powodu przez zbyt intensywną produkcję drobiu może pogarszać się jakość ich mięsa [Elminowska -Wenda, 2007]. Skrócenie okresu odchowu kurcząt rzeźnych wpływa również na walory smakowe i skład chemiczny mięsa [Pietrzak i in., 2013]. Aktualnie Polska jest liderem w produkcji mięsa drobiowego w Unii Europejskiej. W 2017 roku produkcja mięsa drobiowego w naszym kraju kształtowała się na poziomie 3,5 mln ton. Spożycie mięsa drobiowego w Polsce w 2017 roku zgodnie z szacunkami Instytutu Ekonomiki Rolnictwa i Gospodarki Żywnościowej (IERiGŻ) wynosiło 29 kg/osobę/rok, a więc nieco więcej niż wynosi średnia dla krajów UE.

Ważnym czynnikiem wpływającym na zdrowotność i wydajność zwierząt jest ich odpowiednie żywienie oraz działania profilaktyczne. Po wycofaniu antybiotykowych stymulatorów wzrostu zaczęto stosować substancje bioaktywne i zioła mogące przyczynić się do podwyższenia przeżywalności i zwiększenia możliwości produkcyjnych zwierząt.

W systemie intensywnej produkcji drobiarskiej wykorzystuje się kurczęta rzeźne odznaczające się szybkim tempem wzrostu, dobrym wykorzystaniem paszy i prawidłową budową ciała z dobrze wykształconymi mięśniami piersiowymi i z dobrym umięśnieniem nóg. Podczas odchowu trwającego 6 tygodni kurczęta rzeźne około 60-krotnie powiększają swoją masę ciała. Wymaga to wykorzystania ptaków o odpowiednich założeniach genetycznych, stosowania mieszanek paszowych zapewniających odpowiedni wzrost ptaków [Larbier i Leclereq, 1995; Majewska, 2006; Mazanowski, 2011a, b; Świerczewska, 1994; Świerczewska i in., 1999]. W kraju dysponujemy zwykle czterorodowymi mieszancami kurcząt brojlerów pochodzącymi ze znanych światowych firm hodowlanych. Wyróżnić możemy takie zestawy towarowe jak: Ross 308, Ross 508, Ross 708, Ross PM3 (USA, Holandia), Cobb (Niemcy) oraz Hubbard Flex, Hubbard F-15 i Hubbard JA-57 (Francja). Zestawy rodzicielskie kur mięsnych Ross 308, Hubbard Flex, Hubbard F-15 pochodzą z trzech ferm prarodzicielskich kur mięsnych znajdujących się w Polsce [Wencek i in., 2017].

Na efektywność odchowu kurcząt brojlerów wpływ ma wiele czynników a w szczególności genotyp, jakość wstawianych piskląt, żywienie, stosowana profilaktyka i warunki środowiskowe takie jak oświetlenie, wentylacja, temperatura czy obsada ptaków [Bernacki i Wojciechowski, 2002; Mazanowski, 2011 a, b]. W celu uzyskania dobrych wyników produkcyjnych odchów kurcząt brojlerów odbywa się wyłącznie w zamkniętych pomieszczeniach by zapewnić ptakom odpowiednie warunki środowiskowe. Aby wykorzystać potencjał produkcyjny ptaków optymalizuje się systemy żywienia dostosowując je do ich wieku i fizjologii. Mieszanki paszowe powinny być łatwostrawne i wysokoenergetyczne co wiąże się z budową układu pokarmowego ptaków i ich szybkim tempem wzrostu. W każdej fazie odchowu kurcząt brojlerów stosuje się mieszanki paszowe o różnej zawartości składników odżywczych i energii tak by w pełni zaspokoić zmieniające się z wiekiem zapotrzebowanie ptaków [Bączkowska i Ślusarz, 1987; Jamroz i Potkański, 2006; Mazanowski, 2011a].

Ważnym elementem w produkcji drobiarskiej są programy profilaktyczne mające na celu niedopuszczenie do zachorowań. W dużych stadach ze względu na większe potencjalne zagrożenie występowania chorób stosuje się różnego rodzaju szczepienia. Kurczęta szczepione są m.in. przeciwko chorobie Mareka, zakażeniom reowirusowym czy zapaleniu oskrzeli [Mazanowski, 2011 a,b].

Oprócz stosowania szczepień dobrym działaniem profilaktycznym może okazać się stosowanie substancji probiotycznych jako wielofunkcyjnych dodatków paszowych, które wpływają korzystnie na stan i poziom odporności organizmów, ich przeżywalność oraz możliwości produkcyjne zwierząt [Ezema i Chukwuemeka, 2012; Kalsum i in., 2012; Lipiński i in., 2011; Lopezi in., 2012; Šabatková i in., 2008]. Wyselekcjonowane kultury drobnoustrojów probiotycznych trwale lub częściowo kolonizują przewód pokarmowy uniemożliwiając nadmierny rozwój patogennych mikroorganizmów co przyczynia się do zwiększonej zdrowotności zwierząt.

Zakaz stosowania antybiotyków w żywieniu drobiu w krajach UE był podyktowany głównie nadmiernym uodpornieniem się bakterii patogennych na te związki. Z epidemiologicznego punktu widzenia nie można było dopuścić do powstawania kolejnych szczepów odpornych na antybiotyki. Zakaz stosowania w Unii Europejskiej antybiotyków stymulatorów wzrostu (ASW) od 2006 roku spowodował zmiany w żywieniu zwierząt. Po wycofaniu paszowych antybiotyków stymulatorów wzrostu obecnie w praktyce rolniczej stosuje się m.in. naturalne substancje pochodzenia roślinnego oraz substancje bioaktywne takie jak: probiotyki, prebiotyki, symbiotyki [Fallah i in., 2013; Mateos i in., 2006; Przeniosło-Siwczyńska i Kwiatek, 2013; Yang i in., 2009; Yegani i Korver, 2008]. Substancje bioaktywne wpływają na ograniczenie patogenów w układzie pokarmowym zwierząt przez co przyczyniają się do poprawy zdrowotności m.in. przez redukcję schorzeń jelita a także poprawiają zdolności produkcyjne organizmu [Apata, 2009; Chaveerach i in., 2004; Świątkiewicz i Koreleski, 2007].

Probiotyki są naturalnymi składnikami stymulującymi wzrost organizmu i prawidłowe funkcjonowanie układu pokarmowego [Miziak i in., 2012]. Słowo probiotyk wywodzi się z języka greckiego "*pro bios*" gdzie oznacza "dla życia" [Nowak i in., 2010]. Organizacja Narodów Zjednoczonych ds. Wyżywienia i Rolnictwa (FAO) oraz Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) przedstawia definicję probiotyków jako: "żywe szczepy, określonych drobnoustrojów, które podawane w odpowiednich ilościach modulują równowagę bakteryjną flory jelitowej i wywierają korzystny wpływ na zdrowie konsumenta" [Miziak i in., 2012].

Najczęściej w preparatach probiotycznych wykorzystuje się grupy bakterii kwasu mlekowego (LAB), oraz nielicznie grzyby. Najpopularniejsze są drobnoustroje z rodzajów: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* i *Bifidobacterium*. Grzyby najczęściej stosowane w preparatach probiotycznych to zazwyczaj drożdżaki z gatunków *Saccharomyces cerevisiae* oraz *Saccharomyces boulardii* [Augustyniak i Nawrotek, 2014].

Działanie probiotyków jest wielokierunkowe i nie do końca wyjaśnione. Jednym z mechanizmów ich działania jest konkurencja o receptory i miejsca, w których bakterie przylegają do nabłonka jelita. Konkurują w ten sposób z patogenami o niezbędne składniki pokarmowe. Zwiększają sekrecję mucyn-glikoprotein, które uszczelniają nabłonek jelitowy i zmieniają budowę receptorów dla toksyn bakteryjnych [Guarner, 2003; Lambert, 2009; Ley i in., 2008]. Pozytywny wpływ probiotyków na organizmy zwierzęce zależy od wielu czynników takich jak chociażby rodzaj zastosowanego szczepu, jego ilość i czas stosowania [Koop-Hoolihan, 2001].

W wielkotowarowej produkcji kurczęta brojlery są szczególnie narażone na stres spowodowany m.in. dużą gęstością obsady, zmianami paszy oraz transportem [Skomorucha, 2007]. Wszystkie te czynniki mogą powodować obniżoną odporność ptaków i narażają je na działanie bakterii patogennych kolonizujących przewód pokarmowy. Największe zagrożenie dla drobiu i zdrowia ludzkiego stwarzają *salmonelle* i *Campylobacter jejuni* oraz *Clostridium perfringens* [Humphrey, 2007]. Probiotyki można wykorzystywać do kontroli bakterii patogennych i w ten sposób utrzymywać homeostazę mikroflory bakteryjnej jelit. Stwierdzono, że szczepy bakterii probiotycznych wpływają na aktywność i skład mikroflory jelita ślepego. [Willis, 2008]. Stosowanie *Lactobacillus* jako probiotyku powoduje znaczne



zmniejszenie liczebności bakterii *Salmonella enteritidis*, *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, enteropatogenne *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica* i *Clostridium perfringens* u piskląt brojlerów kurzych i zmniejsza śmiertelność z powodu martwicy jelit [Schneitz, 2005]. Stwierdzono, że suplementacja szczepami *Lactobacillus* zwiększa także przyrosty masy ciała u kurcząt brojlerów i redukuje odkładanie tłuszczu w jamie ciała [Kalavathy i in., 2003]. W produkcji jaj kurzych wykazano natomiast korzystny wpływ probiotyków na jakość, rozmiar jaj i zmniejszenie spożycia paszy u niosek [Kurtoglu i in., 2004; Panda i in., 2008].

Prowadzona intensywna selekcja spowodowała uzyskanie wysokich przyrostów masy ciała kurcząt brojlerów w krótkim czasie powodując obniżenie zdolności do przeciwstawiania się dużym obciążeniom nóg skutkując ich deformacją. Badania przeprowadzone przez Abdelqader i in. [2013] potwierdzają wpływ szczepu probiotycznego *Bacillus subtilis* na wzrost gęstości kośćca brojlerów i podwyższenie w nim koncentracji substancji nieorganicznych. Panda i in. [2008] zaobserwowali natomiast, że dodatek probiotyków zawierających bakterie z rodzaju *Lactobacillus sporogenes* spowodował nie tylko koncentrację substancji nieorganicznych w kośćcu kurcząt brojlerów ale również większą wytrzymałość mechaniczną. Jest to niezwykle ważny aspekt działania substancji probiotycznych ze względu na występowanie dużych strat spowodowanych zaburzeniami rozwoju układu kostno-szkieletowego u kurcząt rzeźnych [Cook, 2000].

Czynnikami, które istotnie wpływają na działanie substancji probiotycznych są czas i sposób ich podania. Stwierdzono, że probiotyki podawane wraz z paszą w porównaniu do podawanych w wodzie pitnej zwiększają średni uzyskany efekt [Timmerman i in., 2006]. Substancje probiotyczne poprawiają wydajność organizmów poprzez wspomaganie procesów metabolicznych i wpływają pozytywnie na procesy trawienia i wchłaniania składników odżywczych [Bozkurt i in., 2011; Younis i in., 2013]. Dobrym uzupełnieniem preparatów probiotycznych mogą być substancje nie ulegające trawieniu w żołądkach zwierząt monogastrycznych takie jak: FOS (fruktooligosacharydy), MOS (oligosacharydy manozowe), GOS (galaktooligosacharydy), które stymulują selektywnie aktywność i wzrost pożądanej mikroflory jelitowej [Gibson i Roberfroid, 1995].

Probiotyki mogą być dobrą alternatywą w stosunku do antybiotyków. Nie powodują zazwyczaj żadnych skutków ubocznych i nie wymagają także okresu karencji. Zwiększenie ilości koloni bakterii probiotycznych stwierdza się na ogół po okresie 7 dni od zadania preparatu probiotycznego. Probiotyki wpływają korzystnie na syntezę i wchłanianie witamin zwłaszcza z grupy B co jest niezmiernie ważne w początkowym okresie odchovu ptaków. Zmniejszają ryzyko chorób układu pokarmowego i mogą znaleźć swoje zastosowanie w produkcji drobiarskiej.

Prowadzone badania nad wpływem substancji probiotycznych na wyniki produkcyjne [Babazadeh i in., 2011; Endo i Nakano, 1999; Kabir i in., 2004; Kim i in., 2016, Opaliński i in., 2007, Takahashi i in., 2005; Quadros i in., 2001; Vargas i in., 2002; Youseri i Karkoodi, 2007] oraz skład tuszki i jakość mięsa [Kabir i in., 2004; Kim i in., 2016; Loddi i in., 2000; Mahajan i in., 2000; Pelicia i in., 2004; Zhang i in., 2005] nie przyniosły jednoznacznych rezultatów. Wyniki poszczególnych eksperymentów są dosyć zróżnicowane, często przeciwstawne.

Na uwagę zasługują również efektywne mikroorganizmy (EM) w skład których wchodzi kilkadziesiąt szczepów komplementowanych w latach osiemdziesiątych ubiegłego wieku przez japońskiego profesora Teruo Higa. Enzymy poszczególnych szczepów powodują naturalny rozkład materii organicznej. Inną ważną cechą kompozycji wyselekcjonowanych szczepów jest ich współdziałanie ze sobą przez produkcję substancji umożliwiających im przetrwanie w niesprzyjającym środowisku zawierającym odmiany wrogich patogenów grzybowych. Efektywne mikroorganizmy stosowane w produkcji zwierzęcej poprawiają m.in.

proces trawienia, ograniczają występowanie biegunek, łagodzą przebieg zatruc pokarmowych oraz zwalczają populacje chorobotwórczych mikroorganizmów takich jak *salmonella*, *enterokoki* i *bakterie coli* przez ograniczenie warunków ich wzrostu [Gacka, 2013]. Preparaty EM zadawane wraz z paszą stymulują rozwój pożytecznej mikroflory w organizmie zwierząt co ułatwia proces trawienia przez lepszą przyswajalność substancji odżywczych przez przewód pokarmowy. W naturalny sposób regulują pH przewodu pokarmowego i blokują rozwój patogennych organizmów. Kompozycje pożytecznych mikroorganizmów przyczyniają się również do polepszenia dobrostanu zwierząt poprzez likwidację odorów w pomieszczeniach inwentarskich powstałych w wyniku wydzielania się amoniaku i siarkowodoru oraz rewitalizację wody [Gacka, 2013].

Początkowo efektywne mikroorganizmy (EM) były wykorzystywane w rolnictwie do poprawy żyzności gleby, z czasem również zaczęto je stosować w przemyśle mleczarskim, serowarskim, medycynie, jako dodatek paszowy u zwierząt gospodarskich, w celu poprawy stanu sanitarnego pomieszczeń inwentarskich. Stosowane w formie oprysku lub zamgławiania zmniejszają produkcję szkodliwych gazów w powietrzu pomieszczeń inwentarskich, powodują zmniejszenie wilgotności ściółki, co może korzystnie działać na przyrosty masy ciała i przewartościowanie paszy. Mogą być także użyte w celu uzdatniania gnojowicy i odcieków. Stosowane w paszach łagodzą przebieg zatruc pokarmowych, obniżają pH treści jelit, zmniejszają liczbę biegunek [Korytkowski, 2015].

Skuteczna dezynfekcja budynków dla drobiu stanowi ważny element profilaktyki produkcji drobiu i ogranicza występowanie zoonoz i innych chorób drobiu. W ostatnich latach ocenę skuteczności stosowania różnych chemicznych preparatów dezynfekcyjnych do odkażania budynków dla drobiu wykonali de Castro Burbarelli i in. [2017], Luyckx i in. [2017], Maertens et al. [2018]. Chemiczne preparaty dezynfekcyjne mogą jednak negatywnie oddziaływać na organizm zwierzęcia i człowieka, bezpieczeństwo pozyskiwanych surowców drobiowych i stan techniczny budynków drobiarskich. Z tych względów poszukuje się innych bardziej bezpiecznych metod odkażania pomieszczeń dla drobiu. Brak naukowych opracowań dotyczących skuteczności biodezynfekcji ferm drobiu za pomocą preparatów Pro-Biotyk Em-15 i EMFarma<sup>TM</sup> stanowiło zachętę do podjęcia się badań w tym zakresie.

Popyt na mięso drobiowe nieustannie wrasta co jest związane z konkurencyjnością pod względem cenowym oraz aspektem żywieniowo-zdrowotnym. Mięso kurczęce charakteryzuje się dużą wartością odżywczą, dietetyczną, kulinarną i walorami sensorycznymi. Na jakość mięsa wpływa wiele czynników m.in. fizycznych, chemicznych, morfologicznych, biochemicznych, mikrobiologicznych i technologicznych [Jassim i in., 2011].

Wartość odżywcza mięsa determinowana jest m. in. przez zawartość białka, tłuszczu, skład aminokwasów, profil kwasów tłuszczowych oraz zawartość cholesterolu. Mięso drobiu grzebiącego cechuje się wysoką zawartością białka zawierającego wszystkie egzogenne aminokwasy przy niskim poziomie tłuszczu, gdzie nienasycone kwasy tłuszczowe stanowią ponad 60% ogólnej zawartości. Na uwagę zasługuje również niska zawartość cholesterolu oraz kolagenu. Sprawia to, iż mięso kurcząt odznacza się wysoką strawnością wynoszącą ponad 94% i wysoką wartością dietetyczną [Orkusz, 2015].

Do cech sensorycznych mięsa możemy zaliczyć: teksturę, soczystość i smakowitość. Dla konsumentów ważnym czynnikiem w wyborze produktu mięsnego ma wygląd zewnętrzny determinowany głównie jego barwą, która uważana jest jako wyznacznik świeżości [Lynch i in., 1986; Sikora i Weber, 1995]. Innym równie ważnym czynnikiem decydującym o zakupie mięsa przez konsumentów jest jego tekstura. Jest ona przede wszystkim związana z kruchością, która determinowana jest przez wiele czynników takich jak: gatunek, wiek, płeć oraz zabiegi technologiczne podczas obróbki poubojowej (oparzenie, usuwanie opierzenia) [Anonim, 2004; Fletcher, 2002; Skrabka-Błotnicka, 1997; Wołoszyn, 2002]. Soczystość z kolei związana jest z wodochłonnością mięsa. Przy wysokiej wodochłonności występują

niskie ubytki masy mięsa podczas jego przerobu i przechowywania co tym samym wpływa na lepszą soczystość i wybór przez konsumentów [Toscas i in., 1999; Sörheim i in., 2004].

Największym zainteresowaniem cieszą się mięśnie piersiowe oraz mięśnie nóg. Mięśnie piersiowe są chudsze i cechują się niższą zawartością kolagenu i wyższą wartością dietetyczną w porównaniu z mięśniami nóg.

Jednym z ważniejszych czynników wpływających na jakość mięsa jest żywienie zwierząt. Kalavathy i in. [2003] stwierdzili redukcję ilości tkanki tłuszczowej w jamie ciała pod wpływem stosowania kultur *Lactobacillus*, co w konsekwencji wpływa pozytywnie na cechy jakościowe mięsa. Pietrzak i in. [2009] odnotowali większą zawartość białka natomiast mniejszą tłuszczu w mięśniach nóg u kurcząt Ross 308 żywionych z dodatkiem probiotyku (bakterie kwasu mlekowego *Enterococcus faecium* NCIMB 10415) co jest korzystne pod względem zdrowotnym. Większą zawartość tłuszczu z kolei charakteryzowały się mięśnie piersiowe kurcząt żywionych wyżej wymienionym probiotykiem co pozytywnie wpływa na ich walory sensoryczne. W mięśniach nóg Pietrzak i in. [2009] stwierdzili mniejszą zdolność wiązania wody i większy wyciek termiczny. Z kolei tłuszcz kurcząt żywionych z dodatkiem probiotyku wykazuje większą zawartość monoenowych kwasów tłuszczowych (MUFA) i jednocześnie mniejszą polienowych (PUFA). Wysoka zawartość kwasów tłuszczowych PUFA w mięsie drobiowym podnosi jego wartość żywieniową. Lipiński i in. [2011] nie odnotowali statystycznie istotnych różnic w składzie chemicznym mięśni piersiowych u indyczek żywionych z dodatkiem substancji probiotycznej (*Lactobacillus lactis*). W badaniach innych autorów nie stwierdzono jednoznacznego wpływu stosowania substancji probiotycznych na jakość mięsa drobiowego [Ali., 2010; Khalafalla i in., 2011; Park i Kim, 2014; Pelicano i in., 2003; Rai i in., 2013; Zhou i in., 2010].

Wykazanie pozytywnych efektów stosowania preparatów efektywnych mikroorganizmów (EM) w produkcji kurcząt brojlerów w odniesieniu do ich zdrowia, produktywności i jakości pozyskiwanych surowców (tuszk i mięso) zanieczyszczenia mikrobiologicznego fermy będzie potwierdzeniem słuszności podstaw światowego trendu biologizacji współczesnego rolnictwa.

## **2. WYKAZ ARTYKUŁÓW NAUKOWYCH STANOWIĄCYCH CYKL PUBLIKACJI ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**

1. Kamil Stęczny, Dariusz Kokoszyński, Effect of probiotic preparations (EM) on productive characteristics, carcass composition and microbial contamination in a commercial broiler chicken farm, *Animal Biotechnology* (Taylor & Francis), 2020, DOI:10.1080/10495398.2020.1754841, pkt. MNiSW 40, IF = 1,487.
2. Kamil Stęczny, Dariusz Kokoszyński, Effects of probiotics and sex on physicochemical, sensory and microstructural characteristics of broiler chicken meat, *Italian Journal of Animal Science* (Taylor & Francis), 2019, 18(1), 1385-1393, DOI:10.1080/1828051X.2019.1667269, pkt. MNiSW 40, IF = 1,805.
3. Kamil Stęczny, Dariusz Kokoszyński, Effect of probiotic preparations (EM) and sex on morphometric characteristics of the digestive system and leg bones, and caecal microflora in broiler chickens, *Journal of Applied Animal Research* (Taylor & Francis), 2020, 48(1), 45-50, DOI:10.1080/09712119.2020.1718680, pkt. MNiSW 70, IF = 1,248

### **3. UZASADNIENIE SPÓJNOŚCI TEMATYCZNEJ CYKLU PUBLIKACJI ROZPRAWY**

Cykl publikacji rozprawy doktorskiej zawiera spójny tematycznie opis wyników badań dotyczących określenia skuteczności działania preparatów probiotycznych Pro-Biotyk Em-15 i EMFarma<sup>TM</sup> na wyniki produkcyjne, skład tuszki, jakość mięsa, wybrane cechy anatomiczne, skład mikroflory jelit ślepych oraz zanieczyszczenie mikrobiologiczne fermy drobiu. W trzech oryginalnych pracach twórczych zawarto opis wyników badań przedstawionych i zatwierdzonych przy otwarciu przewodu doktorskiego.

#### **3.1. HIPOTEZA BADAWCZA, CEL I ZAKRES BADAŃ**

##### **3.1.1. Hipoteza badawcza**

Hipoteza badawcza zakłada występowanie różnic pod względem wyników produkcyjnych, składu tuszki i jakości mięsa kurcząt brojlerów Ross 308 pod wpływem używania preparatów EM. Stosowanie preparatów EM w odchowie kurcząt brojlerów może przyczynić się ponadto do ich zróżnicowania pod względem cech biometrycznych jelit oraz ważniejszych organów i narządów wewnętrznych, a także składu mikroflory jelit ślepych na koniec okresu badań oraz skażenia mikrobiologicznego paszy, ściółki i linii pojenia na fermie kurcząt brojlerów w okresie odchowu.

##### **3.1.2. Cel i zakres badań**

Celem badań było określenie wpływu stosowania preparatów probiotycznych Pro-Biotyk Em-15 i EMFarma<sup>TM</sup> na wyniki produkcyjne, wybrane cechy anatomiczne, skład tuszki i jakość mięsa, skład mikroflory kału jelit ślepych i zanieczyszczenie mikrobiologiczne fermy. Określono wpływ stosowania preparatów EM na masę ciała kurcząt brojlerów Ross 308 w wieku 42 dni, spożycie i zużycie paszy oraz przeżywalność kurcząt od 1 do 42 dnia życia, a także wydajność rzeźną i skład tuszki kurcząt w wieku 42 dni. W doświadczeniu oceniono wpływ użycia preparatów EM na podstawowy skład chemiczny, właściwości fizykochemiczne mięsa z piersi i nóg oraz cechy sensoryczne, reologiczne, tekstury i mikrostruktury mięśnia piersiowego większego, a także długość ciała, długość i średnice segmentów jelita, masę i procentowy udział głównych organów wewnętrznych, wymiary kości udowej i piszczelowej oraz skład mikroflory kału jelit ślepych kurcząt brojlerów Ross 308 w wieku 42 dni. W trakcie odchowu kurcząt oznaczono także skażenie mikrobiologiczne paszy, ściółki i linii pojenia w budynku drobiarskim na początku (1 dzień), środku (21 dzień) i końcu (42 dzień) okresu odchowu kurcząt brojlerów.

### 3.2. MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Materiał doświadczalny stanowiło 48 kurcząt brojlerów Ross 308 w wieku 42 dni oraz dane z dokumentacji producenta kurcząt dotyczące wyników produkcyjnych i wyniki oznaczeń mikrobiologicznych. Kurczęta utrzymywano w budynku zamkniętym (w komercyjnej fermie kurcząt brojlerów), przedzielonym pomieszczeniem technicznym na dwie hale produkcyjne (kontrolna, doświadczalna) o powierzchni 500 m<sup>2</sup> każda. W obu halach produkcyjnych (w których utrzymywano na początku po 9000 piskląt, łącznie 18000 piskląt) zapewniono takie same parametry środowiska, zależne od wieku ptaków. W pierwszym tygodniu odchowu temperatura wynosiła 33°C i stopniowo była redukowana do 17°C (ogrzewanie nagrzewnicami), wilgotność względna wynosiła od 55 do 70%, natomiast wymiana powietrza od 0 do 4.2 m<sup>3</sup>/godz./kg masy ciała. Stężenie szkodliwych gazów nie przekraczało określonych przepisami UE norm tj. CO<sub>2</sub> do 3000 ppm, NH<sub>3</sub> do 20 ppm. Obsada ptaków na 42 dzień odchowu nie przekraczała 42 kg/m<sup>2</sup> (po ubiórcie po 5 tygodniach odchowu kurcząt).



Fot. 1. Budynek doświadczalny (fot. K. Stęczny)

Przez cały okres odchowu ptaki żywiono *ad libitum* pełnoporcjowymi mieszankami paszowymi i miały całodobowy dostęp do wody. Przez pierwsze 8 dni odchowu ptaki żywiono przemysłową pełnoporcjową mieszanką paszową starter dla kurcząt brojlerów w formie kruszonki. Od 9 do 42 dnia życia ptakom podawano pełnoporcjowe mieszanki paszowe: grower 1 (9-24 dzień), grower 2 (25-32 dzień) i finisz (33-42 dzień) w formie miąłkiej (ześrutowanej) wyprodukowanych z zakupionych komponentów paszowych (koncentrat białkowy, pszenica paszowa, śruta poekstrakcyjna sojowa, olej sojowy, kreda pastewna, premix) na terenie fermi. Skład chemiczny mieszanek paszowych podawanych ptakom oznaczono w Laboratorium Jakości Pasz i Surowców Uniwersytetu Technologiczno-Przyrodniczego w Bydgoszczy i zamieszczono w tabeli 1 (artykuł 1), natomiast skład komponentowy mieszanek paszowych produkowanych na fermie w tabeli 2 (artykuł 1).

Odchów ptaków prowadzony był pod nadzorem lekarza weterynarii. W trakcie przygotowania budynku na wstawienie piskląt w hali kontrolnej do odkażania użyto chemiczne preparaty dezynfekcyjne (podchloryn sodu, Virocid F), natomiast w hali

doświadczalnej oprócz wymienionych chemicznych preparatów dezynfekcyjnych biologiczne środki – preparat EMFarma™ (30 l preparatu plus 170 l wody na 500 m<sup>2</sup> hali) spryskując sufit, sprzęt dla drobiu i ściółkę.

W hali doświadczalnej (1 pomieszczenie o powierzchni 500 m<sup>2</sup>, 9000 ptaków) od 1 dnia życia, trzy razy w tygodniu do wody podawano Pro-Biotyk Em-15 w ilości 2 ml/l wody. Od 2 tygodnia życia kurcząt, dwa razy w tygodniu rozpylano roztwór mieszaniny preparatów Pro-Biotyk Em-15 i EMFarma™ (po 1.25 l każdego preparatu plus 2.5 l wody) na paszę i ściółkę.

Profil mikrobiologiczny preparatów probiotycznych Pro-Biotyk (Em-15) i EMFarma™ oznaczono metodą posiewów ilościowych (posiew na płytki Petriego) w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Do oznaczenia liczby bakterii *Lactobacillus* spp. użyto podłoża MRS Agar (OXOID), *Bifidobacterium* spp. podłoża TOS-MUP (MERCK), *Lactococcus* i *Streptococcus thermophilus* podłoża M17 (OXOID), *Bacillus subtilis* podłoża TSB (OXOID), *Rhodopseudomonans* spp podłoża ATCC: 1676 Van Niel's, natomiast do oznaczenia drożdży *Saccharomyces cerevisiae* podłoża z chlorofenikolem (YGC), (BIOCORP). Dane dotyczące profilu mikrobiologicznego preparatów probiotycznych Pro-Biotyk Em-15 i EMFarma™ podano w tabeli 3 (artykuł 1).

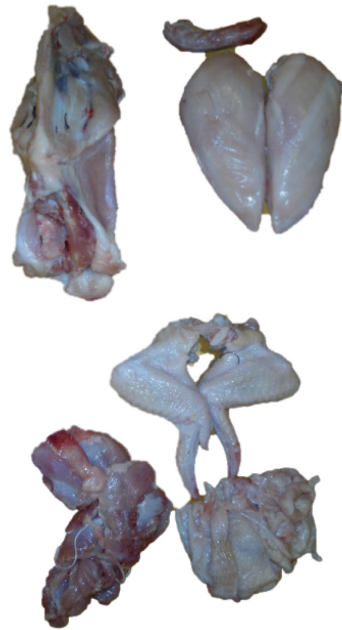
W czasie 42 dni odchowu codziennie rejestrowano masę podawanej paszy a na koniec okresu odchowu ilość niewyjedzonych resztek paszy. Na tej podstawie określono ilość paszy spożytej średnio przez 1 ptaka oraz zużycie paszy na 1 kg masy ciała, oddzielnie dla każdej grupy. Na bieżąco rejestrowano padnięcia ptaków.

W 42 dniu odchowu wybrano do uboju 48 kurcząt, po 24 ptaki z każdej grupy (po 12 samców i 12 samic) na podstawie rozwoju grzebieni. Ptaki do uboju pozyskano w czterech równo oddalonych miejscach, po przekątnej każdej hali. W każdym miejscu wybrano po 3 samce i 3 samice o masie ciała zbliżonej dla średniej dla danej płci w grupie, którą określono podczas ważenia kontrolnego kurcząt brojlerów wykonanego przez producenta.

Wybrane ptaki oznaczono znaczkami kłódeczkowymi, określono indywidualnie ich masę ciała na wadze elektronicznej Axis BD 15S (Axis, Gdańsk, Polska) z dokładnością do 5 g, a następnie zmierzono długość ciała (długość tułowia z szyją) – pomiar odległości między pierwszym kręgiem szyjnym (atlas) a tylną górną wypukłością kości kulszowej.

Po wykonaniu oceny na żywych ptakach wykonano ich ubój. Ubój ptaków przeprowadzono w małej przemysłowej ubojni kurcząt (ogłuszanie wodno-prądowe, natężenie prądu 125 mA/ptaka, czas ogłuszania 4 s, mechaniczne przecięcie naczyń krwionośnych szyi, wykrwawianie). Po uboju ptaki oskubano mechanicznie i wypatroszono ręcznie.

Wypatroszone tuszki z szyją po przywiezieniu do Katedry Hodowli Zwierząt Uniwersytetu Technologiczno-Przyrodniczego w Bydgoszczy schłodzono w szafie chłodniczej Hendi (Hendi, Gadki, Polska) przez 18 godzin w temperaturze 4°C. Schłodzone tuszki zważono na wadze elektronicznej WLC 6/12/F1/R (Radwag, Radom, Polska) z dokładnością do 0,1 g, a następnie wykonano ich rozbiór (dysekcję). W trakcie dysekcji z każdej tuszki wyodrębniono szyję bez skóry, skrzydła ze skórą, skórę z tłuszczem podskórnym z całej tuszki, bez skóry ze skrzydeł, mięśnie piersiowe (mięsień piersiowy większy plus mięsień piersiowy mniejszy), mięśnie nóg (wszystkie mięśnie z obu ud i podudzi), pozostałości tuszki tj. szkielet z pewną ilością mięśni szkieletowych [Ziołocki i Doruchowski, 1989].



Fot. 2 Tuszka po dysekcji (fot. K. Stęczny)

Pomiar pH mięśni piersiowych (*m. pectoralis major*) i mięśni nóg (mięśnie podudzia) wykonano 24 h od uboju kurcząt na mięsie schłodzonym. Oznaczenia  $pH_{24}$  wykonano za pomocą pehametru pH – Star CPU (Ingenierburno R. Matthäus, Nobitz, Niemcy) do badania pH mięsa. Oznaczenia odczynu mięsa wykonano z dokładnością do 0,01. Przed pomiarem pH-metr został skalibrowany za pomocą standardowych wzorców (pH 5,5 and 7,0). Z kolei przewodność elektryczną zmierzono także 24 godziny od uboju –  $EC_{24}$  na tuskach schłodzonych do temperatury 4°C. Do pomiaru  $EC_{24}$  użyto konduktometru LF – Star CPU (Ingenierbüro R. Matthäus, Nobitz, Niemcy). W celu oznaczenia wartości  $EC_{24}$  stalowe elektrody konduktometru umieszczono w podudziu lub mięśniu piersiowym większym pod kątem 90° wzdłuż ich włókien mięśniowych. Pomiar  $EC_{24}$  wykonano z dokładnością do 0,1 mS/cm.

Po dysekcji, pobrano próby mięśni piersiowych i mięśni z każdej tuszki (od 48 ptaków) w celu oznaczenia podstawowego składu chemicznego, wycieku termicznego, wycieku swobodnego soku, zmiennych barwy mięsa  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ . Próby mięśnia piersiowego większego pobrano także w celu oznaczenia cech sensorycznych (w tym cech tekstury), właściwości reologicznych i mikrostruktury.

Podstawowy skład chemiczny i zawartość kolagenu w mięśniach piersiowych i nóg porównywanych grup kurcząt brojlerów oznaczono przy użyciu metody spektrometrii transmisyjnej w bliskiej podczerwieni (NIR). Użyto kalibracji na sztucznych sieciach neuronowych (ANN) na aparacie FoodScan (FoodScan Laboratory, Foss, Cheshire, W. Brytania).

Barwę mięsa oznaczono na powierzchni *m. pectoralis major* od strony kości mostka oraz mięśni ud i podudzi (nogi) - po wypreparowaniu rzepki i ścięgien, 24 h *post mortem*. Określono zmienne barwy mięsa:  $L^*$  – jasność barwy,  $a^*$  – natężenie barwy czerwonej, na osi czerwony-zielony,  $b^*$  – natężenie barwy żółtej, na osi żółty-niebieski, zgodnie z założeniami systemu CIE [1976]. Pomiar barwy mięsa wykonano kolorymetrem CR410 firmy Konica Minolta (Konica Minolta, Japan). Użyto iluminację szerokokątową (geometria 0° kąt projekcji, obszar pomiaru – średnica 20 mm, źródło światła –  $D_{65}$ ). Kolorymetr wykalibrowano przy użyciu białej płytki wzorcowej CR410 o następujących danych kalibracyjnych:  $Y=94,40$ ,  $x=0,3159$ ,  $y=0,3325$ .



Oznaczono także wyciek swobodny soku z mięśnia piersiowego większego oraz mięśni nóg (ud i podudzia łącznie). Każdy mięsień zważono na wadze RadwagPS1000. R2 (Radwag, Radom, Polska). Dokładność pomiaru wynosiła do 0,01 g. Następnie próby mięsa z piersi lub nogi każdego ptaka umieszczono osobno w woreczku 1 z nacięciami. W kolejnym etapie woreczek z próbą mięsa umieszczono w woreczku 2 uniemożliwiając kontakt wyciekającego soku z próbą mięsa. Próby zawieszono na stojakach i przechowywano w szafie chłodniczej Hendi o temperaturze 4°C (Hendi, Gądkki, Polska) przez 24 godziny. Po tym czasie próby mięsa z piersi lub nóg ponownie zważono. Na podstawie różnicy masy próby przed i po chłodzeniu obliczono swobodny wyciek soku z mięsa. Ubytek masy próby mięsa wyrażono w procentach początkowej masy próby.

Oznaczenia wycieku termicznego mięsa wykonano na próbach mięśnia piersiowego większego oraz mięśniach ud i podudzi (łącznie) o masie 20 g ± 0,2 g. Próby mięsa uformowano w kształcie kulki, owinięto w gazę higroskopijną i umieszczono na 10 min. w łaźni wodnej o temperaturze 85°C. Po wyjęciu z łaźni, poddane obróbce termicznej próby mięsa schładzano przez 30 min. w temperaturze 4°C. Następnie ponownie je zważono na wadze elektronicznej Radwag PS1000.R2 (Radwag, Radom, Poland) z dokładnością do 0,01 g. Na podstawie różnicy masy mięsa przed i po obróbce termicznej obliczono ubytek masy mięsa. Uzyskane wyniki wycieku swobodnego wyrażono jako procentowy ubytek początkowej masy próby mięsa.

Ocenę cech właściwości sensorycznych wykonano na próbach mięśnia piersiowego większego pozyskanych od 42-dniowych kurcząt brojlerów Ross 308. Próby mięsa z piersi poddano obróbce termicznej w 0.6% roztworze solanki. Na każde 100 g mięsa dodano 200 ml wody. Po obróbce termicznej próby mięsa schłodzono do temperatury 60°C i poddano ocenie komisji złożonej z 6 sędziów. Próby mięsa z piersi oceniono według 5-punktowej skali podaną przez Baryłko-Pikielną i Matuszewską [2009]. Oznaczono natężenie zapachu i smakowitości mięsa z piersi przyznając noty: 1 pkt. = niewyczuwalny, 2 pkt. = wyczuwalny, 3 pkt. = słabo zdecydowany, 4 pkt. = zdecydowany, 5 = bardzo zdecydowany, pożądalność zapachu i smakowitości oceniono według skali 1 pkt. = bardzo niepożądany, 2 pkt. = słabo niepożądany, 3 pkt. = obojętny, 4 pkt. = pożądan, 5 pkt. = bardzo pożądan, kruchość oceniono według skali 1 pkt. = mięso bardzo twarde, 2 pkt. = twarde, 3 pkt. = lekko kruche, 4 pkt. = kruche, 5 pkt. = bardzo kruche, natomiast soczystość mięsa według skali: 1 pkt. = wyraźnie suche, 2 pkt. = suchawe, 3 pkt. = słabo soczyste, 4 pkt. = soczyste, 5 pkt. = bardzo soczyste.

Oznaczenia tekstury (twardość, spoistość, sprężystość, żuwalność, gumowatość, maksymalna siła cięcia) i właściwości reologicznych mięsa (suma modułów lepkości, suma modułów sprężystości) wykonano przy użyciu aparatu Instron 1140 (Instron Corp., USA), stosując test podwójnego przebijania (test TPA), test cięcia Warnera-Bratzlera (WB) oraz test relaksacji. Dla każdej próbki w każdym z testów wykonano po 5-7 powtórzeń. Badanie wykonano na 48 próbach mięśni piersiowego większego poddanych obróbce cieplnej pozyskanych od kurcząt brojlerów po dysekcji. Oznaczenia wykonano w Katedrze Technologii Mięsa Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie.

Mięśnie zapakowano szczelnie w woreczki z folii PE i ogrzewano w wodzie o temp 72±2°C do czasu uzyskania w centrum geometrycznym próby mięsa temperatury 70,2°C. Po osiągnięciu założonej temperatury mięśnie schładzano w zimnej, bieżącej wodzie do temperatury ok. 12°C w centrum geometrycznym i następnie po zlianiu powstałego wycieku zabezpieczano przed wysychaniem folią do pakowania żywności, po czym przechowywano w warunkach chłodniczych w temperaturze 3±1°C przez 12 godzin, do momentu rozpoczęcia analiz. Badanie tekstury przeprowadzono na próbkach po doprowadzeniu ich do temperatury ok. 18°C.

Z poszczególnych mięśni za pomocą noża elektrycznego Siemens Electronic MS 6000 wycinano prostopadłe do przebiegu włókien mięśniowych plaster o grubości  $20 \pm 1$  mm. Na tak przygotowanych próbkach przeprowadzono instrumentalną ocenę właściwości mechanicznych.

W teście TPA w próbkę (równoległe do przebiegu włókien mięśniowych) wbijano dwukrotnie trzpień o średnicy 0,62 cm, przyjęto limit deformacji 80% i szybkość roboczą trawersy 50 mm/min. Z uzyskanej krzywej obrazującej zależność siła-deformacja, wyliczono parametry takie jak: twardość, spoistość, sprężystość, żuwalność i gumowatość [Bourne, 1982].

W teście Warnera-Bratzlera (WB) próbki mięśni przecinano nożem o trójkątnym ostrzu, równoległe do przebiegu włókien mięśniowych i wyznaczano maksymalną siłę cięcia [Bourne, 1982]. Szybkość robocza trawersy wynosiła 50 mm/min.

W teście relaksacji w próbkę wbijano trzpień o średnicy 0,96 cm, na głębokość 2 mm (deformacja 10%) rejestrując przez 90 s zmiany naprężeń. Do wyliczenia modułów lepkości i sprężystości i użyto uogólniony model Maxwella, złożony z 3 elementów połączonych równoległe: ciała Hooke'a i dwóch ciał lepko-sprężystych Maxwella. Równanie modelu miało postać:

$$\delta = \varepsilon * \left[ E_0 + E_1 * \exp\left(\frac{-E_1 * t}{\mu_1}\right) + E_2 * \exp\left(\frac{-E_2 * t}{\mu_2}\right) \right] \quad (1)$$

gdzie:

$\delta$  – naprężenie (kPa)

$\varepsilon$  – odkształcenie

$E_0$  – moduł sprężystości ciała Hooke'a (kPa)

$E_1, E_2$  - moduły sprężystości odpowiednio 1 i 2 ciała Hooke'a (kPa)

$\mu_1, \mu_2$  - moduły lepkości odpowiednio 1 i 2 ciała Maxwella (kPa x s)

$t$  – czas

Dla bardziej czytelnej interpretacji wyników dla każdej próby wyliczono sumę modułów lepkości ( $\mu_1 + \mu_2$ ) oraz sumę modułów sprężystości ( $E_0 + E_1 + E_2$ ).

Do badań histologicznych pobrano próby *m. pectoralis major* od 48 ptaków, po 12samców i 12samic z każdej grupy kurcząt ubitych w wieku 42 dni. Od każdego ptaka po uboju pobrano po trzy wycinki z centralnej części mięśnia piersiowego większego o wymiarach  $0,5 \times 0,5 \times 1,0$  cm każdy. Próby pobrano równoległe do przebiegu włókien mięśniowych. Następnie utrwalono je płynem Sannomiya, odwodniono alkoholem i benzenem, po czym zatopiono w parafinie w formie bloczków. Bloki pocięto mikrotomem, a skrawki o wielkości  $10 \mu\text{m}$  umieszczono na szkiełkach i barwiono kontrastowo hematoksyliną i eozyną [Burck, 1975], po czym zamknięto w balsamie kanadyjskim. Pomiar cech mikrostruktury *m. pectoralis major* wykonano przy pomocy komputerowej analizy obrazu MultiScanBasev.13 (Computer Scanning System Ltd, Warszawa, Polska). Zmierzono pole przekroju poprzecznego włókna mięśniowego, obwód, średnicę horyzontalną, średnicę wertkalną włókna mięśniowego, grubości *perimysium* i *endomysium* mięśnia piersiowego większego. Oznaczenia wykonano na 3 preparatach *m. pectoralis major* pozyskanych od każdego kurczaka. Łącznie do oznaczenia mikrostruktury użyto 144 preparaty mięśnia piersiowego większego. W każdym preparacie zmierzono około 200 włókien mięśniowych oraz wykonano po 150-200 pomiarów grubości tkanki łącznej (*perimysium* i *endomysium*). Zastosowano powiększenie 100-krotne. Wykorzystując dane dotyczące horyzontalnej (H)

i wertykalnej (V) średnicy włókna mięśniowego obliczono stosunek średnicy horyzontalnej do średnicy wertykalnej.

Podczas patroszenia wyodrębniono jelita i inne organy wewnętrzne (żołądek gruczołowy, żołądek mięśniowy, serce, wątrobę, śledzionę). Taśmą mierniczą z dokładnością do 1 mm zmierzono długości dwunastnicy, jelita czczego, jelita biodrowego, obu jelit ślepych, jelita końcowego. Za pomocą suwmiarki z dokładnością do 0,01 mm zmierzono średnice poszczególnych segmentów jelita, wykonując po trzy pomiary tj. na początku, w środku i na końcu każdego segmentu jelita na podstawie których obliczono średnią wartość pomiaru średnicy danego segmentu jelita. Dodatkowo wyodrębniono i zważono na wadze Medicat M160 (Medicat, Zurich, Szwajcaria) masę organów wewnętrznych: żołądka mięśniowego (bez treści pokarmowej), żołądka gruczołowego (bez treści), wątroby (bez pęcherzyka żółciowego), serca, śledziony, z dokładnością do 0,001 g i obliczono ich procentowy udział w masie ciała przed ubojem.

Po uboju i wypatroszeniu kurcząt brojlerów pobrano próby zbiorcze kału z jelit ślepych od 48 ptaków z podziałem na grupy. W 1 ml kału określono ogólną liczbę grzybów, liczbę bakterii tlenowych, liczbę bakterii kwasu mlekowego. Oznaczenia wykonano w Laboratorium Weterynaryjnych P.U.H. Ladrob w Opolu metodą posiewów ilościowych (posiew na płytki Petriego) zgodnie z polskimi normami.



Fot. 3. Przewód pokarmowy 42-dniowych kurcząt brojlerów Ross 308 (fot. K. Stęczny)

W 42 dniu odchowu według metody podanej przez Driesch [1976] określono wymiary kości udowej i piszczelowej. Suwmiarką elektroniczną z dokładnością do 0,01 mm wykonano następujące pomiary kości udowej: największą długość, przyśrodkową długość, największą szerokość bliższego końca, największą głębokość bliższego końca, najmniejszą szerokość korpusu, największą szerokość dalszego końca, największą głębokość dalszego końca. Wykonano również następujące pomiary kości piszczelowej: największą długość, długość osiową, największą przekątną bliższego końca, najmniejszą szerokość korpusu, najmniejszą szerokość dalszego końca, głębokość dalszego końca. Pomiary jelita i innych ważnych organów wewnętrznych, a także kości nóg wykonano na Wydziale Hodowli i Biologii Zwierząt Uniwersytetu Technologiczno-Przyrodniczego w Bydgoszczy.

W 1, 21 i 42 dniu odchowu pobrano zbiorcze próby paszy, ściółki i wymazów z linii pojenia do oznaczeń mikrobiologicznych. W 1 g paszy oznaczono ogólną liczbę grzybów, ogólną liczbę bakterii tlenowych mezofilnych, natomiast badania w kierunku obecności Salmonelli w 25 g próbie. W 1 g ściółki oznaczono ogólną liczbę grzybów, ogólną liczbę

bakterii tlenowych mezofilnych, *Enterococcus* spp. oraz wykonano badania w kierunku obecności Salmonelli w 25 g próbie. W wymazach z linii pojenia oznaczono ogólną liczbę bakterii tlenowych mezofilnych, bakterii z grupy coli, *Escherichia coli*, *Enterococcus* spp. Oznaczenia mikrobiologiczne wykonano w laboratorium P.U.H. „Ladrob” w Opolu zgodnie z polskimi normami.

Zgromadzone dane liczbowe dotyczące wyników produkcyjnych, wybranych cech anatomicznych, składu tuszki i jakości mięsa porównywanych grup poddano analizie statystycznej. Obliczono średnie arytmetyczne i odchylenie standardowe dla cech produkcyjnych, wydajności rzeźnej i składu tuszki. Dla cech jakości mięsa oraz wybranych cech anatomicznych obliczono średnie arytmetyczne i błąd standardowy średniej – SEM (łącznie dla obu grup). Posługując się dwuczynnikową analizą wariancji określono wpływ preparatów probiotycznych EM i płci na badane cechy anatomiczne i jakości mięsa kurcząt brojlerów w wieku 42 dni. W tym celu użyto następujący model matematyczny:

$$Y_{ijk} = \mu + a_i + b_j + (a \cdot b)_{ij} + e_{ijk} \quad (2)$$

gdzie:

- $Y_{ijk}$  – wartość analizowanej cechy
- $\mu$  – średnia ogólna badanej cechy
- $a_i$  – wpływ i-tej grupy
- $b_j$  – wpływ j-ej płci
- $(a \cdot b)$  – interakcja grupy względem płci
- $e_{ijk}$  – błąd losowy

Obliczenia statystycznie wykonano za pomocą programu komputerowego SAS, wersja 9.4. [SAS Institute Inc, 2013]. Do weryfikacji istotności różnic (na poziomie  $P < 0,05$ ) między porównywanymi grupami i między samcami i samicami użyto testu Tukeya.

### 3.3. WYNIKI

#### 3.3.1. Wyniki produkcyjne

Średnia masa ciała 42-dniowych kurcząt brojlerów Ross 308 z obu grup była duża i przekraczała 2850 g. Większą masą ciała w wieku 42 dni odznaczały się kurczęta doświadczalne niż ptaki kontrolne. Różnica w masie ciała 42-dniowych kurcząt brojlerów z grupy doświadczalnej i kontrolnej nie uzyskała potwierdzenia statystycznego. Spożycie paszy przez 1 ptaka w 42-dniowym odchowie w niniejszym doświadczeniu było większe u kurcząt doświadczalnych (preparaty EM) niż kurcząt kontrolnych, co wpłynęło na wyższe wartości wskaźnika przewartościowania paszy (FCR) u kurcząt poddanych działaniu preparatów probiotycznych (EM). Podczas 42 dni odchovu w grupie kontrolnej padło 214 ptaków, natomiast w grupie doświadczalnej 201 ptaków co stanowiło odpowiednio 2,37% i 2,23% stanu początkowego kurcząt. Od 22 dnia odchovu stwierdzono zwiększenie przeżywalności kurcząt w grupie doświadczalnej (tabela 4, artykuł 1).

#### 3.3.2. Wartość rzeźna

Porównywane grupy kurcząt brojlerów nie różniły się ( $P>0.05$ ) pod względem średniej masy ciała, masy tuszki i wydajności rzeźnej w wieku 42 dni. Kurczęta brojlery poddane działaniu preparatów probiotycznych (EM) miały większą masę ciała i masę tuszki w wieku 42 dni. Ptaki doświadczalne obojga płci miały natomiast mniejszą wydajność rzeźną (o 0,1%) niż kurczęta kontrolne.

Tuszki pozyskane od 42-dniowych kurcząt Ross 308 obojga płci u których stosowano lub nie stosowano wieloskładnikowych preparatów probiotycznych Pro-Biotyk (Em-15) i EmFarma<sup>TM</sup> zawierających bakterie *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Lactococcus* spp., *Streptococcus thermophilus*, *Bacillus subtilis*, *Rhodopseudomonas* spp. i drożdże *Saccharomyces cerevisiae* nie różniły się pod względem udziału (%) składników tuszki wyodrębnionych podczas dysekcji. Tuszki ptaków obojga płci z grupy doświadczalnej cechowały się mniejszą ( $P>0.05$ ) procentową zawartością mięśni piersiowych, mięśni nóg, tłuszczu sadełkowego i szyi, natomiast większym udziałem (%) skóry z tłuszczem podskórnym, skrzydeł i pozostałości w porównaniu z tuszkami kurcząt kontrolnych (tabela 5, artykuł 1).

#### 3.3.3. Skażenie mikrobiologiczne fermy

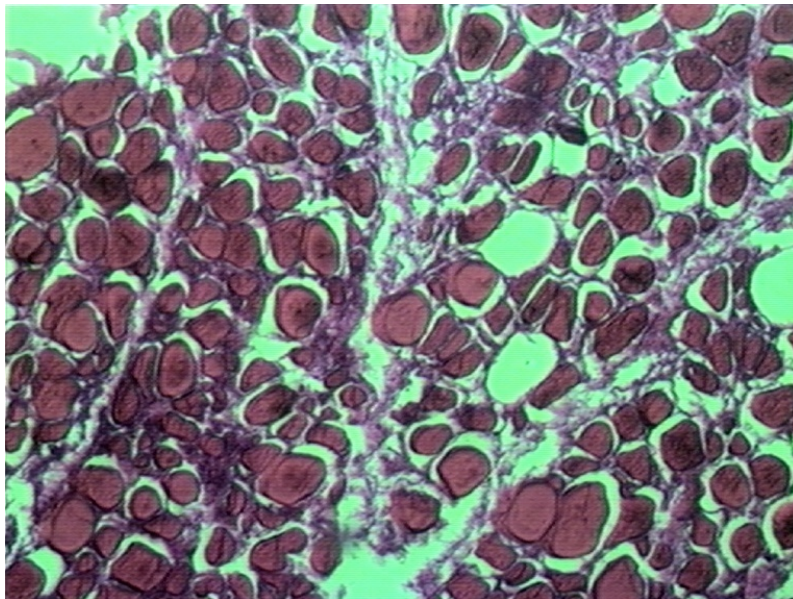
Wyniki oznaczeń mikrobiologicznych paszy, ściółki i linii pojenia zestawiono w tabeli 6 (artykuł 1). Analiza niniejszych wyników wskazuje na zmniejszenie w 1 dniu odchovu piskląt ogólnej liczby grzybów i ogólnej liczby bakterii tlenowych mezofilnych w 1 g paszy lub ściółki po rozpylaniu preparatów Pro-Biotyk (Em-15) i EmFarma<sup>TM</sup> w trakcie przygotowywania budynku drobiarskiego do zasiedlenia pisklętami. W kolejnych ocenach po pobraniu prób paszy i ściółki w 21 i 42 dniu odchovu stwierdzono zwykle większą liczbę w/w mikroorganizmów w grupie doświadczalnej. Stosowanie preparatów EM wpłynęło na redukcję liczby bakterii *Enterococcus* spp. w 1 g ściółki do 21 dnia odchovu. Rozpylanie preparatów probiotycznych wpłynęło na zmniejszenie liczby bakterii z grupy coli i zwiększenie liczby bakterii tlenowych mezofilnych na liniach pojenia. Nie wykazano obecności bakterii Salmonelli w paszy i ściółce w trakcie oznaczeń prób pobranych w 21 dniu odchovu.

### 3.3.4. Jakość mięsa

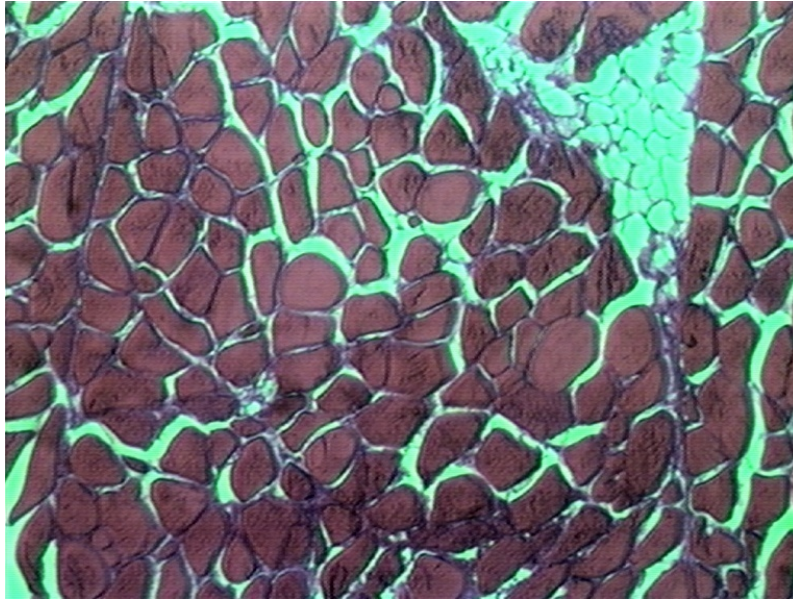
Wyniki oznaczeń składu chemicznego mięsa wskazują, że porównywane grupy kurcząt brojlerów Ross 308 różniły się ( $P < 0,05$ ) jedynie pod względem zawartości wody i tłuszczu w mięśniach nóg. Kurczęta kontrolne miały więcej wody i tłuszczu w mięśniach nóg w porównaniu z kurczętami otrzymującymi preparaty probiotyczne EM. W mięśniach nóg samców stwierdzono istotnie ( $P < 0,05$ ) większą zawartość tłuszczu niż w mięśniach nóg samic. Interakcja grupa a płeć była istotna dla zawartości wody, białka i tłuszczu w mięśniach nóg (tabela 3, artykuł 2).

Aplikacja preparatów probiotycznych EM w odchowie kurcząt brojlerów Ross 308 nie miała istotnego wpływu ( $P > 0,05$ ) na badane cechy fizykochemiczne mięśni piersiowych i nóg, z wyjątkiem  $pH_{24}$  mięśni nóg. Bez względu na grupę, mięśnie piersiowe samców miały niższe natężenie barwy żółtej ( $b^*$ ) w porównaniu z samicami. Interakcja grupa a płeć była istotna dla przewodności elektrycznej ( $EC_{24}$ ) mięśni nóg (tabela 4, artykuł 2).

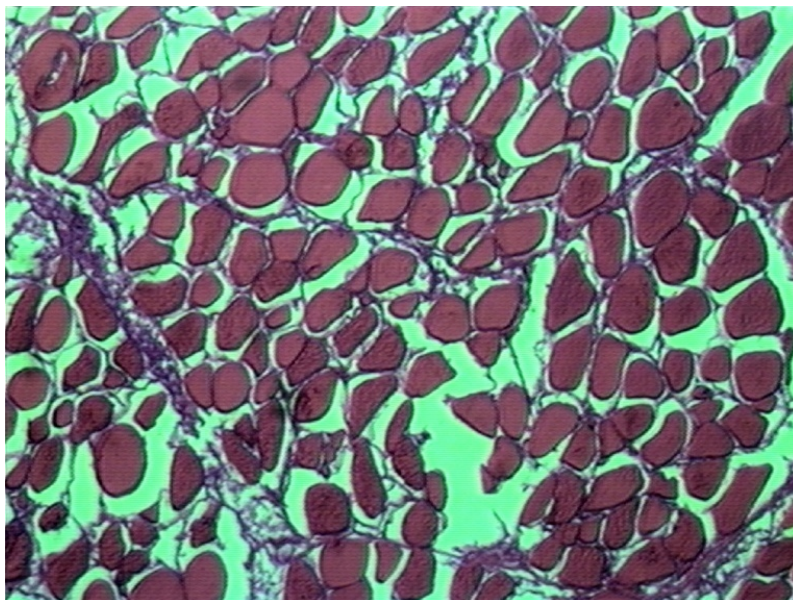
W wieku 42 dni, kurczęta otrzymujące preparaty probiotyczne EM miały istotnie ( $P < 0,05$ ) gorszą kruchość (wyższa maksymalna siła cięcia) mięśnia piersiowego większego po obróbce termicznej w porównaniu z ptakami kontrolnymi. Bez względu na sposób traktowania, mięsień piersiowy większy samców (po obróbce termicznej) miał istotnie większą sprężystość i zuwalność niż mięsień piersiowy samic. Interakcja grupa a płeć dla cech tekstury mięśnia piersiowego większego była nieistotna (tabela 5, artykuł 2).



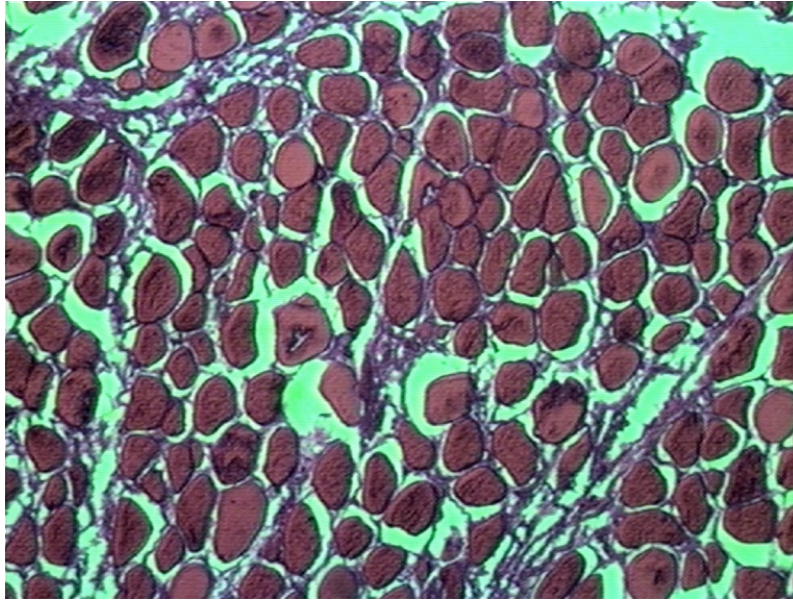
Fot. 4. Przekrój poprzeczny mięśnia piersiowego większego koguta z grupy kontrolnej (powiększenie 100x)



Fot. 5. Przekrój poprzeczny mięśnia piersiowego większego kury z grupy kontrolnej (powiększenie 100x)



Fot. 6. Przekrój poprzeczny mięśnia piersiowego większego koguta z grupy doświadczalnej (powiększenie 100x)



Fot. 7. Przekrój poprzeczny mięśnia piersiowego większego kury z grupy doświadczalnej (powiększenie 100x)

Analiza danych zawartych w tabeli 6 (artykuł 2) wskazuje, że wpływ grupy, płci i interakcja grupa a płeć nie były istotne ( $P > 0,05$ ) dla intensywności i pożądalności zapachu i smakowitości oraz soczystości i kruchości mięśnia piersiowego większego po obróbce termicznej. Mięśnie piersiowe kurcząt (średnio dla samców i samic) otrzymujących preparaty EM uzyskały niższe noty intensywności i pożądalności zapachu, soczystości, kruchości, intensywności i pożądalności smakowitości w porównaniu z kurczętami kontrolnymi (tabela 6, artykuł 2).

Stosowanie probiotyków EM nie miało istotnego ( $P > 0,05$ ) wpływu na pole przekroju poprzecznego, obwód i średnicę włókna mięśniowego, stosunek średnicy horyzontalnej do średnicy wertykalnej oraz grubość *perimysium* (tkanki łącznej otaczającej wiązkę włókien mięśniowych) i *endomysium* (tkanki łącznej otaczającej pojedyncze włókno mięśniowe) mięśnia piersiowego większego. Samce miały istotnie ( $P < 0,05$ ) mniejsze pole przekroju poprzecznego włókna mięśniowego *m. pectoralis major* i istotnie mniejszy obwód i średnicę horyzontalną włókna mięśniowego w porównaniu z samicami. Interakcje grupa a płeć dla cech mikrostruktury mięśnia piersiowego większego nie były istotne statystycznie (tabela 7, artykuł 2).

### 3.3.5. Cechy anatomiczne

Analiza danych zawartych w tabeli 4 (artykuł 3) wskazuje, że stosowanie preparatów probiotycznych EM miało istotny wpływ na całkowitą długość jelita oraz stosunek długości jelita do długości ciała. W grupie doświadczalnej stwierdzono istotnie ( $P < 0,05$ ) większe wartości całkowitej długości jelita, proporcji długości jelita do długości ciała. Stosowanie preparatów probiotycznych EM nie miało istotnego wpływu na masę i długość ciała. Samce miały istotnie większą masę ciała, całkowitą długość jelita, wielkość proporcji długości jelita do długości ciała niż samice.

Wyniki badań własnych wskazują na brak istotnego wpływu użycia preparatów probiotycznych EM na długość i średnicę poszczególnych segmentów jelita. U samców kontrolnych stwierdzono istotnie większą długość poszczególnych segmentów jelita



ciemnego i średnicę jelita czczego oraz istotnie mniejszą średnicę dwunastnicy w porównaniu z samicami. W grupie doświadczalnej samce miały istotnie dłuższą dwunastnicę i jelito czcze oraz istotnie mniejszą średnicę dwunastnicy a większą średnicę jelita czczego i jelita biodrowego w porównaniu z samicami. Nie stwierdzono istotnych interakcji grupa a płeć dla długości i średnicy poszczególnych segmentów jelita (tabele 5 i 6, artykuł 3).

Stosowanie preparatów probiotycznych EM nie miało istotnego wpływu na masę i procentową zawartość wątroby, serca, żołądka mięśniowego i śledziony oraz masę żołądka gruczołowego 42-dniowych kurcząt. Istotny wpływ preparatów probiotycznych EM stwierdzono dla procentowej zawartości żołądka gruczołowego. Bez względu na grupę samce odznaczały się istotnie ( $P < 0,05$ ) większą masą śledziony i mniejszą procentową zawartością wątroby w masie ciała w porównaniu z samicami. Interakcja grupa a płeć nie była istotna dla masy i udziału (%) w ciele badanych organów wewnętrznych (tabela 7 i 8, artykuł 3)

Stosowanie preparatów probiotycznych EM w odchowie kurcząt brojlerów nie miało istotnego wpływu na ocenione wymiary kości udowej i piszczelowej (tabele 9 i 10, artykuł 3). Kości udowe samców cechowały się istotnie większą największą i przyśrodkową długością, największą szerokością bliższego i dalszego końca kości oraz najmniejszą szerokością korpusu w porównaniu z kośćmi udowymi samic. Oznaczone wymiary kości piszczelowej były istotnie większe u samców niż u samic, z wyjątkiem wymiaru najmniejszej szerokości dystalnego końca kości piszczelowej. Interakcje grupa a płeć były istotne dla najmniejszej szerokości korpusu kości udowej oraz największej długości przekątnej bliższego końca kości piszczelowej, najmniejszej szerokości korpusu i końca dystalnego kości piszczelowej.

### **3.3.6. Mikroflora jelit ślepych**

Wyniki oznaczeń mikrobiologicznych kału z jelit ślepych zestawiono w tabeli 11 (artykuł 3). Analiza uzyskanych wyników wskazuje na zmniejszenie liczby bakterii tlenowych i pałeczek kwasu mlekowego oraz zwiększenie ogólnej liczby grzybów w kale jelit ślepych 42-dniowych kurcząt po aplikacji preparatów probiotycznych EM w okresie odchovu.

### 3.4. DYSKUSJA

Przeprowadzone badania dostarczyły informacji o skuteczności działania preparatów probiotycznych Pro-Biotyk Em-15 i EMFarma™ na wyniki produkcyjne, wybrane cechy anatomiczne, skład tuszki i jakość mięsa kurcząt brojlerów oraz zanieczyszczenie mikrobiologiczne komercyjnej fermy drobiu w ramach prowadzonej działalności rolniczej.

Średnia masa ciała kurcząt brojlerów w wieku 42 dni z porównywanych grup przekraczała 3100 g u samców i 2600 g u samic, co może świadczyć o ich prawidłowym rozwoju wynikającym z założeń genetycznych, odpowiednich parametrów mikroklimatu i dobrej jakości podawanych pasz. Kurczęta brojlery Ross 308 otrzymujące preparaty probiotyczne EM miały nieistotnie większą masę ciała w wieku 42 dni niż kurczęta kontrolne – bez stosowania preparatów probiotycznych. Uzyskane wyniki są zgodne z wynikami badań Mutuş i in. [2006], Olnood i in. [2015] i Malik i in. [2016] którzy nie odnotowali istotnego statystycznie wpływu stosowania probiotyku na masę ciała kurcząt brojlerów w 35 lub 42 dniu odchowu. Masa ciała 42-dniowych kurcząt brojlerów w badaniach własnych była większa niż w doświadczeniu Radu-Rusu i in. [2008], Marcu i in. [2012] oraz Malik i in. [2016]. Mniejszą masę ciała kurcząt brojlerów Ross 308 w wieku 42 dni niż w badaniach własnych stwierdzili także Biesiada-Drzazga i in. [2011] oraz Kokoszyński i in. [2013]. W obu grupach płeć badanych ptaków miała istotny wpływ na masę ciała kurcząt w wieku 42 dni. Samce kontrolne ważyły o 507 g (16,3%) więcej niż samice tej grupy, natomiast samce doświadczalne więcej o 510 g (16,3%) niż samice.

Song [2014] stwierdził istotne zwiększenie przyrostów masy ciała kurcząt brojlerów po podaniu probiotyku zawierającego bakterie z rodzaju *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* i *Clostridium*. Korzystne działanie stosowania probiotyków jako dodatków paszowych na przyrosty masy ciała stwierdzili także Apata [2008] oraz Jouybari i in. [2009]. Przeciwnie wyniki badań – brak korzystnego działania uzyskali natomiast m.in. Opaliński i in. [2007] oraz Yusefi i Karkoodi [2007]. Bai i in. [2013] stwierdzili istotne zwiększenie średnich dobowych przyrostów masy ciała i wykorzystania paszy u samców kurcząt brojlerów Cobb. Ci sami autorzy nie stwierdzili istotnych różnic w wynikach produkcyjnych między 22 a 42 dniem życia. Endo i Nakano [1999] stwierdzili istotną większą masę ciała w wieku 49 dni i poprawę przewartościowania paszy u samców, natomiast mniejszą masę ciała i gorsze przewartościowanie paszy u samic w badaniach nad wpływem stosowania wieloskładnikowych probiotyków zawierających bakterie *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Clostridium* oraz drożdże *Saccharomyces* *Candida* w odchowu kurcząt brojlerów.

Wyższą śmiertelność kurcząt w okresie odchowu (4,2-5,0%) aniżeli w badaniach własnych stwierdzono w stadach kurcząt brojlerów objętych urzędową oceną użyteczności w Polsce w 2016 r. [Wencek i in., 2017]. Z kolei Adamski i in. [2004] stwierdzili większy odsetek padłych kurcząt brojlerów Hybro G i Hybro N wynoszącą 7,4 i 8,6% do 49 dnia odchowu. Pelicia i in. [2004] stwierdzili natomiast większą przeżywalność kurcząt brojlerów otrzymujących mieszankę probiotyków i prebiotyków zawierających bakterie (2,23%) w porównaniu z ptakami kontrolnymi (8,51%), otrzymującymi mieszankę probiotyku i prebiotyków zawierającą drożdże (5,50%) oraz mieszanką probiotyku i prebiotyków zawierającą bakterie i drożdże (4,88%) do 35 dnia odchowu kurcząt ISA S7570-N przeznaczonych do produkcji w systemie Label Rouge.

Porównywane grupy kurcząt cechowały się wysoką wydajnością rzeźną wynoszącą powyżej 73%. Zbliżoną, wysoką wydajność rzeźną (73,6%) u 42-dniowych kurcząt Ross 308 stwierdzili Milczarek i in. [2015]. W przeszłości uzyskiwano zróżnicowane często przeciwstawne wyniki badań dotyczące wpływu stosowania probiotyków na skład tuszki. Ashayerizadeh i in. [2009] stwierdzili istotne zwiększenie udziału piersi i nóg (elementy

kulinarne) i redukcję udziału tłuszczu sadelkowego w masie ciała 42-dniowych kurcząt brojlerów po podaniu probiotyku Primalac w ilości 900 g/tonę mieszanki paszowej w porównaniu z ptakami kontrolnymi żywionymi tylko mieszankami paszowymi, co nie znalazło potwierdzenia w wynikach badań własnych. Pelicia i in. [2004] uzyskali natomiast zbliżoną procentową zawartość mięsa z piersi i nóg oraz nieistotnie większą zawartość tłuszczu sadelkowego w tuszkach 84-dniowych kurcząt utrzymywanych w systemie free-range po podaniu mieszaniny probiotyku i prebiotyku zawierającej bakterie i drożdże.

Wyniki badań własnych wskazują na brak istotnego oddziaływania probiotyków EM na zawartość wody, białka i tłuszczu w mięśniach piersiowych. Kurczęta doświadczalne otrzymujące preparaty probiotyczne EM miały jednak istotnie mniej wody i tłuszczu w mięśniach nóg niż ptaki kontrolne. Inatomi [2015] stwierdził, że podawanie probiotyków zawierających *Bacillus mesentericus*, *Clostridium butyricum*, *Streptococcus faecalis* nie miało istotnego wpływu na zawartość wody, białka i popiołu w mięśniach piersiowych i nóg kurcząt Cobb 500 w wieku 49 dni. W badaniach tych wykazano jednak zmniejszenie zawartości tłuszczu w mięśniach piersiowych i nóg. W innych eksperymentach [Abdulla i in., 2017; Král i in., 2013] stwierdzono istotną redukcję zawartości tłuszczu w mięśniach piersiowych kurcząt brojlerów, co nie znalazło potwierdzenia w wynikach naszej oceny. Istotna redukcja tłuszczu w mięsie wpływa na poprawę jego wartości dietetycznej, co jest cechą pożądaną dla konsumentów większości rejonów świata. Z drugiej strony większa zawartość tłuszczu śródmięśniowego poprawia smakowitość i kruchość mięsa [Chartrin i in., 2006]. Zhou i in. [2010] donoszą o braku wpływu probiotyku na zawartość wody, białka, tłuszczu surowego, popiołu surowego w mięśniach piersiowych 90-dniowych kurcząt Guangxi Yellow.

W naszej ocenie, podawanie preparatów probiotycznych EM zawierających *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Lactococcus spp.*, *Streptococcus thermophilus*, *Bacillus subtilis*, *Rhodopseudomonas spp.* i drożdży *Saccharomyces cerevisie* nie miało istotnego wpływu na wartości cech fizykochemicznych ( $pH_{24}$ ,  $EC_{24}$ , swobodny wyciek soku z mięsa, wyciek termiczny, zmienne barwy  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ) mięśni piersiowych i nóg, z wyjątkiem  $pH_{24}$  mięśni nóg. Pelicano i in. [2003] stwierdzili istotny wpływ probiotyku podawanego do wody na jasność barwy mięśni piersiowych kurcząt brojlerów Cobb 500 w wieku 45 dni. W tym samym doświadczeniu stwierdzono jednak brak istotnego wpływu podawania do paszy probiotyku na wartości zmiennych barwy  $L^*$  (jasność barwy),  $a^*$  (natężenie barwy czerwonej),  $b^*$  (natężenie barwy żółtej) mięśni piersiowych 45-dniowych kurcząt Cobb 500. Z kolei Park i Kim [2014] tak samo jak w naszej ocenie nie wykazali istotnego wpływu probiotyku na wartości zmiennych  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  mięśni piersiowych.

W badaniach Zhou i in. [2010] nie stwierdzono wpływu stosowania probiotyku na odczyn (pH) mięśni piersi 90-dniowych kurcząt Guangxi Yellow, natomiast w doświadczeniu Pelicia i in. [2004] brak istotnego wpływu stosowania probiotyków i prebiotyku zawierających drożdże lub bakterie na pH mięśni piersiowych i nóg 84-dniowych kurcząt brojlerów utrzymywanych w systemie free-range. Abdulla i in. [2017] donoszą jednak o istotnie wyższych wartościach jasności barwy ( $L^*$ ), natężenia barwy czerwonej ( $a^*$ ) i natężenia barwy żółtej ( $b^*$ ) mięśni piersiowych kurcząt Cobb 500 w wieku 42 dni u których stosowano probiotyk w okresie odchowu niż u ptaków kontrolnych. Ci sami autorzy donoszą o istotnym zmniejszeniu swobodnego wycieku soku i wycieku termicznego mięśni piersiowych kurcząt Cobb 500 w wieku 42 dni którym podawano probiotyk, co nie znalazło potwierdzenia w wynikach naszej oceny. W doświadczeniu Park i Kim [2014] stwierdzono natomiast istotne zwiększenie wodochłonności i istotną redukcję swobodnego wycieku soku z prób mięsa po 1-dniowym przechowywaniu wraz ze zwiększeniem koncentracji probiotyku zawierającego *Bacillus subtilis* B2A. Istotne zmniejszenie swobodnego wycieku soku z mięśni piersiowych kurcząt Guangxi Yellow w wieku 90 dni otrzymujących *Bacillus coagulans* odnotowali także Zhou i in. [2010]. Z kolei w badaniach Palicano i in. [2003] nie

stwierdzili istotnego wpływu podawania probiotyku zawierającego bakterie *Bacillus subtilis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* i drożdże *Saccharomyces cerevisiae* na wodochłonność i wyciek termiczny mięsa, natomiast Pelicia i in. [2004] brak istotnego wpływu podawania mieszaniny probiotyku i prebiotyku zawierającej bakterie i drożdże na wyciek termiczny mięśni piersiowych 84-dniowych kurcząt brojlerów utrzymywanych w systemie free-range.

Wyniki niniejszej oceny wskazują na istotne pogorszenie kruchości (wyrażonego istotnie wyższą wartością maksymalnej siły cięcia) mięśni piersiowych 42-dniowych kurcząt Ross 308 otrzymujących preparaty EM do wody plus zraszania powietrza, paszy i linii pojenia. W innym doświadczeniu [Abdulla i in., 2017] nie stwierdzono istotnego wpływu stosowania probiotyku na kruchość mięśni piersiowych 42-dniowych kurcząt Cobb 500. Z drugiej strony Zhou i in. [2010] donoszą o istotnym pogorszeniu kruchości mięsa 90-dniowych kurcząt Guangxi Yellow przy stosowaniu *Bacillus coagulans*, co jest zgodne z wynikami naszej oceny. Pelicano i in. [2003] wykazali natomiast brak istotnego wpływu podawania różnych probiotyków do wody na tętno mięśni piersiowych kurcząt brojlerów Cobb w wieku 45 dni oraz istotnie wyższe wartości dla smaku i ogólnej akceptowalności. Podawanie probiotyków do paszy nie miało natomiast istotnego wpływu na smak, teksturę, preferencje, ogólną akceptowalność gotowanych mięśni piersiowych kurcząt brojlerów Cobb.

W badaniach własnych, podawanie preparatów probiotycznych EM nie wywarła istotnego wpływu na cechy sensoryczne mięśni piersiowych poddanych obróbce termicznej ocenianych przez wytrenowanych sędziów. Z kolei Loddi i in. [2000] nie stwierdzili istotnego wpływu stosowania probiotyku, mieszanki probiotyk i antybiotyk, oraz antybiotyku na intensywność i siłę zapachu, smak, siłę smaku, kruchość, soczystość, akceptowalność i całkowitą ocenę mięśni piersiowych 42-dniowych kurcząt Ross w porównaniu z kurczętami kontrolnymi.

Stosowanie preparatów probiotycznych EM miało istotny wpływ na całkowitą długość jelita oraz proporcję długości jelita do długości ciała. We wcześniejszym doświadczeniu, Kokoszyński i in. [2017] stwierdzili mniejszą całkowitą długość jelita (251,4 cm) u kurcząt Ross 308 w wieku 42 dni, natomiast Gabriel i in. [2008] krótsze jelito cienkie u 44-dniowych samców Ross PM3. W badaniach własnych nie wykazano istotnego wpływu preparatów probiotycznych EM na długość i średnicę poszczególnych segmentów jelita. W badaniach Sato i in. [2002] także nie stwierdzono istotnego wpływu dodatku probiotyku do diety kurcząt brojlerów na długość i procentowy udział jelita. Pelicia i in. [2004] nie stwierdzili istotnych różnic w zakresie długości poszczególnych segmentów jelita cienkiego (dwunastnicy, jelita czczego i jelita biodrowego) oraz ich masy w stosunku do masy ciała 84-dniowych kurcząt brojlerów utrzymywanych w systemie free-range pod wpływem stosowania mieszaniny probiotyku i prebiotyku zawierających bakterie i drożdże.

Stosowanie preparatów probiotycznych EM w badaniach własnych nie miało istotnego wpływu na masę i procentowy udział wątroby, serca, żołądka mięśniowego i śledziony oraz masę żołądka gruczołowego. We wcześniejszej ocenie [Malik i in., 2016] nie stwierdzono istotnego wpływu stosowania komercyjnych probiotyków zawierających *Bacillus subtilis* na procentowy udział wątroby, żołądka gruczołowego, serca, śledziony, jelita, tłuszczu sadełkowego u 42-dniowych kurcząt brojlerów. Z kolei Mahajan i in. [1999] stwierdzili istotnie większą zawartość podrobów w ciele kurcząt brojlerów otrzymujących probiotyk. W doświadczeniu Kokoszyńskiego i in. [2017] stwierdzono mniejszy procentowy udział wątroby, serca, żołądka gruczołowego i śledziony, natomiast większy żołądka mięśniowego masy ciała 42-dniowych kurcząt Ross 308 w porównaniu z wynikami niniejszego eksperymentu. Większy procentowy udział wątroby w masie ciała kurcząt niż w badaniach własnych stwierdzili także Hernandez i in. [2004], Sarifi i in. [2012] oraz Hossain i in. [2012].

### 3.5. PODSUMOWANIE WYNIKÓW I WNIOSKI

Podawanie preparatów probiotycznych EM nie miało istotnego wpływu na średnią masę ciała kurcząt brojlerów Ross 308 w wieku 42 dni, spożycie i zużycie paszy oraz przeżywalność ptaków w okresie odchowu. Od 22 dnia odchowu kurcząt stwierdzono zmniejszenie liczby padłych kurcząt w grupie doświadczalnej.

Tuszki kurcząt z grupy doświadczalnej cechowały się nieistotnie mniejszą procentową zawartością mięśni piersiowych, mięśni nóg, tłuszczu sadelkowego i szyi, natomiast większą zawartością (%) skóry z tłuszczem podskórnym, skrzydeł i pozostałości tuszki.

Użycie preparatów probiotycznych EM w trakcie przygotowywania budynku drobiarskiego do zasiedlenia pisklętami spowodowało zmniejszenie w 1 dniu odchowu piskląt ogólnej liczby grzybów i ogólnej liczby bakterii tlenowych mezofilnych w 1 g paszy lub ściółki. W kolejnych ocenach po pobraniu prób paszy i ściółki w 21 i 42 dniu odchowu stwierdzono zwykle większą liczbę w/w mikroorganizmów w grupie doświadczalnej.

Mięśnie piersiowe kurcząt otrzymujących preparaty probiotyczne EM miały gorszą kruchość, natomiast mięśnie nóg większą zawartość wody i tłuszczu oraz wyższe pH 24 godziny od uboju. Większy wpływ na jakość mięsa miała płeć ptaków. Mięśnie piersiowe samców po obróbce termicznej odznaczały się istotnie większą sprężystością i żuwalnością niż mięśnie piersiowe samic. Stwierdzono istotnie mniejsze pole przekroju poprzecznego oraz istotnie mniejszy obwód i średnicę horyzontalną włókien mięśniowych mięśnia piersiowego większego samców w porównaniu z mięśniami samic. Mięśnie nóg samców zawierały istotnie więcej tłuszczu niż mięśnie nóg samic.

Stosowanie preparatów probiotycznych EM w odchowu kurcząt brojlerów Ross 308 miało istotny wpływ na całkowitą długość jelit, stosunek długości jelita do długości ciała. Długości i średnice poszczególnych segmentów jelita, a także masa i procentowa zawartości serca, żołądka mięśniowego, wątroby i śledziony oraz masa żołądka gruczołowego 42-dniowych kurcząt brojlerów z grupy doświadczalnej i kontrolnej były zbliżone, a różnice statystycznie nieistotne. Procentowa zawartość żołądka gruczołowego była istotnie większa w grupie doświadczalnej. Podawanie preparatów probiotycznych EM nie miało istotnego wpływu na wymiary kości udowej i piszczelowej 42-dniowych kurcząt Ross 308.

Podsumowując uzyskane wyniki badań można sformułować następujące wnioski:

- Wykazano małą efektywność stosowania preparatów probiotycznych Pro-Biotyk Em-15 i EMFarma<sup>TM</sup> na wyniki produkcyjne kurcząt brojlerów. Podawanie preparatów EM wpłynęło niekorzystnie na skład tuszki. Nastąpiło zmniejszenie zawartości mięśni piersiowych i nóg przy zwiększeniu zawartości skóry z tłuszczem podskórnym co należy uznać za zjawisko niekorzystne dla konsumentów mięsa kurczęcego. Aplikacja preparatów Pro-Biotyk Em-15 i EMFarma<sup>TM</sup> nie miała istotnego wpływu na większość cech jakości mięsa i cechy biometryczne układu pokarmowego i kości nóg. Stwierdzono natomiast przydatność badanych preparatów probiotycznych EM do dezynfekcji pomieszczeń drobiarskich przygotowywanych do wstawienia nowej stawki drobiu.
- Niniejsze badania powinny być kontynuowane w przyszłości z uwagi na nieliczne opracowania naukowe dotyczące efektywności stosowania preparatów EM na wyniki produkcyjne, wybrane cechy anatomiczne, skład tuszki i jakość mięsa kurcząt brojlerów w warunkach praktyki rolniczej oraz zanieczyszczenie mikrobiologiczne komercyjnej fermy do odchowu kurcząt.

### 3.6. LITERATURA

- [1] Abdelqader A., Al-Fataftah A. R., Daş G., 2013. Effects of dietary *Bacillus subtilis* and inulin supplementation on performance, eggshell quality, intestinal morphology and microflora composition of laying hens in the late phase of production. *Anim. Feed Sci. Technol.* 179(1), 103-111.
- [2] Abdulla N.R., Zamri A.N.M., Sabow A.B., Kareem K.Y., Nurhazirah S., Ling F.H., Sazili A.Q., Loh T.C., 2017. Physico-chemical properties of breast muscle in broiler chickens fed probiotics, antibiotics or antibiotic-probiotic mix. *J. Appl. Anim. Res.* 45, 64-70.
- [3] Adamski M., Kuźniacka J., Bernacki Z., 2004. Influence of sex on slaughter yield and tissue composition of chicken broiler carcasses reared under production conditions. *Zesz. Nauk. ATR Bydgoszcz, Zootechnika* 34, 107-114.
- [4] Ali F. H. M., 2010. Probiotics - feed supplement to improve quality of broiler chicken carcasses. *J. Dairy Foods Home Sci.* 5(1), 93-99.
- [5] Anonim, 2004. Anti – fog masterbatches for food packaging, “Plastics Additives and Compounding, Applications”, November/December, 14.
- [6] Apata D.F., 2008. Growth performance, nutrient digestibility and immune response of broiler chicks fed diets supplemented with a culture of *Lactobacillus bulgaricus*. *J. Sci. Food Agr.* 88(7), 1253-1258.
- [7] Apata D.F., 2009. Antibiotic resistance in poultry. *Int. J. Poult. Sci.* 8 (4), 404-408.
- [8] Ashayerizadeh A., Dabiri N., Ashayerizadeh O., Mirzadeh K.H., Roshanfekar H., Mamooee M., 2009. Effect of dietary antibiotic, probiotic and prebiotic as growth promoters, on growth performance, carcass characteristics and hematological indices of broiler chickens. *PJBS* 12(1), 52-57.
- [9] Augustyniak A., Nawrotek P., 2014. Probiotyki w żywieniu zwierząt hodowlanych - zastosowanie, działanie, zagrożenia. *Prze. Hod.* 1, 20-22.
- [10] Babazadeh D., Vahdatpour T., Nikpiran H., Jafargholipour M.A., Vahdatpour S., 2011. Effects of probiotic, prebiotic and synbiotic intake on blond enzymes and performance of Japanese quails (*Coturnix japonica*). *Indian J. Anim. Sci.* 81(8), 870-874.
- [11] Bai S.P., Wu A.M., Ding X.M., Lei Y., Bai J., Zhang K.Y., Chio JS., 2013. Effects of probiotic-supplemented diets on growth performance and intestinal immune characteristics of broiler chickens. *Poult. Sci.* 92, 663-670.
- [12] Baryłko-Pikielna N., Matuszewska I., 2009. Sensoryczne badania żywności. *Wyd. Naukowe PTTŻ Kraków*, 367.
- [13] Bączkowska H., Ślusarz A., 1987. Żywienie drobiu. *PWRiL, Warszawa*, 400.
- [14] Bernacki Z., Wojciechowski J., 2002. Czynniki wpływające na efektywność produkcji drobiarskiej, *Broszury upowszechnieniowe*, wyd. ODR Minikowo, 1-29.
- [15] Biesiada-Drzazga B., Janocha A., Bombik T., Rojek A., Brodzik U., 2011. Evaluation of the growth and slaughter value of the Ross 308 broiler chickens. *Acta Sci. Pol., Zootechnica* 10(3), 11-20.
- [16] Bourne M.C., 1982. Food texture and viscosity concept and measurement. *New York, Acad. Press INC*, 2-16, 182.
- [17] Bozkurt M., Küçükyılmaz V. A., Çabuk M., Çatli A. U., 2011. Performance of layer or broiler breeder hens varies in response to different probiotic preparations. *Ital. J. Anim. Sci.* 10 (31), 162-169.
- [18] Burck, H.C., 1975. Technika histologiczna, *PZWL Warszawa*. 62-140.
- [19] Chartrin P., Méteau K., Juin H., Bernadet M.D., Guy G., Larzul C., Rémignon H., Mourot J., Duclos M.J., Baéza E., 2006. Effects of intermuscular fat levels on sensory characteristics of duck breast meat. *Poult. Sci.* 85, 914-922.
- [20] Chaveerach, P., Keuzenkamp D. A., Lipman L. J. A., Van Knapen F., 2004. Effect of organic acids in drinking water for young broilers, on *Campylobacter* infection, volatile fatty acid production, gut microflora and histological cell changes. *Poult. Sci.* 83, 330-334.

- [21] CIE., 1976. Commission Internationale de l'Eclairage. CIELab Colour System. France (FR): CIE Publication.
- [22] Cook M. E., 2000. Skeletal deformities and their causes: introduction. *Poult. Sci.* 79(7), 982-984.
- [23] De Castro Burbarelli M.F., do Valle Polycarpo G., Deliberali Lelis K., Granghelli C.A., de Pinho A.C.C., Queiroz S.R.A., Fernandes A.M., de Souza R.L.M., Moro M.E.G., de Andrade Bordin R., de Albuquerque R., 2017. Cleaning and disinfection programs against *Campylobacter jejuni* for broiler chickens: productive performance, microbiological assessment and characterization. *Poult. Sci.* 96, 3188-3198.
- [24] Driesch A., 1976. A guide to the measurement of animal bone from archeological sites. *Peabody Museum Bulletin 1*. Peabody Museum of Archeology, and Ethology University of Harvard, 138 pp.
- [25] Elminowska-Wenda G., 2007. Mikrostruktura mięśni szkieletowych drobiu i świń w zależności od wybranych czynników genetycznych i żywnościowych. *Rozprawy 126*, UTP Bydgoszcz.
- [26] Endo T., Nakano M., 1999. Influence of a probiotic on productivity, meat components, lipid metabolism, caecal flora and metabolites, and raising environment in broiler production. *Anim. Sci. J.* 70(4), 207-218.
- [27] Ezema C., Chukwuemeka E., 2012. Determination of the effect of probiotic (*Saccharomyces cerevisiae*) on growth performance and hematological parameters of rabbits. *Comp. Clin. Path.* 21(1), 73-76.
- [28] Fallah R., Kiani A., Azarfar A., 2013. A review of the role of five kinds of alternatives to feed antibiotics in broiler production. *J. Vet. Med. Anim. Health.* 5(11), 317-321.
- [29] FAOSTAT., 2019. Livestock primary, production quantity, poultry meat, 2017. Rome (IT). FAO Wydawnictwo. [dostęp 25.04.2020 r.]. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QL>.
- [30] Fletcher D.L., 2002. Poultry meat quality. *World's Poult. Sci. J.* 58, 131-145.
- [31] Gacka M., 2013. Pożyteczne Mikroorganizmy ProBio Emy. Wyd. Stowarzyszenie Ekosystem-Dziedzictwo Natury, 68.
- [32] Gabriel I., Mallet S., Leconte M., Travel A., Lalles J.P., 2008. Effects of whole wheat feeding on the development of the digestive tract of broiler chickens. *Anim. Feed Sci. Technol.* 142, 144-162.
- [33] Guarner F., Malagelada J.R., 2003. Gut flora in health and disease. *Lancet*, 361, 512-519.
- [34] Gibson G.R., Roberfroid M.B., 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.* 125, 1401-1412.
- [35] Hernandez T., Madrid J., Garcia V., Orengo J., Megias M.D., 2004. Influence of two plant extracts on broilers performance, digestibility, and digestive organ size. *Poult. Sci.* 83, 169-197.
- [36] Hossain E.M.D., Kim G.M., Lee S.K., Yang C.J., 2012. Growth performance, meat quality, oxidative stability and fatty acid composition of meat from broilers fed diets supplemented with a medicinal plant and probiotics. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 25, 1159-1168.
- [37] Humphrey T., O'Brien S., Madsen M., 2007. *Campylobacters* as zoonotic pathogens: a food production perspective. *Int. J. Food Microbiol.*, 117, 237-257.
- [38] Inatomi T., 2015. Growth performance, gut mucosal immunity and carcass and intermuscular fat of broiler fed diets containing a combination of three probiotics. *Sci. Post.* 1, 1-9.
- [39] Jamroz D., Potkański A., 2006: *Żywnienie zwierząt i paszoznawstwo*, t. 2. PWN Warszawa, 560.
- [40] Jassim J.M., Riyad K.M., Maijd H.A., Yanzhang G., 2011. Evaluation of physical and chemical characteristics of male and female ducks carcasses at different ages. *Pak. J. Nutr.* 10, 182-189.
- [41] Jouybari M.G., Pour V.R., Nagarchi M.M.Z., Taghizadeh M.R., Dehpanah N., 2009. The effect of novel probiotic on blood parameters and performance in broiler chickens. *J. Cell Anim. Biol.* 3(8), 141-144.

- [42] Kabir S.M.L., Rahman M.M., Rahman M.B., Rahman M.M., Ahmed S.U., 2004. The dynamics of probiotics on growth performance and immune response in broilers. *Int. J. Poult. Sci.* 3(5), 361-364.
- [43] Kalavathy R., Abdullah N., Jalaludin S., Ho, Y.W., 2003. Effects of *Lactobacillus* cultures on growth performance, abdominal fat deposition, serum lipids and weight of organs of broiler chickens. *Brit. Poultry Sci.* 44, 139-144.
- [44] Kalsum U., Soetanto H., Achmanu., Sjoftjan O., 2012. Influence of a probiotic containing *Lactobacillus fermentum* on the laying performance and egg quality of Japanese quails. *Int. J. Poult. Sci.* 11(4), 311-315.
- [45] Khalafalla F. A., Fatma H. M. A., Zahran D. A., Mosa A. M. M. A., 2011. Influence of feed additives in quality of broiler carcasses. *J. World's Poult. Res.* 2(3), 40-47.
- [46] Kim H.W., Yan F.F., Hu J.Y., Cheng H.W., Kim Y.H.B., 2016. Effects of probiotic feeding on meat quality of chicken breast during postmortem storage. *Poult. Sci.* 95, 1457-1464.
- [47] Kokoszyński D., Bernacki Z., Saleh M., Stęczny K., Binkowska M., 2017. Body conformation and internal organs characteristics of different commercial broiler lines. *Braz. J. Poult. Sci.* 19, 47-52.
- [48] Kokoszyński D., Bernacki Z., Korytkowska H., Krajewski K., Skrobiszewska L., 2013. Carcass composition and physicochemical and sensory properties of meat from broiler chickens of different origin. *J. Cent. Eur. Agric.* 14(2), 303-315.
- [49] Koop-Hoolihan, 2001. Prophylactic and therapeutic uses of probiotics: A review. *J. Am. Diet.* 101920, 239-241.
- [50] Korytkowski B., 2015. Efektywne mikroorganizmy, aplikacja w produkcji indyków. *Hodowca Indyka* 3, 24-28.
- [51] Král M., Angelovičová M., Alfaig E., Walczycka M., 2013. Meat quality of broiler chickens fed diets with *Bacillus subtilis* and malic acid additives. *Sci. Pap. Anim. Sci. Biotech.* 46, 375-378.
- [52] Kurtoglu V., Kurtoglu F., Seker E., Coskun B., Balevi T., Polat E.S., 2004. Effect of probiotic supplementation on laying hen diets on yield performance and serum and egg yolk cholesterol. *Food Addit. Contam.* 21, 817-823.
- [53] Lambert G.P., 2009. Stress-induced gastrointestinal barrier dysfunction and its inflammatory effects. *J. Anim. Sci.* 87, 101-108.
- [54] Larbier M., Leclereq B., 1995. *Żywnienie drobiu*. PWN Warszawa, 333.
- [55] Ley R.E., Hamady M., Lozupone C., Turnbaugh P.J., Ramey R.R., Bircher J.S., Schlegel M.L., Tucker T.A., Schrenzel M.D., Knight R., Gordon J.I., 2008. Evolution of Mammals and Their Gut Microbes. *Science* 320, 1647-1651.
- [56] Lipiński K., Kaliniewicz J., Tywończuk J., Stasiewicz M., 2011. Wpływ dodatków probiotycznych i ziołowych na produktywność i jakość mięsa indyków. *Rocz. Nauk. PTZ* 7(2), 29-35.
- [57] López Y., Arece J., Ojeda F., Aróstica N., 2012. Effect of the inclusion of the Sorbifauna probiotic on lamb growth. *Pastos y Forrajes* 35(1), 109-118.
- [58] Loddi M.M., Gonzales E., Takita T.S., 2000. Effect of the use of probiotic and antibiotic on the performance, yield and carcass quality of broilers. *Braz. J. Anim. Sci.* 29, 1124-1131.
- [59] Luyckx K., Van Coillie E., Dewulf J., Van Weyenberg S., Herman L., Zoons J., Vervaeke E., Heyndrickx M., De Reu K., 2017. Identification and biotic susceptibility of dominant bacteria after clearing and disinfection of broiler house. *Poult. Sci.* 96, 938-949.
- [60] Lynch N.M., Kastner C.L., Kropf D.H., 1986. Consumer acceptance of vacuum packaged ground beef as influenced by product color and educational materials, *J. Food Sci.* 51(2), 253-255, 272.
- [61] Maertens H., De Reu K., van Weyenberg S., Van Coillie E., Meyer E., Van Meirhaeghe H., Van Immerseel F., Vandenbroucke V., Vanrobbaeys M., Dewulf J., 2018. Evaluation of the hygienogram stores and related data obtained after clearing and disinfection of poultry house in Flanders during the period 2007 to 2014. *Poult. Sci.* 97, 620-627.



- [62] Mahajan P., Sahoo J., Panda P.C., 1999. Effects of probiotic feeding and sea-sons on the growth performance and carcass quality of broilers. *IJPS*.34, 167-176.
- [63] Mahajan P., Sahoo J., Panda P.C., 2000. Effect of probiotic (Lacto - Sacc) feeding packaging methods and season on the microbial and organoleptic qualities of chicken meat balls during refrigerated storage. *J. Food Sci. Tech. Mys.* 37, 67-71.
- [64] Majewska T., 2006. *Drobiarstwo niekonwencjonalne*. Oficyna Wydawnicza „Hoża”, Warszawa, 146.
- [65] Malik H.E.E., Hafzalla R.H.H., Ali O.H.A., Elhassan M.M., Dousa O.B.M., Ali A.M., Elamin K.M., 2016. Effect of probiotics and acidifiers on carcass yield, internal organs, cuts and meat to bone ration of broiler chicken. *IOSR-JAVS*. 9, 18-23.
- [66] Marcu A., Vacaru-Opriş I., Marcu A., Nicula M., Dronca D., Kelciiov B., 2012. Effect of different levels of dietary protein and energy on the growth and slaughter performance at “Hybro PN” broiler chickens. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 45, 424-431.
- [67] Mateos G. G., Gonzáles –Alvarado J. M., Lázardo R., 2004. Facing the realities of poultry health and performance without antibiotics in Europe, *Proc. Intern. Feed Industry, Symp.* Lexington, USA, 69-79.
- [68] Mazanowski A., 2011a *Nowoczesna produkcja kurcząt brojlerów*. Wyd. Pro Agricola, 246.
- [69] Mazanowski A., 2011b. Wybrane czynniki środowiskowe w odchowie kurcząt brojlerów. *Wiadomości Drobiarskie*, 1, 3-7.
- [70] Milczarek A., Osek M., Pachnik M., 2015. Porównanie wartości rzeźnej i jakości mięsa kurcząt certyfikowanych JA 957 i ROSS 308. *Ann. UMCS, Zootechnica* 33(4), 1407-1416.
- [71] Miziak L., Gryko R., Kwiatek M., Parasion S., 2012. Probiotyki w żywieniu zwierząt. *Życie Wet.*, 87(9), 736-742.
- [72] Mutuş R., Kacabağlı N., Alp M., Acar N., Eren M., Gezens ŞŞ., 2006. The effect of dietary probiotic supplementation on tibial bone characteristics and strength in broilers. *Poult. Sci.* 85, 1621-1625.
- [73] Nowak A., Śliżewska K., Libudzisz Z., 2010. Probiotyki - historia i mechanizmy działania. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 4(71), 5-19.
- [74] Opaliński M., Maiorka A., Dahlke F., Cunha F., Vargas F.S.C., Cardozo E., 2007. On the use of probiotic (*Bacillus subtilis* – strain DSM 17299) as growth promotor in broiler diets. *Braz. J. Poult. Sci.* 9(2), 99-103.
- [75] Orkusz A., 2015. Czynniki oddziałujące na jakość mięsa drobiowego. *Inżynieria. Nauka. Technologia* 1, 47-60.
- [76] Panda A.K., Rama Rao S.S., Raju M.V.L.N., Sharma S.S., 2008. Effect of probiotic (*Lactobacillus sporogenes*) feeding on egg production and quality, yolk cholesterol and humoral immune response of white leghorn layer breeders. *J. Sci. Food Agr.* 88, 43-47.
- [77] Park J.H., Kim I.H., 2014. Supplemental effect of probiotic *Bacillus subtilis* B2A on productivity, organ weight, intestinal *Salmonella* microflora, and breast meat quality of growing broiler chicks. *Poult. Sci.* 93, 2054-2059.
- [78] Pelicano E.R.L., Souza P.A de., Souza H. B.A de., Oba A., Norkus E.A., Kodawara LM., Lima TMA de., 2003. Effect of different prebiotics and probiotics on broiler carcass and meat quality. *Braz. J. Poult. Sci.* 5, 207-214.
- [79] Pelicia K., Mendes A.A., Saldanha E.S.P.B., Pizzolante C.C., Takahashi S.E., Moreira J., Garcia R.G., Quinteiro R.R., Paz I.C.L.A., 2004. Komiyama C.M. Use of prebiotics and probiotics of bacterial and yeast origin for free-range broiler chickens. *Braz. J. Poult. Sci.* 6, 163-169.
- [80] Pietrzak D., Mroczek J., Garbaczewska A., Florkowski T., Riedel J., 2009. Effects of selected antimicrobial feed additives on the quality of meat and fat of chicken. *Med. Wet.* 65, 268-271.
- [81] Pietrzak D., Michalczuk M., Niemiec J., Mroczek J., Adamczak L., Łukasiewicz M., 2013. Porównanie wybranych wyróżników jakości mięsa kurcząt szybko i wolno rosnących. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2(87), 30-38.

- [82] Przeniosło-Siwczyńska M., Kwiatek K., 2013. Dlaczego zakazano stosowania w żywieniu zwierząt antybiotykowych stymulatorów wzrostu? *Życie Weterynaryjne*. 88 (2), 104-108.
- [83] Quadros A.R.B., Kiefer C., Ribeiro N.L.C., Zink L.A., 2001. Características qualitativas de carne de suínos alimentados com ração contendo a não probióticos. In XXXVIII Reunião Anual da SBZ. Piracicabo. Anais Piracicaba, 794-795.
- [84] Radu-Rusu R.M., Vacaru-Orpis I., Radu-Rusu C.G., 2008. Quantitative and qualitative features of meat production in Cobb 500 chicken hybrid. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 4, 690-697.
- [85] Rai V., Yadav B., Lakhani G. P., 2013. Application of probiotic and prebiotic in animals production: a review. *Environment & Ecology*, 31(2B), 873-876.
- [86] SAS Institute Inc., 2014. SAS/STAT User's Guide, version 9.4. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- [87] Sato R.N., Loddi M.M., Nakaghi L.S.O., 2002. Use of antibiotic and/or probiotic as growth promoters in initial rations of chickens. *Braz. J. Poult. Sci.* 4(suppl.), 37.
- [88] Schneitz C., 2005. Competitive exclusion in poultry – 30 years of research. *Food Control*. 16, 657-667.
- [89] Sharifi S.D., Sharia Timadari F., Yaghoobfar., 2012. Effect of inclusion of hull-less barley and enzyme supplementation of broiler diet on growth performance, nutrient digestion and dietary metabolizable energy content. *J. Cent. Eur. Agric.* 13, 193-207.
- [90] Sikora T., Weber P., 1995. An attempt to learn about consumer preferences regarding culinary meat. *Gosp. Mięsna* 1, 40-41.
- [91] Skomorucha I., Muchacka R., 2007. Effect of stocking density and management system on the physiological response of broiler chickens. *Ann. Anim. Sci.* 7, 321-328.
- [92] Skrabka-Błotnicka T., 1997. The influence of post-mortem factors on the quality of meat and poultry products. *Polskie Drobiarstwo* 2(3), 41-42.
- [93] Song J., 2014. Effect of a probiotic mixture on intestinal microflora, morphology and barrier integrity of broilers subjected to heat stress. *Am. Hist. Rev.* 119(2), 581-568.
- [94] Sörheim O., Ofstad R., Lea P., 2004. Effect of carbon dioxide on yield, texture and microstructure of cooked ground beef. *Meat Sci.* 67, 231-236.
- [95] Świątkiewicz S., Koreleski J., 2007. Feed additives with immunomodulatory activity in poultry feeding. *Med. Wet.* 63(11), 1291-1295.
- [96] Świerczewska E., 1994. Hodowla i użytkowanie drobiu. Wyd. SGGW, Warszawa, 197.
- [97] Świerczewska E., 1999. Chów drobiu. Oficyna wydawnicza „Hoża”, Warszawa, 202.
- [98] Šabatková J., Kumprecht I., Zobač P., Suchý P., Čermák B., 2008. The probiotic BioPlus 2B as an alternative to antibiotics in diets for broiler chickens. *Acta Vet. Brno.* 77, 569-574.
- [99] Takahashi S.E., Mendes A.A., Saldanha E.S.P.B., Pizzolante C.C., Delicia K., Quinteiro R.R., Komiyama C.M., Garcia R.G., Almeida Paz CL., 2005. Efficiency of prebiotics and probiotics on the performance, yield, meat quality and presence of *Salmonella* spp. in carcass of free-range broiler chickens. *Braz. J. Poult. Sci.* 7, 151-157.
- [100] Timmerman H.M., Veldman A., Elsen E., Rombouts F.M. van der, Beynen A.C., 2006. Mortality and growth performance of broilers given drinking water supplemented with chicken-specific probiotic. *Poult. Sci.* 85(8), 1383-1388.
- [101] Toscas P.J., Shaw F.D., Beilken S.L., 1999. Partial least squares (PLS) regression for the analysis of instrument measurements and sensory meat quality data. *Meat Sci.* 52(2), 173-178.
- [102] Vargas Jr J.G., Toledo R. S., Albino L. F. T., Rostango H.S., Oliveira J.E, Carvalho D.C.O., 2002. Características de carcaça fango de corte, submetidos a recões, contendo probióticos, prebióticos e antibióticos. In XXXIX Reunião Anual de SBZ, Recife. Anais Recife, CD ROM.
- [103] Wencsek E., Grzelak M., Kałużna I., Koźlecka M., Liszkiel I., Pałyszka M., Prokopiak H., Radziszewska J., Suchocki W., Winiarski K., Biesiada-Drzazga B., 2017. Wyniki oceny wartości użytkowej drobiu w 2016 roku. *Wiadomości Drobiarskie Sp. z o. o., Poznań*, 1-194.

- [104] Willis W.L., Reid L., 2008. Investigating the effects of dietary probiotic feeding regimen on broiler chicken production and *Camphylobacter jejuni* presence. *Poult. Sci.* 87, 606-611.
- [105] Wołoszyn J., 2002: Charakterystyka fizykochemiczna i technologiczna mięśni kaczek tuczonych przymusowo. Monografie i Opracowania 145, Wyd. Akademii Ekonomicznej we Wrocławiu, Wrocław, 5-136.
- [106] Yang Y., Iji P.A., Choct M., 2009. Dietary modulation of gut microflora in broiler chickens: a review of the role of six kinds of alternatives to in – feed antibiotics. *Worlds Poult. Sci. J.* 65, 976-114.
- [107] Yegani M., Korver D.R., 2008. Factors affecting intestinal health in poultry. *Poult. Sci.* 87, 2052-2063.
- [108] Younis T. M., El-Shafei A. A., Al-Gamal M. A., El-Sayed A. L., 2013. Effects of commercial probiotics on productive and physiological performance of broiler chickens. *J. Appl. Sci. Res.* 9(13), 6643 –6654.
- [109] Yousefi M., Korkoodi K., 2007. Effect of probiotic Thepax and *Saccharomyces cerevisiae* supplementation on performance and egg quality of laying hens. *Int. J. Poult. Sci.* 6(1), 52-54.
- [110] Zhang A.W., Lee B.D., Lee S.K., Lee K.W., An G.H., Song K.B., Lee C.H., 2005. Effects of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) cell components on growth performance, meat quality, and ileal mucosa development of broiler chickens. *Poult. Sci.* 84, 1015-1021.
- [111] Zhou X., Wang Y., Gu Q., Li W., 2010. Effect of dietary probiotic, *Bacillus coagulans*, on growth performance, chemical composition, and meat quality of Guangxi Yellow chicken. *Poult. Sci.* 89, 588-593.
- [112] Zduńczyk Z., 2014. Mięso drobiowe jako żywność funkcjonalna - bariery w rozwoju produkcji. *Polskie Drobiarstwo* (3), 12-15.
- [113] Ziółcki J., Doruchowski W., 1989. Metody oceny wartości rzeźnej drobiu. Wyd. COBRD Poznań, 1-29.



## 4. STRESZCZENIE

### **Wpływ preparatów probiotycznych (EM) na wyniki produkcyjne, wybrane cechy anatomiczne, skład tuszki i jakość mięsa kurcząt brojlerów Ross 308**

**mgr inż. Kamil Stęczny**

**Słowa kluczowe:** kurczęta brojlery, efektywne mikroorganizmy, wyniki produkcyjne, jakość mięsa, cechy anatomiczne

Celem badań było określenie wpływu preparatów probiotycznych Pro-Biotyk Em-15 i EMFarma™ na masę ciała, spożycie i zużycie paszy, przeżywalność, wydajność rzeźną, skład tuszki i cechy jakości mięsa kurcząt brojlerów Ross 308. W doświadczeniu określono ponadto wpływ preparatów probiotycznych EM na cechy układu pokarmowego, wymiary kości udowej i pierszelowej, a także skład mikroflory jelit ślepych i zanieczyszczenie mikrobiologiczne paszy, ściółki i linii pojenia w komercyjnej fermie kurcząt brojlerów. W badaniach określono także wpływ płci na cechy jakości mięsa, cechy biometryczne układu pokarmowego i kości nóg ocenianych kurcząt brojlerów Ross 308. Praktycznym celem niniejszych badań było określenie skuteczności działania preparatów probiotycznych Pro-Biotyk Em-15 i EMFarma™ w warunkach praktyki rolniczej. Przez cały okres badań ptaki utrzymywano w budynku zamkniętym, podzielonym na dwie hale produkcyjne, na podłodze pokrytej słomą i żywiono *ad libitum* zbilansowanymi mieszankami paszowymi. W okresie badań ptakom zapewniono całodobowy dostęp do wody.

Stosowanie preparatów probiotycznych (EM) spowodowało nieistotne zwiększenie masy ciała kurcząt brojlerów w wieku 42 dni, zwiększenie spożycia i zużycia paszy na 1 kg masy ciała od 1 do 42 dnia odchowu oraz redukcję padnięć ptaków od 22 dnia życia. Kurczęta brojlery otrzymujące preparaty probiotyczne EM nie różniły się istotnie pod względem masy ciała przed ubojem, masy tuszki, wydajności rzeźnej i składu tuszki w wieku 42 dni w porównaniu z kurczętami kontrolnymi. Tuszki kurcząt doświadczalnych zawierały mniej mięśni piersiowych i nóg, tłuszczu sadełkowego i szyi, natomiast więcej skóry z tłuszczem podskórnym, skrzydeł i pozostałości tuszki w porównaniu z tuszkami ptaków kontrolnych.

Porównywane grupy kurcząt brojlerów Ross 308 różniły się pod względem zawartości wody i tłuszczu w mięśniach nóg. Kurczęta z grupy kontrolnej zawierały więcej wody i tłuszczu w mięśniach nóg w porównaniu z kurczętami doświadczalnymi. Stosowanie preparatów probiotycznych EM nie miało istotnego wpływu na badane cechy fizykochemiczne mięśni piersiowych i nóg, z wyjątkiem odczynu mięśni nóg oznaczonego 24 godziny od uboju. W wieku 42 dni kurczęta brojlery otrzymujące preparaty probiotyczne EM cechowały się istotnie gorszą kruchością mięśnia piersiowego większego w porównaniu z mięśniami kurcząt kontrolnych. Aplikacja preparatów probiotycznych EM nie miała istotnego wpływu na pozostałe cechy tekstury (twardość, spoistość, sprężystość, suwalność i gumowatość), cechy sensoryczne (intensywność i pożądalność zapachu i smakowitości, kruchość i soczystość), cechy mikrostruktury (pole przekroju poprzecznego, obwód, średnice wertykalną i horyzontalną, grubość *perimysium* i *endomysium*) i właściwości reologiczne (sumę modułów lepkości i sumę modułów sprężystości) mięśnia piersiowego większego. Bez względu na sposób traktowania, mięśnie piersiowe samców cechowały się istotnie większą sprężystością i żuwalnością oraz istotnie mniejszym natężeniem barwy żółtej ( $b^*$ ), polem przekroju poprzecznego, obwodem, średnicą horyzontalną włókna mięśniowego w porównaniu z *m. pectoralis major* samic. Z kolei mięśnie nóg samców miały istotnie większą zawartość tłuszczu niż mięśnie nóg samic. Interakcja genotyp a płeć była istotna dla zawartości wody, białka, tłuszczu oraz przewodności elektrycznej ( $EC_{24}$ ) mięśni nóg.

W wieku 42 dni kurczęta brojlery otrzymujące preparaty EM miały istotnie dłuższe jelito, większe wartości proporcji długości jelita do długości ciała oraz większą procentową zawartość żołądka gruczołowego w masie ciała w porównaniu z kurczętami kontrolnymi (bez aplikacji preparatów EM). Bez względu na sposób traktowania, samce cechowały się istotnie większą masą ciała, całkowitą długością jelita, proporcją długości jelita do długości ciała, długością dwunastnicy, jelita czczego, jelita biodrowego oraz istotnie większą masą śledziony, natomiast mniejszą średnicą dwunastnicy i procentowym udziałem wątroby w masie ciała w porównaniu z samicami.

Stosowanie preparatów probiotycznych EM w odchowie kurcząt brojlerów nie miało istotnego wpływu na wymiary kości udowej i piszczelowej. Kości udowe samców miały istotnie większą największą i przyśrodkową długość, największą szerokość bliższego i dalszego końca kości oraz najmniejszą szerokość korpusu w porównaniu z kośćmi udowymi samic. Wymiary kości piszczelowej były istotnie większe u samców niż u samic, z wyjątkiem

wymiaru najmniejszej szerokości dystalnego końca kości. Interakcje grupa a płeć były istotne dla najmniejszej szerokości korpusu kości udowej oraz największej długości przekątnej bliższego końca kości piszczelowej, najmniejszej szerokości korpusu i końca dystalnego kości piszczelowej.

Wykazano dużą skuteczność stosowania badanych preparatów probiotycznych EM jako środka dezynfekcyjnego. Związane to było z istotną redukcją zanieczyszczenia mikrobiologicznego paszy i ściółki w hali doświadczalnej w 1 dniu odchowu piskląt.

## 5. ABSTRACT

### **Effect of probiotic preparations (EM) on productive performance, selected anatomical features, carcass composition and meat quality of Ross 308 broiler chickens**

**mgr inż. Kamil Stęczny**

**Key words:** broiler chickens, effective microorganisms, productive performance, meat quality, anatomical features.

The aim of the study was to determine the effect of probiotic preparations Pro-Biotyk Em-15 and EMFarma™ on the body weight, feed consumption and conversion, survival, dressing percentage, carcass composition and meat quality traits of Ross 308 broiler chickens. The experiment also determined the effect of EM probiotic preparations on digestive system characteristics, femoral and tibial bone dimensions, as well as microflora composition of the cecal feces, microbial contamination of the feed, litter and water line on a commercial broiler farm. The effect of sex on meat quality traits, biometric characteristics of the digestive system and leg bones of Ross 308 broilers was also established. The practical aim of the study was to determine the efficacy of the probiotic preparations Pro-Biotyk Em-15 and EMFarma™ in agricultural practice.

Throughout the study, birds were kept on straw-bedded floor in a closed building divided into two production units. Birds were fed balanced diets *ad libitum* and had 24-hour access to water.

The use of probiotic preparations (EM) caused a non-significant increase in the body weight of broilers at 42 days of age, increased feed intake and feed conversion per kg body weight from 1 to 42 days of rearing, and reduced bird mortality from 22 days of age. Broiler chickens receiving EM probiotic preparations did not differ significantly in preslaughter body weight, carcass weight, dressing percentage and carcass composition at 42 days of age, when compared to control chickens. The carcasses of experimental chickens contained less breast and leg muscles, less abdominal and neck fat, and more skin with subcutaneous fat, wings and remainders of the carcass compared to control carcasses.



The compared groups of Ross 308 broiler chickens differed in the water and fat content of leg muscles. Control chickens contained more water and fat in leg muscles compared to experimental birds. The use of EM probiotic preparations had no significant effect on the analysed physicochemical traits of breast and leg muscles, except for the pH of leg muscles determined 24 h postmortem. At the age of 42 days, broiler chickens receiving the EM probiotic preparations were characterized by poorer tenderness of the pectoralis major muscle compared to the muscles of control chickens. The application of EM probiotic preparations did not have a significant effect on the other textural traits (hardness, cohesiveness, springiness, chewiness, gumminess), sensory traits (aroma and taste intensity and desirability, tenderness, juiciness), microstructural traits (cross sectional area, circumference, vertical and horizontal diameters, perimysium and endomysium thickness) and rheological properties (sum of viscous moduli, sum of elastic moduli) of the pectoralis major muscle. Regardless of the treatment, male breast muscles were characterized by significantly higher springiness and chewiness as well as significantly lower yellowness ( $b^*$ ), cross sectional area, perimeter and horizontal diameter of the muscle fibre compared to the female pectoralis major muscle. In turn, male leg muscles had a significantly higher content of fat compared to female leg muscles. The genotype by sex interaction was significant for the water, protein and fat content, and for the electric conductivity ( $EC_{24}$ ) of leg muscles.

At 42 days of age, broiler chickens receiving EM preparations showed significantly longer intestine, greater ratio of intestinal length to body length, and higher proventriculus percentage in body weight compared to control chickens (not supplemented with EM preparations). Regardless of the treatment, males were characterized by significantly greater body weight, total intestinal length, ratio of intestinal length to body length, duodenal, jejunal and ileal length, significantly higher spleen weight, and lower duodenal diameter and liver percentage in the body weight compared to females.

The use of EM probiotic preparations in broiler rearing had no significant effect on the dimensions of femoral and tibial bones. Male femoral bones had significantly the greatest and medial length, the greatest breadth of the proximal and distal end of the bones, and the smallest width of the shaft compared to female femoral bones. The dimensions of the tibial bone were significantly greater in males than in females except for the dimension of the smallest breadth of the distal end of the bone. The group by sex interactions were

significant for the smallest breadth of the femoral corpus, greatest diagonal of the proximal end of tibial bone, and smallest breadth of the tibial corpus and distal end.

The studied EM probiotic preparations were found to be highly effective as disinfectants. This was related to a significant reduction in microbial contamination of the feed and litter in the experimental production unit on day 1 of rearing.

## 6. ZAŁĄCZNIKI

**6.1. KOPIE ARTYKUŁÓW NAUKOWYCH STANOWIĄCYCH CYKL PUBLIKACJI  
ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**



## Effect of probiotic preparations (EM) on productive characteristics, carcass composition, and microbial contamination in a commercial broiler chicken farm

Kamil Stęczny & Dariusz Kokoszyński

To cite this article: Kamil Stęczny & Dariusz Kokoszyński (2020): Effect of probiotic preparations (EM) on productive characteristics, carcass composition, and microbial contamination in a commercial broiler chicken farm, *Animal Biotechnology*

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/10495398.2020.1754841>



Published online: 17 Apr 2020.



Submit your article to this journal [↗](#)



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)



# Effect of probiotic preparations (EM) on productive characteristics, carcass composition, and microbial contamination in a commercial broiler chicken farm

Kamil Stępczyński  and Dariusz Kokoszyński 

Department of Animal Sciences, Faculty of Animal Breeding and Biology, UTP University of Science and Technology, Bydgoszcz, Poland

## ABSTRACT

This experiment evaluated the effect of Pro-Biotyk (Em-15) and EMFarma™ probiotics on body weight, feed intake and conversion, carcass traits, and microbial contamination in a poultry house. The probiotic preparations caused a nonsignificant increase in body weight (42 days), feed intake, and feed conversion ratio (1–42 days) and a nonsignificant decrease in chicken mortality from 4 weeks of rearing. Chickens exposed to probiotics did not differ significantly in preslaughter body weight, carcass weight, dressing percentage, and the content of carcass components. The carcasses from experimental chickens had a lower percentage of breast muscle, leg muscle, abdominal fat, and neck, as well as a higher percentage of skin with subcutaneous fat, wings, and remainder of carcasses compared with the carcasses from control birds. The probiotic preparations used in this study were highly effective as auxiliary disinfectants.

## KEYWORDS

broiler; carcass; disinfection; effective microorganisms; productive performance

## Introduction

Due to their effectiveness and multifaceted effects on the gastrointestinal tract, probiotics are most often used in poultry production as a substitute for antibiotic growth promoters. Probiotics have similar effects to those of in-feed antibiotics. The major modes of action of probiotics include their ability to colonize the gut; rapid gut wall colonization; suppressing the growth of pathogenic bacteria by producing bacteriocins, short-chain organic acids, and hydrogen peroxide production; stimulating the immune system by enhancing immunoglobulin (IgA, IgG, and IgM) production; increasing the phagocytic activity of macrophages and lymphocytes and stimulating  $\gamma$ -interferon production; increasing the number and size of intestinal villi, which increases the intestinal absorptive area and improves nutrient absorption; and increasing the secretion and activity of digestive enzymes, which enhances nutrient digestibility and availability.<sup>1–5</sup> The microorganisms contained in probiotics are also capable of reducing the production of toxins and intestinal gases produced by toxic bacteria.<sup>3,6</sup>

In recent years, researchers have devoted considerable attention to determining the effect of probiotics in poultry on performance,<sup>7–15</sup> carcass composition and meat quality.<sup>9,10,16–19</sup> Research has also been conducted for several years to determine the efficiency of effective microorganisms in chickens on productive traits.<sup>20,21</sup> However, the studies have reported results that vary and are often contradictory.

EM probiotics are a mixture of selected microorganisms (lactic acid bacteria, photosynthetic bacteria, yeasts, actinomycetes, and fermenting fungi) developed in the 1980s.<sup>22,23</sup> Initially, they were used in agriculture to enhance soil fertility and later found application in the dairy and cheese-making industries. EM probiotics are also used in medicine as a feed supplement for livestock and to improve the hygienic status of livestock buildings. When sprayed or fogged, they reduce the production of noxious gases inside animal houses and decrease litter moisture, which may have beneficial effects on body weight gains and feed conversion. They can also be used to treat slurry and runoff. When used in feeds, they ameliorate the course of foodborne intoxication, reduce the pH of intestinal contents, and decrease diarrhea incidence.<sup>23</sup>

Effective disinfection of poultry houses is an important component of prophylaxis in poultry production and reduces the incidence of zoonoses and other poultry diseases. Over the last years, several authors<sup>24–26</sup> evaluated whether the application of various chemical preparations was effective at disinfecting poultry houses. However, the present authors are not aware of any studies reporting the efficiency of poultry house biodisinfection with preparations containing effective microorganisms, which provided the incentive for us to undertake this study.

Showing the positive effects of the Pro-Biotyk (Em-15) and EMFarma<sup>TM</sup> preparations on production results, broiler carcass composition and microbial contamination of farms will encourage breeders to use them in commercial broiler production.

It was our hypothesis that there will be differences in productive characteristics and carcass traits of broiler chickens of both sexes, as well as in microbial contamination of a commercial broiler chicken farm.

The objective of the study was to determine the effect of the probiotics Pro-Biotyk (Em-15) and EMFarma<sup>TM</sup> on production results of Ross 308 broiler chickens of both sexes (body weight at 42 days; feed intake; feed conversion ratio (FCR); mortality during rearing (from 1 to 42 days of age); carcass composition in chickens aged 42 days; and microbial contamination of feed, litter, and water line in the poultry house at the start (1 day), in the middle (21 days), and at the end (42 days) of the broiler rearing period.

## Materials and methods

### Birds and housing

The study used data on rearing performance of broiler chickens from a commercial Polish farm. One-day-old chicks were distributed into two groups in two rooms (control and experimental) separated by a hygiene sluice and fodder store; birds were kept on litter in a windowless building. Each facility (500 m<sup>2</sup> in area) contained 9000 Ross 308 chicks. Depending on bird age, the air exchange ranged from 0 to 4.2 m<sup>3</sup>/h/kg body weight, indoor temperature was from 17 to 33 °C, and humidity was around 55–70%.

### Feeding program

Birds were fed a commercial complete starter diet for broiler chickens in crumble form from 1 to 8 days of age. The starter diet contained soybean meal, ground cereals, rapeseed, dried red blood cells, rapeseed cake, monocalcium phosphate, calcium carbonate, vegetable

**Table 1.** Chemical composition of diets for broiler chickens.

Chemical analysis (%)	Starter 1–8 d	Grower 1 9–24 d	Grower 2 25–32 d	Finisher 33–42 d
DM	89.58	87.93	89.79	89.96
CP	23.08	22.45	22.10	21.63
Crude fat	5.41	5.45	5.52	4.80
Crude fiber	2.21	1.60	2.00	2.24
Crude ash	3.75	4.67	4.45	4.59
ADF	5.66	4.74	4.44	5.36
NDF	10.19	9.26	9.60	10.27
ME, MJ/kg	12.60	13.20	13.33	13.09
Lysine	1.38	1.25	1.13	1.05
Methionine	0.53	0.51	0.46	0.43
Threonine	0.92	0.83	0.76	0.72
Thryptophan	0.22	0.20	0.19	0.19
Calcium	0.96	0.88	0.80	0.76
Phosphorus soluble	0.47	0.43	0.39	0.37

DM: dry matter; CP: crude protein; ADF: acid detergent fiber; NDF: neutral detergent fiber; ME: metabolizable energy.

**Table 2.** Composition of diets for broiler chickens.

Ingredients (%)	Grower 1 9–24 d	Grower 2 25–32 d	Finisher 33–42 d
Trouw Nutrition DKAG Plus Concentrate	5.0	5.0	–
Lidermix DKA-F E Fito Trouw Nutrition	–	–	2.0
Soybean meal	25.0	22.0	22.0
Raw soybean oil	3.5	4.2	4.7
Ground limestone	–	–	0.75
Feed wheat	66.5	68.8	70.6

**Table 3.** Microbial profile of EM probiotics.

Determination target	Cell count (cfu/ml)	
	Pro-Biotyk (Em-15)	EMFarma
<i>Lactobacillus</i> spp.	$1.5 \times 10^7$	$5.0 \times 10^6$
<i>Bifidobacterium</i> spp.	$1.0 \times 10^3$	$2.0 \times 10^5$
<i>Lactococcus</i> spp.	$8.0 \times 10^6$	$4.0 \times 10^6$
<i>Streptococcus thermophilus</i>	$8.0 \times 10^4$	$6.0 \times 10^6$
<i>Bacillus subtilis</i>	$3.0 \times 10^2$	$1.1 \times 10^2$
<i>Rhodopseudomonas</i> spp.	$3.0 \times 10^2$	$<10^1$
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	$1.0 \times 10^2$	$2.0 \times 10^2$

oil, sodium chloride, and sodium sulfate (as declared by the manufacturer). From 9 to 42 days, birds received ground complete diets produced on the farm from purchased feed components. Next, birds were fed a grower diet 1 from 9 to 24 days, grower 2 from 25 to 32 days, and a finisher diet from 33 to 42 days. Table 1 contains data on the basic chemical composition and energy value of the compound feeds, as well as the content of some amino acids, calcium, and available phosphorus. The basic chemical composition of the four diets fed to the chickens was determined at the Feed Quality Laboratory of the UTP University of Science and Technology in Bydgoszcz, Poland. The ingredient composition of the diets is listed in Table 2. In both groups separately, the weight of the diets was recorded throughout the 42 day rearing period, as well as the amount of feed refusals on day 42. This enabled calculating the mean feed consumption per bird, and,

following the determination of body weight, the feed conversion ratio (kg). Mortality was recorded daily during the rearing period.

### **Effective microorganisms program**

EM probiotics (experimental factor) were first used when preparing the facility for the experimental birds, prior to the placement of day-old chicks (1 facility of 500 m<sup>2</sup>). Disinfection was carried out with chemical disinfectants (sodium hypochlorite, Virocid F) in the control facility. Virocid F contains quaternary ammonium salts and glutaraldehyde as active synergistic substances. In the experimental facility, the chemical disinfectants were used in addition to EMFarma™ at 30 L/170 L of water per facility, which had an area of 500 m<sup>2</sup> (spraying of the ceiling, equipment, and litter) and Pro-Biotyk (Em-15) at 5 L/5 L of water (spraying of the feed on paper and in feeders). In the experimental facility, Pro-Biotyk (Em-15) plus EMFarma™ solutions (1.25 L of each preparation/2.5 L water) were sprayed onto the litter and feed twice weekly from 2 weeks of age. From 1 day of age, three times weekly, Pro-Biotyk (Em-15) was added to water in the amount of 2 mL/1 L of water.

### **Source microbiologic product**

Pro-Biotyk (Em-15) and EMFarma™ preparations were purchased from ProBiotics Polska. According to the manufacturer's data, Pro-Biotyk (Em-15) mainly contained strains of the following microorganisms: *Bacillus subtilis*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus fermentum*, and *Lactobacillus plantarum*. The EMFarma™ preparation mainly contained *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus diacetylactis*, *Lactobacillus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Bacillus subtilis*, and *Saccharomyces cerevisiae*. Apart from the microorganisms, both EM probiotics contained sugar cane molasses and chlorine-free water.

Pro-Biotyk (Em-15) is allowed on the Polish market as a complementary feedingstuff (veterinary number PL 3027065). According to the information provided by the manufacturer, it colonizes the intestinal tract with beneficial bacterial microflora and acidifies (decreases pH) of intestinal contents, which

creates unfavorable conditions for the development of pathogenic bacteria. The EMFarma™ preparation is registered as active cultures (certificate PZH/HT 3111/2016) and designed for hygienization and biodisinfection of livestock building surfaces.

### **Microbial analysis**

The microbial profile (Table 3) of the Pro-Biotyk (Em-15) and EMFarma™ probiotics was determined using a quantitative culture technique (Petri dish method) at the Department of Biotechnology and Food Microbiology of the Poznań University of Life Sciences in Poznań, Poland. *Lactobacillus* spp. bacteria were enumerated in MRS Agar medium (OXOID), *Bifidobacterium* spp. in TOS-MUP (MERCK), *Lactococcus* and *Streptococcus thermophilus* in M17 (OXOID), *Bacillus subtilis* in TSB (OXOID), *Rhodopseudomonas* spp. in Van Niel's medium (ATCC medium 1676), and *Saccharomyces cerevisiae* yeast with chloramphenicol medium (YGC, BIOCORP).

At 1, 21, and 42 days of rearing, pooled samples of feed, litter, and swabs from water lines were collected for microbial analysis. Total fungal and total aerobic mesophilic bacteria counts were determined in 1 g of feed, and *Salmonella* analyses were performed in a 25 g sample. One gram of litter was analyzed for the total fungal count, total aerobic mesophilic bacteria count, and *Enterococcus* spp., and the presence of *Salmonella* was tested in a 25 g sample. The swab samples from water lines were analyzed for the total aerobic mesophilic bacteria count, coliform bacteria, *Escherichia coli*, and *Enterococcus* spp. The determinations were performed at the P.U.H. 'Ladrob' Laboratory in Opole, Poland in accordance with Polish standards.

### **Carcass characteristics**

At the end of the 42 day rearing period, 48 chickens (24 birds per group, 12 males and 12 females) were selected for slaughter. The birds for slaughter were collected at 4 locations equidistant from the diagonal of each room. At each location, 3 males and 3 females with a body weight close to the mean weight of each sex per group were selected; this body weight was determined during control weighing (50 males and 50 females from each group, which were weighed in groups of 10 males or 10 females) as part of a standard procedure which is used in broiler chicken rearing to determine the normal growth of the birds, by comparison with the reference value listed in the Broiler



Management Guide. Birds for control weighing, performed by a poultry producer, were selected at 4 locations equidistant from the diagonal of each room (from which birds were later chosen for the present study), at a 1:1 sex ratio. The body weight of chickens selected for slaughter was determined individually.

The birds were slaughtered in a commercial poultry slaughterhouse using the water bath electrical stunning system (125 mA, 4 s, mechanical cutting of neck blood vessels, exsanguination). Eviscerated carcasses with neck were transported to the Laboratory of the Faculty of Animal Breeding of the UTP University of Science and Technology in Bydgoszcz, Poland and chilled in a Hendi refrigerated cabinet (Hendi, Gadki, Poland) for 18 h at 4 °C. Each eviscerated carcass with neck, without edible giblets (heart, liver, and gizzard), which contained kidneys but no lungs and other inedible viscera, was individually weighed on a WLC 6/12/F1/R electronic balance (Radwag, Radom, Poland) to the nearest 0.1 g and then dissected. During the dissection, each carcass was separated into neck without skin, wings with skin, skin with subcutaneous fat from the whole carcass (without wing skin), breast muscles (pectoralis major and pectoralis minor muscles), leg muscles (all thigh and drumstick muscles), and the remainder of the carcass, namely, the skeleton with some skeletal muscles.<sup>27</sup>

### Statistical analysis

The numerical data were statistically analyzed using SAS software, ver. 9.4.<sup>28</sup> Arithmetic means (mean) and standard deviation (SD) were calculated for productive characteristics and carcass traits. Significant differences in the mean values of the traits between the groups were analyzed by Tukey's test. The level of significance was at  $p < 0.05$ .

## Results and discussion

### Farm productivity

The data in Table 4 show that the mean body weight of 42-day-old Ross 308 broilers from both groups was high and exceeded 2850 g. Nonsignificantly higher body weight on day 42 was obtained in broilers exposed to effective microorganisms (Pro-Biotyk Em-15 and EMFarma<sup>TM</sup>). This was probably due to the higher feed intake (better appetite) of experimental chickens compared with control birds. Lower body weights of Ross 308 broilers at the age of 42 days than in our study were reported by Biesiada-Drzazga et al.<sup>29</sup> and Kokoszyński et al.<sup>30</sup> 2230 and 2088 g, respectively.

**Table 4.** Production characteristics of broiler chickens during rearing (mean  $\pm$  sd).

Trait	Treatment		p-Value
	Control	EM probiotics	
Body weight at 42 d, g	2856 $\pm$ 411	2885 $\pm$ 362	0.706
Feed intake in kg, 1–42 d	4.69 $\pm$ 0.68	4.74 $\pm$ 0.16	0.883
FCR in kg/kg, 1–42 d	1.64 $\pm$ 0.07	1.65 $\pm$ 0.06	0.745
Mortality cumulative, %			
1–7 d	0.93 $\pm$ 0.06	1.05 $\pm$ 0.08	0.682
8–14 d	1.52 $\pm$ 0.04	1.53 $\pm$ 0.03	0.440
15–21 d	1.85 $\pm$ 0.04	1.85 $\pm$ 0.01	0.645
22–28 d	2.03 $\pm$ 0.01	1.94 $\pm$ 0.01	0.065
29–35 d	2.21 $\pm$ 0.02	2.07 $\pm$ 0.01	0.246
36–42 d	2.37 $\pm$ 0.01	2.23 $\pm$ 0.01	0.814

Feed consumption per bird during the 42 day rearing period was higher in experimental chickens (EM) than in control chickens, which contributed to the nonsignificantly higher FCR in birds exposed to EM probiotics. Song<sup>4</sup> observed that body weight gains of broiler chickens increased significantly after administration of a probiotic containing *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, and *Clostridium* bacteria. Apata<sup>1</sup> noted a favorable effect of *Lactobacillus bulgaricus* probiotics on body weight gain. Jouybari et al.<sup>31</sup> reported improved feed conversion (lower FCR) in broiler chickens receiving a probiotic containing *Pseudomonas putido* and *Pantoea agglomeran*. In turn, Opaliński et al.<sup>11</sup> observed no positive effect of probiotics containing *Bacillus subtilis* on body weight of Ross chickens from 1 to 21 days of age and reported significant decreases in feed intake and FCR. Bai et al.<sup>2</sup> found significant improvements in average daily gains (ADGs) and feed efficiency in male Cobb broilers from 1 to 21 days of age, but there were no significant differences in growth performance of the broilers between 22 and 42 days of age when using probiotics containing *Lactobacillus fermentum* and *Saccharomyces cerevisiae*. Endo and Nakano<sup>8</sup> observed significantly higher body weight of male and female broiler chickens at 49 days and improved FCR in males, as well as lower body weight and higher FCR in females in a study concerning the effect of multi-component probiotics containing *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, and *Clostridium* bacteria and yeasts of *Saccharomyces* and *Candida* species.

During the 42 day rearing period, mortality was 2.37% in the control group (214 birds out of 9000) and 2.23% in the experimental group (201 birds out of 9000). The lower number of dead birds in the experiment was probably due to the beneficial effect of EM on intestinal microflora and immune stimulation. Higher rearing mortality (4.2–5.0%) was observed in broiler chicken flocks participating in official performance testing in Poland in 2016.<sup>32</sup> In turn,

**Table 5.** Slaughter body weight, dressing percentage, and percentage of carcass components in 42-d-old broiler chickens (mean  $\pm$  sd).

Trait	Treatment		<i>p</i> -Value
	Control	EM probiotics	
Slaughter body weight, g	2867 $\pm$ 329	2880 $\pm$ 306	0.804
Carcass weight, g	2101 $\pm$ 228	2109 $\pm$ 250	0.987
Dressing percentage, %	73.3 $\pm$ 4.9	73.2 $\pm$ 5.0	0.762
Neck, %	3.3 $\pm$ 0.5	3.0 $\pm$ 0.6	0.077
Wings, %	9.7 $\pm$ 1.1	9.9 $\pm$ 1.2	0.436
Breast muscles, %	29.9 $\pm$ 3.8	29.4 $\pm$ 3.9	0.602
Leg muscles, %	20.6 $\pm$ 2.9	19.6 $\pm$ 3.5	0.121
Skin with subcutaneous fat, %	8.6 $\pm$ 1.7	9.5 $\pm$ 1.2	0.056
Abdominal fat, %	0.6 $\pm$ 36.9	0.5 $\pm$ 0.2	0.117
Carcass remainders, %	27.3 $\pm$ 5.1	28.1 $\pm$ 5.5	0.628

Adamski et al.<sup>33</sup> reported higher mortality in Hybro G and Hybro N broiler chickens during a 49 day rearing period (7.4% and 8.6%, respectively). Pelicia et al.<sup>18</sup> noted lower mortality in broiler chickens from the strain ISA S757-N Label Rouge supplemented with a mixture of probiotics and prebiotics of bacterial origin (2.23%) compared with nonsupplemented birds (8.51%) and birds supplemented with a mixture of probiotics and prebiotics of yeast origin (5.50%) or a mixture of probiotics and prebiotics of bacterial and yeast origin (4.88%) up to 35 days of rearing.

### Carcass characteristics

The body weights of the chickens selected for slaughter and the characteristics of their carcasses are presented in Table 5. The compared groups of broiler chickens did not differ ( $p > 0.05$ ) in terms of mean body weight, carcass weight, and dressing percentage at 42 days. Broiler chickens of both sexes exposed to the probiotics containing EM exhibited nonsignificantly higher body weights and carcass weights at 42 days. The experimental birds of both sexes had a nonsignificantly lower dressing percentage (by 0.1%) compared with the control birds. A similarly high dressing percentage (73.6%) in 42-day-old Ross 308 chickens was reported by Milczarek et al.<sup>34</sup>

The carcasses from 42-day-old Ross 308 chickens of both sexes, which received the multicomponent probiotics Pro-Biotyk (Em-15) and EMFarma<sup>TM</sup>, did not differ significantly in the percentage of dissected carcass components. The carcasses from experimental birds of both sexes had a lower ( $p > 0.05$ ) percentage of neck, breast muscle, leg muscle, and abdominal fat and a higher percentage of skin with subcutaneous fat, wings, and remainder of the carcass compared with the carcasses from control birds. The lower percentage of breast and leg muscles and the higher content of skin with subcutaneous fat in the carcasses of

experimental compared with control chickens is considered undesirable for chicken meat consumers and processors. The higher content of skin with subcutaneous fat in the carcasses of experimental chickens was probably due to the higher feed intake per bird. The effect of probiotics on carcass composition in broiler chickens was found to be variable in earlier studies. Ashayerizadeh et al.<sup>35</sup> found a significant increase in the percentage of breast and legs (culinary cuts) and a reduction in the percentage of abdominal fat in the body weight of 42-day-old broiler chickens supplemented with Primalac probiotic (900 g/ton of the compound feed). However, the results of this experiment<sup>35</sup> were not confirmed by our study. Pelicia et al.,<sup>18</sup> in the carcasses of 84-day-old free-range chickens supplemented with a mixture of probiotics and prebiotics of bacterial or yeast origin, obtained a similar percentage of breast and leg meat as well as a nonsignificantly higher content of abdominal fat in the carcasses than in control birds.

### Microbiological evaluation

The microbiological test results of the feed, litter, and water line are shown in Table 6. Analysis of the results showed that on day 1, the total fungal and total aerobic mesophilic bacteria counts per gram of feed or litter decreased after spraying with Pro-Biotyk (Em-15) and EMFarma<sup>TM</sup> when preparing the poultry house for chick placement. In the next tests, the total count of these microorganisms was found to be generally higher in the experimental group for the feed and litter sampled on 21 and 42 days of rearing. The application of probiotics caused a reduction in the number of *Enterococcus* spp. per gram of litter up to 21 days. Spraying the probiotics contributed to a decrease in the number of coliform bacteria and to an increase in the number of aerobic mesophilic bacteria on a water line. No *Salmonella* bacteria were found in the feed and litter for the samples collected on day 21. Earlier studies<sup>25,26,36</sup> determined the efficacy of various poultry house disinfectants and showed a great reduction in the number of pathogenic bacteria. However, chemical disinfectants can adversely affect animal and human bodies, the safety of poultry raw materials, and the technical condition of poultry houses. For these reasons, a search is on for safer poultry house and poultry decontamination methods. The results obtained are indicative of the high effectiveness of the EM probiotics as disinfectants used after the application of traditional chemical disinfectants in experimental poultry houses prior to bird placement.

**Table 6.** Level of microbial contamination of litter, feed, and water line in poultry house (cfu/g).

Trait	Sampling date		
	1 d	21 d	42 d
<b>Litter</b>			
Total fungal count			
C	$2.1 \times 10^7$	$5.8 \times 10^7$	$1.2 \times 10^7$
E	$1.4 \times 10^7$	$6.3 \times 10^8$	$3.2 \times 10^7$
Total aerobic mesophilic bacteria count in 1 g			
C	$7.5 \times 10^6$	$7.1 \times 10^8$	$8.0 \times 10^8$
E	$3.0 \times 10^7$	$9.2 \times 10^8$	$9.3 \times 10^8$
<i>Enterococcus</i> spp. in 1 g			
C	$6.9 \times 10^5$	$3.8 \times 10^7$	$1.9 \times 10^6$
E	$5.1 \times 10^6$	$3.7 \times 10^7$	$4.7 \times 10^6$
<b>Feed</b>			
Total fungal count in 1 g			
C	$4.5 \times 10^6$	$5.9 \times 10^5$	$3.0 \times 10^4$
E	$1.6 \times 10^7$	$5.1 \times 10^5$	$9.4 \times 10^6$
Total aerobic mesophilic bacteria count in 1 g			
C	$7.6 \times 10^6$	$3.6 \times 10^6$	$7.0 \times 10^5$
E	$3.5 \times 10^7$	$7.3 \times 10^5$	$7.0 \times 10^5$
<b>Water line</b>			
Total aerobic mesophilic bacteria count in 1 g			
C	$5.9 \times 10^6$	$3.9 \times 10^7$	$3.4 \times 10^6$
E	$6.3 \times 10^6$	$9.0 \times 10^6$	$4.3 \times 10^6$
Coliform bacteria in 1 g			
C	$5.8 \times 10^4$	$2.8 \times 10^4$	$6.7 \times 10^4$
E	$4.5 \times 10^5$	$1.3 \times 10^5$	$5.5 \times 10^5$
<i>Escherichia coli</i> in 1 g			
C	$1.7 \times 10^4$	$1.0 \times 10^2$	No growth
E	$1.4 \times 10^4$	No growth	$1.0 \times 10^2$
<i>Enterococcus</i> spp. in 1 g			
C	No growth	$1.0 \times 10^2$	No growth
E	$1.0 \times 10^2$	$3.0 \times 10^2$	No growth

C: control group; E: EM probiotics.

## Conclusions

The investigated Pro-Biotyk Em-15 and EMFarma™ probiotics were characterized by low efficiency with regard to production traits. This suggests that the studied EM probiotic preparations are of little value in commercial broiler chicken production in terms of improving rearing performance. The experimental probiotics could be used by broiler producers to increase the effectiveness of disinfecting poultry houses prepared for bird placement. The present research should be continued in the future due to the small number of studies on the effectiveness of EM probiotics in commercial broiler chicken farms.

## Disclosure statement

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of this article.

## Funding

This research was realized from statutory research funds [BS-12/2012 and BSM 50/2012] assigned by the Polish Ministry of Science and Higher Education.

## ORCID

Kamil Stęczny  <http://orcid.org/0000-0002-8352-8091>  
 Dariusz Kokoszyński  <http://orcid.org/0000-0002-6642-1129>

## References

1. Apata DF. Growth performance, nutrient digestibility and immune response of broiler chicks fed diets supplemented with a culture of *Lactobacillus bulgaricus*. *J Sci Food Agric*. 2008;88(7):1253–1258.
2. Bai SP, Wu AM, Ding XM, et al. Effects of probiotic-supplemented diets on growth performance and intestinal immune characteristics of broiler chickens. *Poult Sci*. 2013;92(3):663–670.
3. Dankowiakowska A, Kozłowska I, Bednarczyk M. Probiotics, prebiotics and synbiotics in poultry – mode of action, limitation, and achievements. *J Cent Eur Agric*. 2013;14(1):467–478.
4. Song J, Xiao K, Ke YL, et al. Effect of a probiotic mixture on intestinal microflora, morphology and barrier integrity of broilers subjected to heat stress. *Am Hist Rev*. 2014;93(3):581–588.
5. Świątkiewicz S, Koreleski J. Feed additives with immunomodulatory activity in poultry feeding. *Med Wet*. 2007; 63:1291–1295.
6. Medlewski B, Rutkowski A. Probiotics in feeding laying hens. *Polish Poultry*. 2008; 5:34–38.

7. Babazadeh D, Vahdatpour T, Nikpiran H, Jafargholipour MA, Vahdatpour S. Effects of probiotic, prebiotic and synbiotic intake on blood enzymes and performance of Japanese quails (*Coturnix japonica*). *Indian J Anim Sci.* 2011; 81: 870–874.
8. Endo T, Nakano M. Influence of a probiotic on productivity, meat components, lipid metabolism, caecal flora and metabolites, and raising environment in broiler production. *Anim Sci J.* 1999;70(4):207–218.
9. Kabir SML, Rahman MM, Rahman MB, Rahman MM, Ahmed SU. The dynamics of probiotics on growth performance and immune response in broilers. *Int J Poult Sci.* 2004; 3:361–364.
10. Kim HW, Yan FF, Hu JY, Cheng HW, Kim Y. Effects of probiotics feeding on meat quality of chicken breast during postmortem storage. *Poult Sci.* 2016; 95(6):1457–1464.
11. Opalinski M, Maiorka A, Dahlke F, Cunha F, Vargas FSC, Cardozo E. On the use of probiotic (*Bacillus subtilis* – strain DSM 17299) as growth promoter in broiler diets. *Rev Bras Cienc Avic.* 2007;9(2):99–103.
12. Quadros ARB, Kiefer C, Ribeiro NLC, Zink LA. Qualitative characteristics of swine carcasses fed with rations containing no probiotics. XXXVIII Reunião Anual da SBZ, Piracicabo, Anais Piracicaba; 2001: 794–795.
13. Takahashi SE, Mendes AA, Saldanha E, et al. Efficiency of prebiotics and probiotics on the performance, yield, meat quality and presence of *Salmonella* spp. in carcass of free-range broiler chickens. *Rev Bras Cienc Avic.* 2005;7(3):151–157.
14. Vargas JG, Jr. Toledo RS, Albino LFT, Rostango HS, Oliveira JE, Carvalho D. Characteristics of slime carcass, submitted to recessions, containing probiotics, prebiotics and antibiotics. XXXIX Reunião Anual de SBZ, Recife. Anais Recife; 2002. CD ROM.
15. Yousefi M, Karkoodi K. Effect of probiotic *Thepax* and *Saccharomyces cerevisiae* supplementation on performance and egg quality of laying hens. *Int J Poult Sci.* 2007;6(1):52–54.
16. Loddi MM, Gonzales E, Takita TS. Use of probiotic and antibiotic on yield performance and quality of carcass of broiler chickens. *Rev Bras Zootecn.* 2000; 29:1124–1131.
17. Mahajan P, Sahoo J, Panda PC. Effect of probiotic (Lacto-Sacc) feeding, packaging methods and season on the microbial and organoleptic qualities of chicken meat balls during refrigerated storage. *J Food Sci Tech Mys.* 2000; 37:67–71.
18. Pelícia K, Mendes AA, Saldanha E, et al. Use of prebiotics and probiotics of bacterial and yeast origin for free-range broiler chickens. *Rev Bras Cienc Avic.* 2004; 6(3):163–169.
19. Zhang AW, Lee BD, Lee SK, et al. Effects of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) cell components on growth performance, meat quality, and ileal mucosa development of broiler chickens. *Poult Sci.* 2005;84(7): 1015–1021.
20. Jwher DMT, Abd SK, Mohammad AG. The study of using effective microorganisms (EM) on health and performance of broiler chicks. *IJVS.* 2013;27(2):73–78.
21. Wondmeneh E, Getachew T, Dessie T. Effect of effective microorganisms (EM) on the growth performance of Fayoumi and Horro chicks. *Int J Poult Sci.* 2011;10(3):185–188.
22. Gesek M, Sokół R, Lambert BD, Otrocka-Domagała I. Ostrocka-Domagała I. Effect of Effective Microorganisms on intestine morphology and morphometry in Japanese quails. *Turk J Vet Anim Sci.* 2018; 42(4):285–291.
23. Korytkowski B. Effective microorganisms, turkey production applications. *Turkey Breeding.* 2015; 3:24–28.
24. De Castro Burbarelli MF, Do Valle Polycarpo G, Deliberali Lelis K, et al. Cleaning and disinfection programs against *Campylobacter jejuni* for broiler chickens: productive performance, microbiological assessment and characterization. *Poult Sci.* 2017;96(9): 3188–3198.
25. Luyckx K, Van Coillie E, Dewulf J, et al. Identification and biocide susceptibility of dominant bacteria after cleaning and disinfection of broiler house. *Poult Sci.* 2017;96(4):938–949.
26. Maertens H, De Reu K, Van Weyenberg S, et al. Evaluation of the hygienogram stores and related data obtained after cleaning and disinfection of poultry house in Flanders during the period 2007 to 2014. *Poult Sci.* 2018;97(2):620–627.
27. Ziołocki J, Doruchowski W. *Evaluation Methods of Poultry Slaughter Value.* Poznań: Poultry Research Center; 1989.
28. Sas Institute Inc. 2014. *SAS/STAT User's Guide, Version 9.4.* Cary: Sas Institute Inc.
29. Biesiada-Drzazga B, Janocha A, Bombik T, Rojek A, Brodzik U. Evaluation of the growth and slaughter value of the Ross 308 broiler chickens. *Acta Sci, Pol Zootech.* 2011; 10:11–20.
30. Kokoszyński D, Bernacki Z, Korytkowska H, Krajewski K, Skrobiszewska L, Skrobiszewska L. Carcass composition and physicochemical and sensory properties of meat from broiler chickens of different origin. *J Cent Eur Agric.* 2013;14(2):303–315.
31. Jouybari MG, Pour VR, Nagarchi MMZ, Taghizadeh MR, Dehpanah N. The effect of novel probiotic on blood parameters and performance in broiler chickens. *J Cell Anim Biol.* 2009; 3:141–144.
32. Wencek E, Grzelak M, Kałużna I, et al. Results of assessing the value in use of poultry in 2016. *Poultry News.* 2017, 1–194.
33. Adamski M, Kuźniacka J, Bernacki Z. Influence of sex on slaughter yield and carcass tissue composition in broiler chickens reared under production conditions. *Zesz Nauk ATR Bydgoszcz Zootechnika.* 2004; 34: 107–114.
34. Milczarek A, Osek M, Pachnik M. Comparison of slaughter value and quality of chicken certified meats JA 957 and ROSS. *Annales UMCS Zootechnica.* 2015; 33:1407–1416.

35. Ashayerizadeh A, Dabiri N, Ashayerizadeh O, Mirzadeh KH, Roshanfekar H, Mamooee M. Effect of dietary antibiotic, probiotic and prebiotic as growth promoters, on growth performance, carcass characteristics and hematological indices of broiler chickens. *Pak J Biol Sci.* 2009;12(1): 52–57.
36. Jiang L, Li M, Tang J, et al. Effect of different disinfectants on bacterial aerosol diversity in poultry house. *Front Microbiol.* 2018; 9:1–10.





## Effects of probiotics and sex on physicochemical, sensory and microstructural characteristics of broiler chicken meat

Kamil Stęczny & Dariusz Kokoszynski

To cite this article: Kamil Stęczny & Dariusz Kokoszynski (2019) Effects of probiotics and sex on physicochemical, sensory and microstructural characteristics of broiler chicken meat, Italian Journal of Animal Science, 18:1, 1385-1393, DOI: [10.1080/1828051X.2019.1667269](https://doi.org/10.1080/1828051X.2019.1667269)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/1828051X.2019.1667269>



© 2019 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group.



Published online: 25 Sep 2019.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 352



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)



Citing articles: 1 View citing articles [↗](#)

## Effects of probiotics and sex on physicochemical, sensory and microstructural characteristics of broiler chicken meat

Kamil Stępczny  and Dariusz Kokoszynski 

Katedra Hodowli Zwierząt, UTP University of Science and Technology, Bydgoszcz, Poland

### ABSTRACT

The aim of the study was to determine the effects of probiotic preparations Pro-Biotyk Em-15 and EMFarma™ and sex on proximate chemical composition, physicochemical properties of breast and leg muscles, sensory properties (including texture) and microstructural characteristics of *pectoralis major* muscle in Ross 308 broiler chickens. The study used 48 carcasses – 12 from males and 12 from females fed no probiotics, and 12 from males and 12 from females receiving the EM probiotics. At 42 days, the chickens receiving EM preparations had significantly higher WB-shear force of *pectoralis major* muscle, whereas the leg muscles contained significantly less water and fat and had higher pH<sub>24</sub> value. Regardless of the treatment, males exhibited significantly higher springiness, chewiness, as well as significantly lower yellowness (b\*), fibre perimeter, horizontal (H) fibre diameter and fibre cross section area of *pectoralis major* muscle when compared to females. In turn, male leg muscles had significantly higher fat content compared to female leg muscles. The genotype × sex interaction was significant for the content of water, protein and fat, and for electric conductivity (EC<sub>24</sub>) of leg muscles.

### HIGHLIGHTS

- Probiotics did not improve the quality of chicken meat.
- The influence of sex on the quality of chicken meat was varied.

### ARTICLE HISTORY

Received 29 May 2019  
Revised 19 August 2019  
Accepted 6 September 2019

### KEYWORDS

Broiler chickens; probiotic;  
meat colour; texture;  
microstructure

## Introduction

In recent years, there has been a substantial increase in the world in the production of chicken meat. In 2000–2017 (FAOSTAT 2019), chicken meat production increased by 86% (from 58.7 to 109.0 million tons).

One of the essential factors affecting the quality of meat is the animals' diet. Pietrzak et al. (2009) found higher protein content and lower fat content in the leg muscles of Ross 308 chickens fed with a probiotic (lactic acid bacteria *Enterococcus faecium* NCIMB 10415), which is beneficial to health. On the other hand, higher fat content was characteristic of the breast muscles of chickens receiving the above probiotic. The leg muscles were characterised by lower water holding capacity and higher cooking loss. In turn, Kim et al. (2016) reported no significant effect of the use of probiotic containing *Enterococcus* spp., *Pediococcus* spp., *Bifidobacterium* spp., and *Lactobacillus* spp. on the colour (attributes L\*, a\*, b\*), pH, and cooking loss of breast muscles from broiler

chickens aged 45 days. A significant impact of the probiotic addition was found only for the drip loss of breast muscle of the tested 45-day-old chickens. Other authors (Pelicano et al. 2003; Pelicia et al. 2004; Takahashi et al. 2005; Zhou et al. 2010) provided inconclusive results for the effect of feeding probiotics to animals on their meat quality.

Over the last decade, effective microorganisms (EM) have become increasingly popular in agricultural practice. They were investigated in broiler chickens (Wondmeneh et al. 2011; Jwher et al. 2013), laying hens (Simeamelak et al. 2013; Gnanadesigan et al. 2014) and quails (Gesek et al. 2018). Showing the positive effects of the EM probiotics in broiler chicken production with regard to meat quality may encourage an increase in the biologisation of modern agriculture.

The objective of the study was to determine the effects of the probiotics Pro-Biotyk Em-15 and EMFarma™ and sex on proximate chemical composition, physicochemical properties of breast and leg muscles, sensory properties (including texture) and

**CONTACT** Assoc. Prof. Dariusz Kokoszynski  [kokoszynski@gmail.com](mailto:kokoszynski@gmail.com)  Katedra Hodowli Zwierząt, Faculty of Animal Breeding and Biology, UTP University of Science and Technology, Bydgoszcz 85084, Poland

© 2019 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.



microstructural characteristics of *pectoralis major* muscle in Ross 308 broiler chickens.

## Materials and methods

### Birds and housing

The experiment used 48 carcasses from Ross 308 broiler chickens at the age of 42 days. Broiler carcasses were purchased from a local poultry slaughterhouse. Before slaughter, broilers were kept on a commercial broiler farm in a windowless building, in which two production facilities (each with an area 500 m<sup>2</sup>) were separated by a technical room. Both facilities provided the same environmental parameters (temperature, humidity, air movement) depending on the age of birds. Air temperature in the poultry building was 33 °C on the first day of rearing and it was gradually reduced to 17 °C with the age of the birds. Relative humidity ranged from 55 to 70%, and air exchange varied between 0 and 4.2 m<sup>3</sup>/h/kg body weight. The poultry building was heated with gas-fired heaters. Stocking density on day 42 did not exceed the EU permitted level of 42 kg/m<sup>2</sup> floor area. The research was performed with the approval of the Local Ethics Committee for Experimental Animals (UTP University of Science and Technology in Bydgoszcz, Poland/Ministry of Science and Higher Education).

### Feeding programme

Birds were fed *ad libitum* complete diets and had 24-h access to water throughout the rearing period (days 1–42). From days 1 to 8, chickens were fed a commercial complete broiler starter diet in crumble form. From days 9 to 42, birds received complete diets: grower 1 (days 9–24), grower 2 (days 25–32) and finisher (days 33–42). The finely ground diets were produced on the farm from purchased feed components (protein–fat concentrate, extracted soybean meal, soybean oil, feed wheat, mineral–vitamin mixture, ground limestone). Chemical composition of the experimental diets was analysed at the Feed Quality Laboratory of the UTP University of Science and Technology in Bydgoszcz, Poland, and the results are shown in Table 1.

### Effective microorganisms programme

In the first facility (500 m<sup>2</sup>), Pro-Biotyk Em-15 was added to water (each time from 0.3 to 1.2 l depending on bird age) from day 1 of age, three times a week. Pro-Biotyk Em-15 mixed with EMFarma<sup>TM</sup> (1.25 L of

**Table 1.** Chemical composition of diets for broiler chickens.

Chemical analysis	Starter 0–8 days	Grower 1 9–24 days	Grower 2 25–32 days	Finisher 33–42 days
DM, %	89.58	87.93	89.79	89.96
CP as fed basis, %	23.08	22.45	22.10	21.63
Crude fat as fed basis, %	5.41	5.45	5.52	4.80
Crude fibre as fed basis, %	2.21	1.60	2.00	2.24
Crude ash as fed basis, %	3.75	4.67	4.45	4.59
ADF as fed basis, %	5.66	4.74	4.44	5.36
NDF as fed basis, %	10.19	9.26	9.60	10.27
ME as fed basis, MJ/kg	12.60	13.20	13.33	13.09

DM: dry matter; CP: crude protein; ADF: acid detergent fibre; NDF: neutral detergent fibre; ME: metabolizable energy.

each preparation) and water (2.5 L) were sprayed onto the feed and litter twice weekly from 2 weeks of age. In addition, when preparing the facility for the placement of day-old chicks, chemical disinfectants (sodium hypochlorite, Virocid F) and EMFarma<sup>TM</sup> (30 L plus 170 L water) were used to spray the ceiling, walls and poultry equipment. Furthermore, Pro-Biotyk Em-15 was used to spray feed on the paper and in the feeders (5 L of the preparation plus 5 L of water). In the second facility, no EM probiotics were used when preparing it for placement and during rearing.

### Microbial analysis

The microbial profile of the Pro-Biotyk (Em-15) and EMFarma<sup>TM</sup> probiotics was determined using quantitative culture technique (Petri dish method). The determinations were made at the Department of Biotechnology and Food Microbiology of the Poznań University of Life Sciences in Poznań, Poland and the results are shown in Table 2. *Lactobacillus* spp. bacteria were enumerated in MRS Agar medium (OXOID), *Lactococcus* and *Streptococcus thermophilus* in M17 (OXOID), *Bifidobacterium* spp. in TOS-MUP (MERCK), *Bacillus subtilis* in TSB (OXOID), *Rhodopseudomonas* spp. in Van Niel's medium (ATCC medium 1676) and *Saccharomyces cerevisiae* yeast with chloramphenicol medium (YGC, BIOCORP).

### Evaluation of meat quality

The pH of breast muscles (*pectoralis major* muscle) and leg muscles (drumstick muscle) was measured 24 h post-mortem on meat chilled at 4 °C for 18 h in a Hendi chill cabinet (Hendi, Gądko, Poland). pH<sub>24</sub> was determined with a Star CPU pH metre (Ingenieurbüro R. Matthäus, Nobitz, Germany) designed for meat pH analysis. The determinations of pH values were accurate to 0.01. Before the measurement, the pH metre was calibrated with a standard solution (pH 5.5 and 7.0). Electric conductivity was measured also 24 h

post-mortem ( $EC_{24}$ ) on the carcasses chilled to 4 °C.  $EC_{24}$  was measured with an LF-Star CPU conductivity metre (Ingenieurbüro R. Matthäus, Nobitz, Germany). To determine  $EC_{24}$  values, the stainless steel electrodes of the conductometer were placed in the drumstick or *pectoralis major* muscle at a 90-degree angle parallel with the muscle fibres.  $EC_{24}$  was measured with an accuracy of 0.1 mS/cm.

After dissection, the breast and leg muscles were individually sampled from each carcass of 48 birds to determine basic chemical composition, drip loss, cooking loss, and meat colour attributes. The *pectoralis major* muscles were also sampled to determine their sensory properties (including textural traits) and micro-structural characteristics.

The basic chemical composition and the collagen content of breast and leg muscles from the compared broiler groups were determined by near-infrared transmission (NIT) spectroscopy. Calibration using artificial neural networks (ANN) was performed on a FoodScan device (FoodScan Laboratory, Foss, Cheshire, UK).

The colour of meat was determined on the *pectoralis major* muscle from the direction of breast-bone and on the thigh and drumstick (leg) surfaces, following dissection of the patella and tendons 24 h post-mortem. The meat colour coordinates:  $L^*$  – lightness,  $a^*$  – relative redness, on red-green axis,  $b^*$  – relative yellowness, on yellow-blue axis were measured in the CIELab Colour System (1976). Meat colour was measured with a Konica Minolta CR410 chroma meter (Konica Minolta, Japan). Wide-area illumination was used (0° viewing angle, measurement area 50 mm in diameter, illuminant  $D_{65}$ ). The chroma metre was calibrated against a CR410 white reference tile ( $Y = 94.40$ ,  $x = 0.3159$ ,  $y = 0.3325$ ).

Drip loss was also determined for *pectoralis major* muscle and for thigh and drumstick muscles together. Each muscle was weighed on a Radwag PS 1000.R2 scales (Radwag, Radom, Poland) to the nearest 0.01 g. Next, the meat samples of breast or leg from each bird were placed separately in a perforated bag (no. 1). In the next stage, the bag with the meat sample was placed into a second bag (no. 2) to prevent contact between dripping juice and the meat sample. The samples were suspended on racks and stored in a Hendi chill cabinet (Hendi, Gądko, Poland) at 4 °C for 24 h. After this time, the samples of breast or leg meat were weighed again. Drip loss was calculated as the difference between sample weights before and after chilling. The loss in the meat sample weight was calculated as a percent of initial sample weight.

Cooking loss was determined in the samples of *pectoralis major* muscle and of thigh and drumstick

**Table 2.** Microbial profile of EM probiotics.

Determination target	Cell count (cfu/mL)	
	Pro-Biotyk (Em-15)	EMFarma
<i>Lactobacillus</i> spp.	$1.5 \times 10^7$	$5.0 \times 10^6$
<i>Bifidobacterium</i> spp.	$1.0 \times 10^3$	$2.0 \times 10^5$
<i>Lactococcus</i> spp.	$8.0 \times 10^6$	$4.0 \times 10^6$
<i>Streptococcus thermophilus</i>	$8.0 \times 10^4$	$6.0 \times 10^6$
<i>Bacillus subtilis</i>	$3.0 \times 10^2$	$1.1 \times 10^2$
<i>Rhodopseudomonas</i> spp.	$3.0 \times 10^2$	$<10^1$
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	$1.0 \times 10^2$	$2.0 \times 10^2$

muscles (together) weighing  $20 \pm 0.2$  g. The meat samples were formed into balls, wrapped in absorbent gauze and placed in a 85 °C water bath for 10 min. After removal from the water bath, heat-treated meat samples were cooled for 30 min at 4 °C. Next, they were weighed again on a Radwag PS 1000.R2 electronic scales (Radwag, Radom, Poland) to the nearest 0.01 g. Meat weight loss was calculated as the difference in meat weight before and after heat treatment. The resulting cooking loss was expressed as percent loss of the initial meat sample weight.

The sensory properties were assessed on the *pectoralis major* muscles obtained from the 42-day-old Ross 308 broiler chickens. The breast meat samples were heat treated in 0.6% NaCl. 200-mL of water was added per 100 g of meat. After the heat treatment, the meat samples were chilled and assessed by a panel of six trained judges. The breast meat samples were assessed according to a 5-point scale provided by Baryłko-Pikielna and Matuszewska (2009). The assessment scale for intensity of aroma and taste was as follows: 1 – imperceptible, 2 – perceptible, 3 – weakly distinct, 4 – distinct, 5 – very distinct. Aroma and taste desirability of the breast meat samples was assessed using the scale as follows: 1 – very undesirable, 2 – desirable, 3 – neutral, 4 – desirable, 5 – very desirable. Juiciness was scored as follows: 1 – clearly dry, 2 – slightly dry, 3 – weakly juicy, 4 – juicy, 5 – very juicy. Tenderness was assessed based on the following scale of assessment: 1 – very hard, 2 – hard, 3 – slightly tender, 4 – tender, 5 – very tender.

The meat texture (hardness, cohesiveness, springiness, chewiness, gumminess, WB shear force) and rheological properties (sum of elasticity moduli and sum of viscosity moduli) were determined with an Instron 1140 apparatus (Instron Corp., USA), using the TPA double compression test, the Warner-Bratzler (WB) test, and the stress-relaxation test. For each sample, each test was performed in 5–7 replications.

The test was performed with 48 samples of heat-treated *pectoralis major* muscle obtained from the chickens after dissection. The determinations were

made at the Department of Meat Technology of the West Pomeranian University of Technology.

The muscles were tightly packed into PE foil bags and heated in water at  $72 \pm 2^\circ\text{C}$  until the temperature reached  $70.2^\circ\text{C}$  in the geometric centre. On reaching the target temperature, the muscles were cooled in cold running water until reaching around  $12^\circ\text{C}$  in the geometric centre and, after removing the drip, they were packed into food packaging film to prevent drying out and placed for around 12 h in the refrigerator at  $3 \pm 1^\circ\text{C}$  until analyses. The meat texture analyses were performed with the samples after bringing them to around  $18^\circ\text{C}$ .

A  $20 \pm 1$  mm thick slice was cut out from different muscles perpendicular to the muscle fibre orientation, using a Siemens MS 6000 electric slicer. The so prepared samples were subjected to instrumental assessment of mechanical properties.

In the TPA test the plunger 0.62 cm in diameter was driven twice into the sample (parallel to muscle fibre orientation), with a 80% deformation and crosshead speed of 50 mm/min. From the curve representing the strength-deformation dependence, the following parameters were determined: hardness, cohesiveness, springiness, chewiness and gumminess (Bourne 1982).

The Warner-Bratzler (WB) test involved cutting the muscle samples across the muscle fibres, and determining shear force (Bourne 1982). The working speed of the crosshead was 50 mm/min.

In the relaxation test the plunger 0.96 cm in diameter was driven into the sample 2 mm deep (a 10% deformation) for 90 s to record the changes in stresses. To calculate the elasticity and viscosity moduli the generalised Maxwell model was applied, made up of three elements connected parallel: the Hooke body and two viscous-elastic Maxwell bodies. The model equation assumes the following form:

$$\delta = \varepsilon \cdot \left[ E_0 \cdot \exp\left(\frac{-E_1 \cdot t}{\mu_1}\right) + E_2 \cdot \exp\left(\frac{-E_2 \cdot t}{\mu_2}\right) \right]$$

where  $\delta$ , tension (kPa);  $\varepsilon$ , deformation;  $E_0$ , elasticity module for the Hooke body (kPa);  $E_1$ ,  $E_2$ , elasticity moduli for Hooke body 1 and 2 respectively (kPa);  $\mu_1$ ,  $\mu_2$ , viscosity moduli for Maxwell body 1 and 2 respectively (kPa  $\times$  s);  $t$ , time.

For a more reader-friendly interpretation of the results for each sample there was calculated the sum of elasticity moduli ( $E_0 + E_1 + E_2$ ) as well as the sum of viscosity moduli ( $\mu_1 + \mu_2$ ).

For histological analysis, samples of *pectoralis major* muscle were collected from 48 birds, 12 males and 12 females from each group of chickens slaughtered at 42 days. From each bird after slaughter, three sections ( $0.5 \times 0.5 \times 1$  cm each) were taken from the middle

part of the pectoralis major muscle. The samples were collected parallel to the muscle fibre orientation. Next, the samples were fixed with Sannomiya solution, dehydrated in alcohol and benzene, and embedded in paraffin blocks. The blocks were sectioned with microtome, and sections of 10  $\mu\text{m}$  were placed on glass slides and counterstained with haematoxylin and eosin (Burck 1975) and embedded in Canada balm. The microstructural traits of *pectoralis major* muscle were measured using the MultiScanBase v. 13 image analysis system (Computer Scanning System Ltd, Warsaw, Poland). Fibre cross-section area, fibre perimeter and its horizontal (H) and vertical (V) diameter, and thickness of perimysium and endomysium were measured. The determinations were made on three *pectoralis superficialis* muscle preparations per bird. A total of 144 preparations of *pectoralis major* muscle were used to determine the microstructure. Around 200 muscle fibres were measured in each preparation and 150–200 measurements of the connective tissue thickness (perimysium and endomysium) were made. A magnification of  $100\times$  was applied. Based on the data for horizontal (H) and vertical (V) diameters of the muscle fibre, the H:V diameter ratio was calculated.

The numerical data collected during the study on basic chemical composition, physicochemical, sensory, textural and microstructural characteristics of the meat were statistically analysed. Arithmetic means and standard error of mean (SEM) were calculated for each trait (for both groups together). Two-way analysis of variance was used to determine the effect of probiotic and sex on the analysed meat quality traits of broiler chickens at the age of 42 days. The following linear model was used:

$$Y_{ijk} = \mu + a_i + b_j + (a \cdot b)_{ij} + e_{ijk}$$

where  $Y_{ijk}$ , value of the analysed trait;  $\mu$ , overall mean;  $a_i$ , effect of  $i^{\text{th}}$  group;  $b_j$ , effect of  $j^{\text{th}}$  sex;  $(a \cdot b)$ , interaction of group with regard to sex;  $e_{ijk}$ , random error.

The analysed traits were statistically characterised using SAS software ver. 9.4 (SAS Institute Inc. 2014). Significant differences (at  $p < .05$ ) between the compared groups and between males and females were determined with Tukey's test. For all the analysed traits of meat quality, the individual bird was the experimental unit.

## Results

### Chemical composition

The compared groups of Ross 308 broilers differed ( $p < .05$ ) only in the water and fat content of leg

muscles. Control chickens contained more water and fat in leg muscles compared to chickens receiving EM probiotics. Males exhibited significantly ( $p < .05$ ) higher fat content in leg muscles than females. The group  $\times$  sex interaction for the evaluated quality meat traits was significant ( $p < .05$ ) for the water, protein and fat content of leg muscles (Table 3).

### Meat physicochemical properties

The administration of EM probiotics to Ross 308 broilers had no significant ( $p > .05$ ) effect on the analysed physicochemical traits of breast and leg meat except for pH<sub>24</sub> of leg muscles. Regardless of group, male breast muscles had lower yellowness ( $b^*$ ) compared to females. The group  $\times$  sex interaction was

significant ( $p < .05$ ) for electric conductivity (EC<sub>24</sub>) of leg muscles (Table 4).

### Meat texture

At 42 d of age, chickens receiving EM probiotics were characterised by significantly ( $p < .05$ ) poorer tenderness (higher WB shear force) of heat-treated *pectoralis major* muscle compared to control birds. Regardless of treatment, the heat-treated *pectoralis major* muscle of males had higher ( $p < .05$ ) springiness and chewiness. The group  $\times$  sex interactions for the texture of pectoralis major muscle were not significant ( $p > .05$ ) (Table 5).

### Meat sensory properties

Group, sex and group  $\times$  sex interaction were not significant ( $p > .05$ ) for aroma and taste intensity and

**Table 3.** Effect of diet on chemical composition of breast and leg muscles in 42-day-old broiler chickens.

Item		Group (G) – sex (S)				SEM	p-Value		
		Control		Probiotics			G	S	G $\times$ S
		♂ (n = 12)	♀ (n = 12)	♂ (n = 12)	♀ (n = 12)				
Water	BM	72.30	72.10	72.20	72.10	0.70	.32	.30	.30
	LM	70.80 <sup>b</sup>	71.20 <sup>a</sup>	71.60 <sup>a</sup>	69.60 <sup>c</sup>	0.30	.00	.67	.04
Protein	BM	23.40	23.20	23.30	23.40	0.20	.62	.98	.58
	LM	19.60	20.30	20.60	20.50	0.20	.05	.17	.01
Fat	BM	1.60	1.80	1.90	1.60	0.20	.47	.28	.06
	LM	6.40 <sup>a</sup>	4.50 <sup>b</sup>	4.20 <sup>b</sup>	4.80 <sup>b</sup>	0.40	.00	.00	.03
Collagen	BM	1.60	1.60	1.50	1.70	0.10	.62	.13	.45
	LM	1.70	1.60	1.60	1.70	0.10	.61	.22	.90

BM: breast muscle; LM: leg muscle.

<sup>a,b,c</sup>Values within a row followed by different letter differ significantly ( $p < .05$ ).

**Table 4.** Some physicochemical traits of breast and leg meat from 42-day-old Ross 308 broiler chickens.

Trait	Group (G) – sex (S)				SEM	p Value			
	Control		Probiotics			G	S	G $\times$ S	
	Male (n = 12)	Female (n = 12)	Male (n = 12)	Female (n = 12)					
pH <sub>24</sub>	BM	6.05	6.01	6.22	6.02	0.10	.14	.07	.22
	LM	6.51 <sup>b</sup>	6.51 <sup>b</sup>	6.81 <sup>a</sup>	6.58 <sup>b</sup>	0.10	.01	.12	.11
EC <sub>24</sub> (mS/cm)	BM	10.20	10.60	10.60	10.00	0.30	.83	.80	.11
	LM	8.80	8.50	10.60	10.00	0.20	.08	.55	.03
Drip loss (%)	BM	2.10	2.00	2.30	2.30	0.10	.56	.14	.31
	LM	0.70	0.90	0.80	0.80	0.10	.14	.14	.94
Cooking loss (%)	BM	24.20	22.80	23.50	23.80	0.30	.31	.13	.73
	LM	22.10	22.00	22.00	22.50	0.50	.20	.99	.11
L* – lightness	BM	59.00	58.70	58.70	59.30	1.00	.78	.76	.46
	LM	52.60	53.50	55.00	51.90	0.40	.73	.35	.11
a* – redness	BM	17.60	18.00	17.50	17.40	0.60	.42	.53	.12
	LM	18.40	18.00	17.50	17.40	0.60	.27	.43	.10
b* – yellowness	BM	7.60	8.60	7.60	9.00	0.40	.52	.00	.60
	LM	7.70	7.90	8.40	8.00	0.50	.32	.83	.49

BM: breast muscles; LM: leg muscles.

<sup>a,b</sup>Values within a row followed by different letter differ significantly ( $p < .05$ ).

**Table 5.** Textural and rheological traits of pectoralis major muscle from 42-d-old Ross 308 broiler chickens.

Trait	Group (G) – sex (S)				SEM	p Value		
	Control		Probiotics			G	S	G × S
	Male (n = 12)	Female (n = 12)	Male (n = 12)	Female (n = 12)				
Hardness (N)	24.90	25.10	24.10	23.60	1.10	.31	.88	.74
Cohesiveness	0.30	0.30	0.30	0.30	0.10	.62	.12	.51
Springiness (cm)	1.40	1.10	1.20	1.10	0.10	.65	.01	.41
Chewiness (N × cm)	9.60	8.70	9.80	7.70	0.60	.52	.02	.31
Gumminess (N)	8.10	7.70	8.20	7.00	0.50	.46	.10	.43
WB shear force (N)	45.70 <sup>b</sup>	46.30 <sup>b</sup>	56.70 <sup>a</sup>	53.60 <sup>a</sup>	3.10	.00	.67	.52
Sum of elastic moduli (KPa)	448	412	458	465	29.40	.30	.63	.47
Sum of viscous moduli (kPa × s)	18466	17579	18635	18169	526	.48	.21	.69

<sup>a,b</sup>Values within a row followed by different letter differ significantly ( $p < .05$ ).

**Table 6.** Sensory characteristics of pectoralis major muscle from 42-d-old Ross 308 broiler chickens.

Trait	Group (G) – sex (S)				SEM	p Value		
	Control		Probiotics			G	S	G × S
	Male (n = 12)	Female (n = 12)	Male (n = 12)	Female (n = 12)				
Aroma intensity (pts.)	4.00	3.90	4.00	3.80	0.10	.53	.23	.53
Aroma desirability (pts.)	4.20	4.10	4.10	4.00	0.10	.15	.06	.82
Juiciness (pts.)	4.00	3.90	3.90	3.80	0.10	.07	.12	.31
Tenderness (pts.)	4.20	4.20	4.30	4.00	0.10	.96	.16	.13
Taste intensity (pts.)	4.20	4.30	4.20	4.10	0.10	.16	.70	.16
Taste desirability (pts.)	4.20	4.30	4.20	4.20	0.10	.68	.92	.13

**Table 7.** Microstructure of pectoralis major muscle from 42-day-old Ross 308 broiler chickens.

Trait	Group (G) – sex (S)				SEM	p Value		
	Control		Probiotics			G	S	G × S
	Male (n = 12)	Female (n = 12)	Male (n = 12)	Female (n = 12)				
Fibre cross section area ( $\mu\text{m}^2$ )	242	326	288	301	18.90	.66	.05	.14
Fibre perimeter ( $\mu\text{m}$ )	69.70	83.10	75.00	77.50	2.60	.99	.02	.09
Fibre diameter H ( $\mu\text{m}$ )	17.90	20.50	18.90	19.80	0.60	.81	.02	.23
Fibre diameter V ( $\mu\text{m}$ )	18.60	21.10	20.80	21.00	0.70	.25	.14	.21
H:V diameter ratio (x)	0.96	0.97	0.95	0.91	0.10	.33	.78	.48
Perimysium thickness ( $\mu\text{m}$ )	7.60	7.40	7.40	6.90	0.80	.75	.74	.85
Endomysium thickness ( $\mu\text{m}$ )	1.80	1.80	1.80	1.90	0.10	.81	.70	.91

desirability (Table 6), and also for the juiciness and tenderness of heat-treated *pectoralis major* muscle in the assessment of trained judges. The breast muscles of chickens (male and female on average) fed the probiotics had lower scores for aroma intensity and desirability, juiciness, taste intensity and desirability and tenderness compared to the breast muscles of control birds.

### Microstructure of the meat

The supplementation of EM probiotics did not have a significant ( $p > .05$ ) effect on fibre cross section area, fibre diameter and perimeter, H:V diameter ratio, perimysium and endomysium thickness. Males had significantly ( $p < .05$ ) lower fibre cross section area fibre perimeter and horizontal diameter compared to females. The group × sex interaction for the

microstructure of *pectoralis major* muscle from 42-day-old broiler chickens was not significant ( $p > .05$ ) (Table 7).

### Discussion

The present study provides a scientific evaluation of the effectiveness of Pro-Biotyk Em-15 and EMFarma™ probiotics on the meat quality of broiler chickens raised on a commercial poultry farm as part of agricultural operations. Our results have shown that the EM probiotics containing *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Lactococcus* spp., *Streptococcus thermophilus*, *Bacillus subtilis*, *Rhodospseudomonas* spp. and *Saccharomyces cerevisiae* yeast do not have a significant effect on the water, protein and fat content of the muscles. However, chickens supplemented with EM probiotics had significantly less water and fat in

the leg muscles compared to control birds. The greater lengths of jejunum (by 4.9 cm), ileum (by 7.9 cm) and caecum (by 1.4 cm) and diameters of ileum (by 1.1 mm) and caecum (by 0.7 mm) in the experimental compared to control birds (unpublished data) could have contributed to the differences in the amount of absorbed nutrients and thus the chemical composition of meat. In the experimental facility, from 2 weeks of age, the probiotic solution was sprayed twice a week onto the feed and litter using a hand sprayer, which made the legs of experimental chickens more active and significantly reduced the fat content of leg muscles. The increased motor activity of the experimental birds is suggested by significantly lower leg muscle acidity (significantly higher pH<sub>24</sub>) resulting from the lower glycogen content of the leg muscles. Inatomi (2015) stated that administration of probiotics containing *Bacillus mesentericus*, *Clostridium butyricum*, *Streptococcus faecalis* had no significant effect on the moisture, protein and ash content of breast and leg muscles in Cobb 500 chickens aged 49 days. However, the same study showed a decrease in the fat content of breast and leg muscles. Other experiments (Král et al. 2013; Abdulla et al. 2017) found a significant reduction in the fat content of breast muscles from broiler chickens when using probiotic containing *Bacillus subtilis*, but this was not observed in our study. A significant reduction in meat fat improves the dietetic value of the meat, which is desirable for consumers from most parts of the world. On the other hand, the higher content of intramuscular fat improves meat taste and tenderness (Chartrin et al. 2006). Zhou et al. (2010) reported no effect of probiotic on the moisture, protein, crude fat and crude ash content of breast muscles from 90-day-old Guangxi Yellow chickens. Another experiment (Ivanovic et al. 2012) found a significant increase in moisture with a significant reduction in the fat and protein content of drumstick meat from 42-day-old Arbor Acres broilers in four groups receiving different feed probiotics containing *Lactobacillus plantarum* plus *Streptococcus faecium* or *Streptococcus faecium* or *Bacillus cereus* IP5832 or *Bacillus* CH200 plus *Bacillus* CH201.

In our study, the administration of EM probiotics containing *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Lactococcus* spp., *Streptococcus thermophilus*, *Bacillus subtilis*, *Rhodopseudomonas* spp. and *Saccharomyces cerevisiae* yeast had no significant effect on the physicochemical traits (pH<sub>24</sub>, EC<sub>24</sub>, drip loss, cooking loss, L\*, a\*, b\*) of the breast and leg muscles, except for pH<sub>24</sub> of the leg muscles. With regard to electrical conductivity of leg muscles measured 24 h (EC<sub>24</sub>) post-mortem, the compared groups of chickens tended to

show significant differences ( $p = .053$ ). The leg muscles of experimental chickens had greater electrical conductivity (EC<sub>24</sub>) than the leg muscles of control chickens, which was probably associated with the lower water and higher protein content of the leg muscles of chickens receiving probiotic preparations. Our results confirm the negative correlations between electrical conductivity measured 24 h post-mortem and the meat water content, as well as the positive correlations between EC<sub>24</sub> of meat and protein content reported by Łyczyński et al. (2009). Pelicano et al. (2003) stated in their study a significant effect of supplementing drinking water with probiotic containing *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus johnsonii* on lightness of breast meat from Cobb 500 broilers aged 45 days. However, the same experiment found that the dietary inclusion of probiotic containing *Bacillus subtilis* or *Bacillus subtilis* plus *Bacillus licheniformis* or *Saccharomyces cerevisiae* had no significant effect on the L\* (lightness), a\* (redness), b\* (yellowness) colour coordinates of breast muscles in 45-day-old Cobb 500 chickens. In turn, Park and Kim (2014), as in our study, demonstrated no significant effect of probiotic containing *Bacillus subtilis* B2A on the L\*, a\*, b\* coordinates of breast muscles. Zhou et al. (2010) observed no effect of dietary probiotic containing *Bacillus coagulans* ZJU0616 on pH of breast muscles in 90-day-old Guangxi Yellow chickens, whereas Pelicia et al. (2004) reported that prebiotics and probiotics of bacterial and yeast origin containing *Enterococcus* sp. and mannan oligosaccharides obtained from the cellular wall of *Saccharomyces cerevisiae* had no significant effect on pH of breast and leg muscles in 84-day-old free-range broiler chickens. However, Abdulla et al. (2017) reported significantly higher L\* (lightness), a\* (redness) and b\* (yellowness) values of breast muscles from Cobb 500 chickens at the age of 42 days, which had been supplemented with probiotic containing *Bacillus subtilis* during the rearing period, compared to control birds. The same authors reported a significant decrease in drip loss and cooking loss of breast muscles from 42-day-old Cobb 500 chickens receiving probiotic, but this was not the case in our study. The experiment of Park and Kim (2014) found a significant increase in water holding capacity (WHC) and a significant decrease in drip loss determined after 1-day storage of the samples with increasing concentration of probiotic containing *Bacillus subtilis* B2A. A significant decrease in drip loss from breast muscles of 90-day-old Guangxi Yellow chickens administered with *Bacillus coagulans* ZJU0616 was also noted by Zhou et al. (2010). In turn, Pelicano et al. (2003) failed to

observe a significant effect of probiotic containing *Bacillus subtilis*, *Bacillus subtilis* plus *Bacillus licheniformis*, and *Saccharomyces cerevisiae* on WHC and cooking loss, while Pelicia et al. (2004) found no significant effect of supplementing prebiotics and probiotics of bacterial and yeast origin containing *Enterococcus* sp. and mannan oligosaccharides obtained from the cellular wall of *Saccharomyces cerevisiae* on cooking loss in 84-day-old free-range broiler chickens.

The results of our experiment indicate a significant deterioration in tenderness (expressed as significantly higher WB shear force) of the breast muscles from 42-day-old Ross 308 chickens supplemented with EM preparations added in water, feed, water line and air sprinklers. Another study (Abdulla et al. 2017) found no significant effect of probiotic application containing *Bacillus subtilis* on tenderness of breast muscles from 42-day-old Cobb 500 chickens. On the other hand, Zhou et al. (2010) reported a significant deterioration in meat tenderness in 90-day-old Guangxi Yellow chickens receiving *Bacillus coagulans* ZJU0616, which is consistent with our findings, whereas Yang et al. (2010) found improvements in meat tenderness (significantly lower shear force values) in 42-day-old male Arbor Acres broiler chickens fed *Clostridium butyricum*. Pelicano et al. (2003) demonstrated no significant effect of adding probiotics containing *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus johnsonii* to water on the texture and preference of breast muscles from Cobb broiler chickens aged 45 days as well as significantly higher values for flavour and general aspect. The dietary inclusion of probiotics did not have any significant effect on flavour, texture, preference and general aspect of cooked breast muscles from Cobb broilers.

In our study, the application of EM probiotics containing *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Lactococcus* spp., *Streptococcus thermophilus*, *Bacillus subtilis*, *Rhodopseudomonas* spp. and *Saccharomyces cerevisiae* yeast had no significant effect on sensory properties evaluated by a panel of trained judges. In turn, Loddi et al. (2000) did not find any significant effect of probiotic containing *Enterococcus faecium* or avoparcin probiotic or probiotic mixed with antibiotic, on intensity of aroma, off-aroma, flavour, off-flavour, tenderness, juiciness, acceptability and overall aspect of breast muscles from 42-day-old Ross chickens compared to control chickens.

## Conclusions

In summary, it is concluded that administration of the EM probiotics had no significant effect on most of the

meat quality traits under analysis. Breast muscles of chickens receiving EM probiotics were characterised by poorer tenderness, whereas leg muscles had a higher water and fat content, as well as higher pH 24 h post-mortem. Sex of birds had a greater effect on meat quality. A significant effect was found for textural (springiness and chewiness) and microstructural traits (fibre cross section area, fibre perimeter, horizontal fibre diameter) of *pectoralis major* muscles, and for the fat content of the leg muscles.

## Disclosure statement

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of this article.

## Funding

This research was realised from statutory research funds BS-12/2012 and BSM 50/2012 assigned by the Ministry of Science and Higher Education, Republic of Poland.

## ORCID

Kamil Stęczny  <http://orcid.org/0000-0002-8352-8091>  
Dariusz Kokoszynski  <http://orcid.org/0000-0002-6642-1129>

## References

- Abdulla NR, Zamri ANM, Sabow AB, Kareem KY, Nurhazirah S, Ling FH, Sazili AQ, Loh TC. 2017. Physicochemical properties of breast muscle in broiler chickens fed probiotics, antibiotics or antibiotic-probiotic mix. *J Appl Anim Res.* 45:64–70.
- Baryłko-Pikielna N, Matuszewska I. 2009. Sensoryczne badania żywności [Sensory food testing]. Kraków (PL): PTTŻ. [Polish].
- Bourne MC. 1982. Food texture and viscosity concept and measurement. New York (NY): Academic Press Inc.
- Burck HC. 1975. Histological technology. Warszawa: Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich.
- Chartrin P, Méteau K, Juin H, Bernadet MD, Guy G, Larzul C, Rémignon H, Mourot J, Duclos MJ, Baéza E. 2006. Effects of intermuscular fat levels on sensory characteristics of duck breast meat. *Poult Sci.* 85:914–922.
- CIELab Colour System. 1976. Commission Internationale de l'Eclairage. France: CIE Publication.
- FAOSTAT. 2019. Livestock primary, production quantity, poultry meat, 2017. Rome: FAO Publisher; [accessed 2019 Apr 25]. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QL>.
- Gesek M, Sokół R, Lambert BD, Otrócka-Domagala I. 2018. Effect of effective microorganisms on internal morphology and morphometry in Japanese quails. *Turk J Vet Anim Sci.* 42:285–291.
- Gnanadesigan M, Sandhanasamy I, Ponnusamy S, Lakshmanan R, Natarajan M, Rajagopal R. 2014. Quality evaluation of egg compositions and productivity of layers

- in EM (effective microorganisms) treatments: a field report. *Egypt J Basic Appl Sci.* 1:161–166.
- Ivanovic S, Baltic M, Popov-Raljic J, Pisinov B, Madlic-Strizak D, Stojanovic Z, Pavlovic I. 2012. The effect of different probiotics on broiler meat quality. *Afr J Microbiol Res.* 6: 937–943.
- Inatomi T. 2015. Growth performance, gut mucosal immunity and carcass and intermuscular fat of broiler fed diets containing a combination of three probiotics. *Sci Post.* 1:1.
- Jwher DMT, Abd SK, Mohammad AG. 2013. The study of using effective microorganism (EM) on health and performance of broiler chicks. *Iraqi J Vet Sci.* 27:73–78.
- Kim HW, Yan FF, Hu JY, Cheng HW, Kim Y. 2016. Effects of probiotic feeding on meat quality of chicken breast during postmortem storage. *Poult Sci.* 95:1457–1464.
- Král M, Angelovičová M, Alfaig E, Walczycka M. 2013. Meat quality of broiler chickens fed diets with *Bacillus subtilis* and malic acid additives. *Sci Pap Anim Sci Biotech.* 46: 375–378.
- Loddi MM, Gonzales E, Takita TS. 2000. Effect of the use of probiotic and antibiotic on the performance, yield and carcass quality of broilers. *Braz J Anim Sci.* 29:1124–1131.
- Łyczyński A, Runowska G, Pospiech E, Koćwiń-Podsiadła M, Wojczak J, Rzosińska E, Grześ B, Mikołajczak B, Iwańska E. 2009. Estimation of selected porcine meat quality indicators on the basis of electrical conductivity measured 24 hours post-slaughter. *Anim Sci Pap Rep.* 27:5158.
- Park JH, Kim IH. 2014. Supplemental effect of probiotic *Bacillus subtilis* B2A on productivity, organ weight, intestinal *Salmonella microflora*, and breast meat quality of growing broiler chicks. *Poult Sci.* 93:2054–2059.
- Pelicano ERL, de Souza PA, de Souza HBA, Oba A, Norkus EA, Kodawara LM, de Lima TMA. 2003. Effect of different prebiotics and probiotics on broiler carcass and meat quality. *Rev Bras Cienc Avic.* 5:207–214.
- Pelicia K, Mendes A, Sadanhp E, Pizzolante CC, Takahashi SE, Moreira J, Garcia RG, Quinteira RR, Paz I, Komiyama CM. 2004. Use of prebiotics and probiotics of bacterial and yeast origin for free-range broiler chickens. *Braz J Poult Sci.* 6:163–169.
- Pietrzak D, Mroczek J, Garbaczewska A, Florkowski T, Riedel J. 2009. Effects of selected antimicrobial feed additives on the quality of meat and fat of chicken. *Med Vet.* 65: 268–271.
- SAS Institute Inc. 2014. SAS/STAT user's guide, version 9.4. Gary, NC: SAS Institute Inc.
- Simeamelak M, Solomon D, Taye T. 2013. The effect of effective microorganisms on production and quality performance of Rhode Island Red layers. *Int J Livest Prod.* 4: 22–29.
- Takahashi SE, Mendes AA, Saldanha E, Pizzolante CC, Pelicia K, Quinteiro RR, Komiyama CM, Garcia RG, Almeida Paz ICL. 2005. Efficiency of prebiotics and probiotics on the performance, yield, meat quality and presence of *Salmonella* spp. in carcass of free-range broiler chickens. *Rev Bras Cienc Avic.* 7:151–157.
- Wondmeneh E, Gattachew T, Dessie T. 2011. Effect of effective microorganisms (EM) on the growth performance of Fayouni and Horro chicken. *Intern. J Poult Sci.* 10:185–188.
- Yang X, Zhang B, Guo Y, Jiao P, Long F. 2010. Effects of dietary lipids and *Clostridium butyricum* on fat deposition and meat quality of broiler chickens. *Poult Sci.* 89:254–260.
- Zhou X, Wang Y, Gu Q, Li W. 2010. Effect of dietary probiotic, *Bacillus coagulans*, on growth performance, chemical composition, and meat quality of Guangxi Yellow chicken. *Poult Sci.* 89:588–593.





## Effect of probiotic preparations (EM) and sex on morphometric characteristics of the digestive system and leg bones, and caecal microflora in broiler chickens

Kamil Stęczyński & Dariusz Kokoszyński

To cite this article: Kamil Stęczyński & Dariusz Kokoszyński (2020) Effect of probiotic preparations (EM) and sex on morphometric characteristics of the digestive system and leg bones, and caecal microflora in broiler chickens, Journal of Applied Animal Research, 48:1, 45-50, DOI: [10.1080/09712119.2020.1718680](https://doi.org/10.1080/09712119.2020.1718680)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/09712119.2020.1718680>



© 2020 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group



Published online: 28 Jan 2020.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 466



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

# Effect of probiotic preparations (EM) and sex on morphometric characteristics of the digestive system and leg bones, and caecal microflora in broiler chickens

Kamil Stęczyński and Dariusz Kokoszyński

Department of Animal Sciences, Faculty of Animal Breeding and Biology, UTP University of Science and Technology, Bydgoszcz, Poland

## ABSTRACT

The objective of the study was to determine the effect of probiotic preparations Pro-Biotyk EM-15 and EMFarma™ and sex on morphometric characteristics of the digestive system and leg bones, and caecal microflora in Ross 308 broiler chickens. One-day chicks were distributed into two groups in two rooms (control, experimental). Each facility contained 9000 Ross 308 chicks and was divided into four compartments. A total of 48 Ross 308 broiler chickens aged 42 days were evaluated, including 12 males and 12 females which received no probiotics, and 12 males and 12 females supplemented with EM preparations. At the age of 42 days, EM supplemented broilers had significantly greater total intestine length, higher intestine–body length ratio and higher proventriculus percentage in body weight. Regardless of the treatment, males exhibited higher body weight, duodenum, jejunum, ileum lengths and total intestine length, higher intestine–body length ratio and spleen weight, and lower duodenum diameter and liver percentage. The group × sex interaction was significant for smallest breadth of the corpus of femur bone and greatest diagonal of proximal end, smallest breadth of the corpus and smallest breadth of distal end of tibia bone.

## ARTICLE HISTORY

Received 18 February 2019  
Accepted 10 January 2020

## KEYWORDS

Broiler; effective microorganisms; intestine; leg bones; sex

## Introduction

The intensification of poultry production increased the preference for highly productive specialized breeds and commercial hybrids, which are demanding in terms of the environmental and feeding conditions, veterinary and preventive measures, and show increased susceptibility to disease, including gastrointestinal diseases. By 2006 in the European Union, antibiotic growth promoters significantly reduced the incidence of gastrointestinal diseases while having a positive effect on growth performance. A ban on the use of in-feed antibiotics in the European Union has created a gap in preventing poultry against pathogenic bacteria. Acidifiers, herbal preparations and bio-active substances, such as probiotics, prebiotics and synbiotics, began to be used in agricultural practice (Yegani and Korver 2008; Yang et al. 2009; Przeniosło-Siwczynska and Kwiatek 2013).

Research (Bengmark 1998; Dalloul et al. 2005; Willis and Reid 2008; Dhama et al. 2011) has shown that probiotics inhibit the growth of bacteria (*E. coli*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Camphylobacter jejuni*) and coccidia oocysts in poultry. The use of probiotics reduced the incidence of diseases in poultry and the risk of food-borne intoxication in humans, caused by *Salmonella*, *Camphylobacter* and *E. coli* pathogenic bacteria (Swiatkiewicz and Koreleski 2007). Many experiments also determined the impact of probiotics on histomorphological measurements of the small intestine (Olnood et al. 2015; Al-Baadani et al. 2016; Gesek et al. 2018; Souza de et al. 2018), development of internal organs (Mahajan et al. 1999; Pelicia et al. 2004;

Takahashi et al. 2005; Zamanzad et al. 2011; Olnood et al. 2015; Malik et al. 2016) and selected characteristics of leg bones (Mutus et al. 2006; Ziaie et al. 2011; Parvaneh et al. 2014).

Research has also been conducted for several years to determine the efficiency of effective microorganisms (EM) in broiler chicken production (Wondmeneh et al. 2011; Jwher et al. 2013). EM probiotics are a mixture of microorganisms (including bacteria, fermenting fungi, radiolaria) selected and formulated in the 1980s. When added to feed or water, they ameliorate the course of food-borne intoxications, reduce the incidence of diarrhoea, and lower intestinal pH, thus creating less favourable conditions for pathogenic bacteria to develop. Spray or mist application of EM probiotics is used for hygienization and biodisinfection of livestock buildings.

The lack of studies concerning the effect of the probiotic preparations EM Pro-Biotyk EM-15 and EMFarma™ on morphometric characteristics of the digestive system and leg bones encouraged us to perform this study. Showing a positive effect of EM preparations on the analysed traits could provide an incentive for larger scale application of these preparations in commercial broiler production.

The objective of the study was to determine the effect of probiotic preparations Pro-Biotyk EM-15 and EMFarma™ and sex on body weight and length, morphometric characteristics of the intestine and leg bones, proportion (g, %) of main internal organs in the body, and composition of caecal microflora in broiler chickens.

## Materials and methods

### Birds and housing

The experiment used 48 Ross 308 broiler chickens aged 42 days. Carcasses and eviscerated viscera were purchased from a commercial poultry slaughterhouse. Before slaughter, birds were raised on a commercial broiler farm located in the Opolskie Voivodeship (Poland). Eighteen thousand-day-old unsexed chicks were randomly distributed into two groups. Chickens were kept in a confinement building separated by a technical room into two production houses (each with 9000 birds), each having an area of 500 m<sup>2</sup>. Each production room was divided into four compartments with a similar number of chickens. The two houses provided the same environmental conditions depending on the age of the birds. During the first week of rearing, temperature was maintained at 33°C followed by a gradual decrease to 17°C (heating with heaters), relative humidity ranged from 55% to 70%, and air exchange ranged from 0 to 4.2 m<sup>3</sup>/h/kg of body weight.

### Feeding programme

Throughout rearing, birds were fed *ad libitum* complete diets and had 24 h access to water. For the first 8 days of rearing, birds received a commercial complete starter diet for broilers in crumble form. From 9 to 42 days of age, birds were fed complete grower 1 (9–24 d), grower 2 (25–32 d) and finisher diets (33–42 d), which were finely ground and produced from purchased feed components (protein concentrate, feed wheat, soybean meal, soybean oil, ground limestone, premix) on farm premises. The ingredient composition of the diets produced on the farm is listed in Table 1, and chemical composition of all the diets fed to birds, determined at the laboratory, is presented in Table 2.

### Microbial analysis and effective microorganisms Programme

The microbial profile (Table 3) of the Pro-Biotyk (Em-15) and EmFarma™ probiotics was determined using quantitative culture technique (Petri dish method). *Lactobacillus* spp. bacteria were enumerated in MRS Agar medium (OXOID), *Bifidobacterium* spp. in TOS-MUP (MERCK), *Lactococcus* and *Streptococcus thermophilus* in M17 (OXOID), *Bacillus subtilis* in TSB (OXOID), *Rhodopseudomonas* spp. in Van Niel's medium (ATCC medium 1676) and *Saccharomyces cerevisiae* yeast with chloramphenicol

**Table 1.** Chemical composition of diets for broiler chickens.

Chemical analysis	Starter 0–8 d	Grower 1 9–24 d	Grower 2 25–32 d	Finisher 33–42 d
DM, %	89.58	87.93	89.79	89.96
CP, %	23.08	22.45	22.10	21.63
Crude fat, %	5.41	5.45	5.52	4.80
Crude fibre, %	2.21	1.60	2.00	2.24
Crude ash, %	3.75	4.67	4.45	4.59
ADF, %	5.66	4.74	4.44	5.36
NDF, %	10.19	9.26	9.60	10.27
ME, MJ/kg	12.60	13.20	13.33	13.09

DM, dry matter; CP, crude protein; ADF, acid detergent fibre; NDF, neutral detergent fibre; ME, metabolizable energy.

**Table 2.** Composition of diets for broiler chickens.

Ingredient (%)	Grower 1 9–24 d	Grower 2 25–32 d	Finisher 33–42 d
Trouw Nutrition DKAG Plus Concentrate	5.0	5.0	–
Lidermix DKA-F E Fito Trouw Nutrition	–	–	2.0
Soybean meal	25.0	22.0	22.0
Raw soybean oil	3.5	4.2	4.7
Ground limestone	–	–	0.75
Feed wheat	66.5	68.8	70.55

medium (YGC, BIOCORP). The determinations were made in accordance with Polish standards.

In the house with experimental birds from day 1 of age, Pro-Biotyk Em-15 was added to water three times per week in the amount of 2 ml/1 l of water. From 2 weeks of age, a Pro-Biotyk Em-15 and EMFarma™ mixture solution was sprayed twice per week (1.25 l of each preparation plus 2.5 l of water). The solution was sprayed onto feed and litter.

Birds were reared under supervision of a veterinarian. When preparing the building for the placement of chicks, the control house was disinfected with chemical disinfectants (sodium hypochlorite, Virocid F), and the experimental house, apart from the above chemical disinfectants, was treated with EMFarma™ (30 l of the preparation plus 170 l of water per 500 m<sup>2</sup> of the house) by spraying the ceiling, poultry equipment, and litter. All chickens (both groups) were vaccinated against Marek's disease (1 d of age), Gumboro disease (7 and 21 d of age), infectious bronchitis – IB (1 d of age), coccidiosis (1 d of age) and swollen head syndrome – SHS (1 d of age).

### Analysis of the digestive system and leg bone traits

On day 42 of rearing, 48 chickens, i.e. 24 birds from each group (12 males and 12 females per group, 3 males and 3 females from each compartment every production room, based on comb growth) were selected for slaughter. The selected birds were banded with padlock tags, individually weighed on an electronic balance (Axis BD 15S, Axis, Gdansk, Poland) with an accuracy level of 5 g, and measured for body length (length of trunk with neck) by measuring the distance from the first cervical vertebra (atlas) and the posterior superior tuberosity of the ischium.

Following live assessment, the birds were slaughtered in a small commercial poultry slaughterhouse (water bath electrical stunning with a current of 125 mA/pcs, stunning time 4 s, mechanical cutting of neck blood vessels, bleeding out). Slaughter date was linked to liquidation of the rest of the flock. After slaughter, birds were mechanically defeathered and manually eviscerated into intestines and other internal

**Table 3.** Microbial profile of EM probiotics.

Determination target	Cell count (cfu/ml)	
	Pro-Biotyk (Em-15)	EMFarma
<i>Lactobacillus</i> spp.	$1.5 \times 10^7$	$5.0 \times 10^6$
<i>Bifidobacterium</i> spp.	$1.0 \times 10^3$	$2.0 \times 10^5$
<i>Lactococcus</i> spp.	$8.0 \times 10^6$	$4.0 \times 10^6$
<i>Streptococcus thermophilus</i>	$8.0 \times 10^4$	$6.0 \times 10^6$
<i>Bacillus subtilis</i>	$3.0 \times 10^2$	$1.1 \times 10^2$
<i>Rhodopseudomonas</i> spp.	$3.0 \times 10^2$	$<10^1$
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	$1.0 \times 10^2$	$2.0 \times 10^2$

organs (including proventriculus, gizzard, heart, liver, spleen and lungs) The length of duodenum, jejunum, ileum, both caeca and colon was tape measured to the nearest 1 mm. The length of duodenum was measured from the pylorus to pancreatic loop, the length of jejunum was the distance from the pancreatic loop to Meckel's diverticulum and the length of ileum was the distance from Meckel's diverticulum to the ileocaecal junction. The length of the colon was measured as the distance from the mouth of the caeca to the cloaca, while the length of both caeca was measured as total distance of the mouth of the ileum to the apex of the right and left caeca. The diameters of individual intestinal segments were measured with callipers to an accuracy of 0.01 mm (three measurements at the beginning, in the middle and at the end of each intestinal segment); they were used to calculate the mean measurement of the diameter of a given segment. In addition, the internal organs – gizzard (without digesta), proventriculus (without digesta), liver (without gallbladder), heart and spleen were separated and weighed on a Medicat M160 balance (Medicat, Zurich, Switzerland) with an accuracy of 0.001 g and their percentage in preslaughter weight was calculated.

On day 42 of rearing, the dimensions of femoral and tibial bones were determined according to the method described by Driesch (1976). The following was measured with an electronic calliper with an accuracy of 0.01 mm: greatest length, medial length, greatest breadth of proximal end, greatest depth of proximal end, smallest breadth of the corpus, greatest breadth of the distal end, greatest depth of the distal end of femur bone. The following measurements of the tibia were also carried out: greatest length, axial length, greatest diagonal of the proximal end, smallest breadth of the corpus, smallest breadth of the distal end, depth of the distal end.

### Caecal microflora analysis

After slaughter and evisceration, pooled faecal samples were collected from the caeca of 48 birds within groups. Total fungal count, aerobic bacteria count and lactic acid bacteria count were determined in 1 ml of faeces. The determinations were made at the Veterinary Laboratory by quantitative culture (Petri dish method). The determinations were made in accordance with Polish standards.

### Statistical analysis

The numerical data were subjected to statistical analysis. Arithmetic means and pooled standard error (SE) for both groups were calculated for the analysed traits. Normal distribution of the morphometric characteristics of the digestive system and leg bones was verified with the Shapiro–Wilk test. Two-way analysis of variance was used to determine the effect of genotype and sex on the above meat characteristics of the ducks. To this end, the following linear model was used:  $y_{ijk} = \mu + a_i + b_j + (a \times b)_{ij} + e_{ijk}$ , where  $y_{ijk}$  – value of the analysed trait,  $\mu$  – overall mean of the analysed trait,  $a_i$  – effect of  $i$ th duck genotype,  $b_j$  – effect of  $j$ th sex,  $(a \times b)_{ij}$  – genotype by sex interaction,  $e_{ijk}$  – random error. Significant differences between the means of the traits between the groups and between males and females in a group were analysed by means of Tukey's test.

The level of significance was at  $P < 0.05$ . Statistics were analysed with SAS Software, ver 9.4. (SAS Institute Inc 2014).

## Results and discussion

The mean body weight of 42-day-old broiler chickens from the compared groups exceeded 3100 g in males and 2600 g in females, which may be indicative of their normal development resulting from the genetic makeup, proper microclimate parameters and good quality feeds (Table 4). Ross 308 broiler chickens, supplemented with EM probiotic preparations, had non-significantly higher body weight at 42 days of age when compared to control chickens that received no probiotics. These results are consistent with the findings of Mutus et al. (2006), Olnood et al. (2015) and Malik et al. (2016), who reported no statistically significant effect of supplemental probiotics on body weight of broiler chickens at 35 or 42 days of rearing. The body weight of 6-week-old broiler chickens from our study was greater than that reported by Radu-Rusu et al. (2008), Marcu et al. (2012) and Malik et al. (2016). In both groups, sex of the birds had a significant effect on the body weight of the chickens aged 42 days. Control males were 507 g (16.3%) heavier than females from the same group, whereas experimental males weighed 510 g (16.3%) more than experimental females. The group  $\times$  sex interactions for body weight were not significant (Table 4).

The data listed in Table 4 demonstrate that the use of EM probiotic preparations did not have a significant effect on body length, and a significant effect on total intestinal length, and intestine:body length ratio. In both groups, body weight, total intestinal length and intestine:body length ratio were significantly ( $P < 0.05$ ) greater in males than in females. The group  $\times$  sex interaction was not significant for the above traits. In an earlier study, Kokoszynski et al. (2017) observed smaller total intestinal length (251.4 cm) in Ross 308 chickens aged 42 days, and Gabriel et al. (2008) reported shorter small intestine in 44-day-old Ross PM3 males.

Our results revealed that the EM probiotic preparations had no significant effect on the length and diameter of individual intestinal segments. Regardless of the treatment, males had significantly longer individual segments of the small intestine and significantly smaller diameter of duodenum compared to females (Tables 5 and 6). The group  $\times$  sex interactions for

**Table 4.** Body weight, body and intestine length and their ratio in 42-day-old broiler chickens.

Group	Sex (n = 12)	Body weight (g)	Length (cm)		Intestine: Body length ratio
			Body	Intestine	
Control	Male	3120	29.9	282.5 <sup>b</sup>	9.4
	Female	2613	29.7	244.8 <sup>b</sup>	8.2 <sup>b</sup>
	Mean	2866*	29.8	263.7 <sup>b*</sup>	8.8 <sup>b*</sup>
Experimental	Male	3135	30.2	291.3 <sup>a</sup>	9.6
	Female	2635	29.8	268.1 <sup>a</sup>	9.0 <sup>a</sup>
	Mean	2880*	30.0	279.7 <sup>a*</sup>	9.3 <sup>a*</sup>
Pooled SE		45.4	0.2	3.9	0.1
Group		0.804	0.743	0.037	0.025
Sex		<0.001	0.088	0.001	0.022
Group $\times$ sex		0.990	0.397	0.402	0.763

\*Statistically significant differences determined between males and females in columns within group ( $P < 0.05$ ).

**Table 5.** Length of intestine segments in 42-day-old broiler chickens.

Group	Sex (n = 12)	Length (cm)				
		Duodenum	Jejunum	Ileum	Caecum	Rectum
Control	Male	34.5	97.8	96.5	45.7	8.0
	Female	31.8	80.2	82.6	42.5	7.7
	Mean	33.2*	89.0*	89.5*	44.1	7.9
Experimental	Male	37.0	99.0	99.7	47.8	7.8
	Female	32.7	88.8	95.2	43.1	8.3
	Mean	34.9*	93.9*	97.4	45.5	8.0
Pooled SE		0.5	1.6	1.6	0.9	0.3
Group		0.141	0.160	0.055	0.592	0.839
Sex		0.004	0.005	0.027	0.133	0.950
Group × sex		0.452	0.279	0.237	0.757	0.678

<sup>a,b</sup>Means of traits in columns within sexes, marked with different letters differ significantly ( $P < 0.05$ ).

\*Statistically significant differences determined between males and females in columns within group ( $P < 0.05$ ).

**Table 6.** Diameter of intestine segments in 42-day-old broiler chickens.

Group	Sex (n = 12)	Diameter (mm)				
		Duodenum	Jejunum	Ileum	Caecum	Rectum
Control	Male	11.8	11.4	9.0	10.1	8.2
	Female	13.6	10.4	9.0	9.3	7.8
	Mean	12.7*	10.9*	9.0	9.7	8.0
Experimental	Male	12.3	11.1	10.6	10.4	8.7
	Female	13.6	10.7	9.5	10.4	7.3
	Mean	13.0*	10.9*	10.1*	10.4	8.0
Pooled SE		0.2	0.2	0.2	0.2	0.3
Group		0.599	0.937	0.059	0.236	0.989
Sex		0.010	0.222	0.305	0.514	0.177
Group × sex		0.620	0.566	0.259	0.465	0.509

<sup>a,b</sup>Means of traits in columns within sexes, marked with different letters differ significantly ( $P < 0.05$ ).

**Table 7.** Weight of main internal organs in 42-day-old broiler chickens.

Group	Sex (n = 12)	Weight (g)				
		Liver	Heart	Proventriculus	Gizzard	Spleen
Control	Male	51.6	10.5	8.4	48.8	3.0
	Female	47.5	9.8	7.9	46.7	2.7
	Mean	49.6	10.2	8.2	47.8	2.9*
Experimental	Male	50.4	11.8	10.6	56.4	3.7
	Female	52.4	9.9	9.1	44.7	2.5
	Mean	51.4	10.9	9.9*	50.6*	3.1*
Pooled SE		0.9	0.2	0.2	1.4	0.1
Group		0.431	0.328	0.101	0.448	0.327
Sex		0.636	0.058	0.056	0.067	0.004
Group × sex		0.217	0.371	0.207	0.196	0.098

\*Statistically significant differences determined between males and females in columns within group ( $P < 0.05$ ).

length and diameter of the intestinal segments were not significant ( $P > 0.05$ ). Sato et al. (2002) observed that dietary addition of probiotic had no significant effect on intestine length and percentage in broiler chickens. Pelicia et al. (2004) found no significant differences in the length of individual segments of the small intestine (duodenum, jejunum, ileum) and the ratio of their weight to preslaughter body weight in 84-day-old free-range broiler chickens in response to a probiotic and prebiotic mixture of bacterial or/and yeast origin.

Tables 7 and 8 show that the use of EM probiotic preparations did not have a significant effect on the liver, heart, gizzard, and spleen weight and percentage, and on the proventriculus weight in preslaughter body weight. A significant effect of EM preparations was observed for proventriculus percentage. Regardless of the treatment, males had significantly higher weight of spleen and lower percentage of liver in body weight compared to females. For the weight and percentage

of internal organs, the group × sex interactions were not significant ( $P > 0.05$ ). An earlier experiment (Malik et al. 2016) found that commercial probiotics containing *Bacillus subtilis* powder had no significant effect on the percentage of liver, gizzard, heart, spleen, intestine and abdominal fat in 42-day-old broiler chickens. However, Mahajan et al. (1999) observed significantly higher giblets values in probiotic-supplemented broiler chickens. In turn, Kokoszyński et al. (2017) reported lower liver, heart, proventriculus and spleen percentage, and higher gizzard percentage in preslaughter body weight of 42-day-old Ross 308 chickens compared to the results of the present study. Higher liver percentage in preslaughter body weight was also obtained by Hernandez et al. (2004), Sharifi et al. (2012) and Hossain et al. (2012).

The administration of EM probiotic preparations to broiler chickens had no significant effect on the measurements of femur and tibia bones. Regardless of the group, males

**Table 8.** Percentage of main internal organs in 42-day-old broiler chickens.

Group	Sex (n = 12)	Content in body weight (%)				
		Liver	Heart	Proventriculus	Gizzard	Spleen
Control	Male	1.65	0.34	0.27 <sup>a</sup>	1.56	0.10
	Female	1.81	0.38	0.30 <sup>a</sup>	1.79	0.10
	Mean	1.73*	0.36	0.29 <sup>a</sup>	1.67	0.10
Experimental	Male	1.61	0.38	0.34 <sup>b</sup>	1.80	0.12
	Female	1.67	0.32	0.35 <sup>b</sup>	1.70	0.09
	Mean	1.64	0.35	0.34 <sup>b</sup>	1.76	0.11
Pooled SE		0.03	0.01	0.01	0.04	0.01
Group		0.451	0.489	0.002	0.562	0.106
Sex		0.003	0.533	0.314	0.625	0.210
Group × sex		0.203	0.447	0.366	0.221	0.493

<sup>a,b</sup>Means of traits in columns within sexes, marked with different letters differ significantly ( $P < 0.05$ ).

\*Statistically significant differences determined between males and females in columns within group ( $P < 0.05$ ).

**Table 9.** Dimensions of the femur bone of 42-day-old broiler chickens.

Group	Sex (n = 12)	Morphometric traits of femur bone (mm)						
		GL	ML	GB	GD	SM	GC	GE
Control	Male	75.4	73.5	19.7	16.1	10.2	21.2	16.6
	Female	74.8	72.6	18.5	16.7	9.8	20.3	16.5
	Mean	75.1	73.1	19.1	16.4	10.0	20.8	16.5
Experimental	Male	75.6	73.2	20.1	16.5	10.8	21.7	16.8
	Female	73.0	71.2	17.9	15.8	9.6	19.7	16.4
	Mean	74.3*	72.2*	19.0*	16.2	10.2*	20.7*	16.6
Pooled SE		0.3	0.4	0.2	0.2	0.1	0.2	0.2
Group		0.231	0.235	0.744	0.551	0.263	0.883	0.754
Sex		0.016	0.047	0.004	0.887	0.001	0.001	0.588
Group × sex		0.125	0.403	0.079	0.077	0.027	0.073	0.714

GL, greatest length; ML, medial length; GB, greatest breadth of proximal end; GD, greatest depth of proximal end; SM, smallest breadth of the corpus; GC, greatest breadth of the distal end; GE, greatest depth of distal end.

<sup>a,b</sup>Means of traits in columns within sexes, marked with different letters differ significantly ( $P < 0.05$ ).

\*Statistically significant differences determined between males and females in columns within group ( $P < 0.05$ ).

**Table 10.** Dimensions of the tibia bone of 42-day-old broiler chickens.

Group	Sex (n = 12)	Morphometric traits of tibia bone (mm)					
		GL	AL	GD	SB	SD	DD
Control	Male	98.7	97.1	26.2	7.6	19.9	14.3
	Female	98.1	96.1	25.1	7.5 <sup>a</sup>	18.9	13.8
	Mean	98.4	96.5	25.6	7.5	19.4	14.1
Experimental	Male	99.1	97.4	27.1	7.9	18.9	14.3
	Female	96.4	94.3	24.2	7.1 <sup>b</sup>	21.1	13.6
	Mean	97.7*	95.9*	25.7*	7.5*	19.8*	13.9*
Pooled SE		0.4	0.4	0.2	0.1	0.2	0.1
Group		0.418	0.374	0.962	0.722	0.278	0.470
Sex		0.040	0.013	0.001	0.001	0.001	0.002
Group × sex		0.202	0.188	0.007	0.021	0.008	0.481

GL, greatest length; AL, axial length; GD, greatest diagonal of the proximal end; SB, smallest breadth of the corpus; SD, smallest breadth of the distal end; DD, depth of the distal end.

<sup>a,b</sup>Means of traits in columns within sexes, marked with different letters differ significantly ( $P < 0.05$ ).

\*Statistically significant differences determined between males and females in columns within group ( $P < 0.05$ ).

showed significantly higher measurements for greatest length, medial length, greatest breadth of proximal end, smallest breadth of the corpus and greatest breadth of the distal end of femur bone (Table 9). The group × sex interactions were not significant for the analysed femur bone measurements except for the measurement of the smallest breadth of the

corpus of this bone. The analysis of tibia bone dimensions in the analysed broiler chickens (Table 10) showed a non-significant effect of administering EM probiotic preparations on tibia bone measurements. Regardless of the treatment, males had significantly greater tibia measurements compared to females. The group × sex interactions were not significant except for the interaction for the greatest diagonal of the proximal end, smallest breadth of the corpus and smallest breadth of the distal end of the tibia.

The results of microbiological determinations of caecal faeces are listed in Table 11. The analysis of the results showed decreases in the number of aerobic bacteria and lactic acid bacilli and an increase in total fungal count in

**Table 11.** Caecal microflora of 42-day-old broiler chickens.

Item	Group-cell count (cfu/ml)	
	Control	Experimental
Anaerobic bacteria	$3.1 \times 10^7$	$1.9 \times 10^7$
Lactic acid bacilli	$2.8 \times 10^{10}$	$2.3 \times 10^{10}$
Total fungal count	$5.4 \times 10^{10}$	$5.8 \times 10^{11}$

caecal faeces from 42-day-old chickens following the application of EM probiotic preparations.

Concluding, the use of EM probiotic preparations had a positive effect on the body weight and length, total intestinal length, and the length and diameters of intestinal segments in 42-day-old Ross 308 chickens. The EM probiotics had a significant effect on total intestine length, intestine–body length ratio and proventriculus percentage in body weight. Sex of birds had a significant effect on body weight, total intestinal length, length of the small intestine segments, intestine–body length ratio, spleen weight, liver percentage and almost all the measurements of femur and tibia bones.

## Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

## References

- Al-Baadani HH, Abudabos AM, Al-Mufarrej SI, Alzawqari M. 2016. Effects of dietary inclusion of probiotics, prebiotics and synbiotics on intestinal histological changes in challenged broiler chickens. *S Afr J Anim Sci.* 46:157–165.
- Bengmark S. 1998. Ecological control of the gastrointestinal tract – the role of probiotic flora. *Gut.* 42:2–7.
- Dalloul RA, Lilehoj HS, Tamim MM, Shellem TA, Doierr JA. 2005. Induction of local protective immunity to *Eimeria acervulina* by a *Lactobacillus*-based probiotic. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 28:351–361.
- Dhama K, Verme V, Sawant PM, Tiwari R, Vaid RK, Chauhan RS. 2011. Applications of probiotics in poultry enhancing immunity and beneficial effects on production performance and health – a review. *J Immunopath.* 13:1–19.
- Driesch A. 1976. A guide to the measurement of animal bone from archaeological sites. Peabody Museum Bulletin 1. Peabody Museum of Archaeology, and Ethology University of Harvard, 138 pp.
- Gabriel I, Mallet S, Leconte M, Travel A, Lalles JP. 2008. Effects of whole wheat feeding on the development of the digestive tract of broiler chickens. *Anim Feed Sci Technol.* 142:144–162.
- Gesek M, Sokol R, Lambert B, Ostrocka-Domagala I. 2018. Effect of effective microorganisms on intestine morphology and morphometry in Japanese quails. *Turk Vet Anim Sci.* 42:285–291.
- Hernandez T, Madrid J, Garcia V, Orengo J, Megias MD. 2004. Influence of two plant extracts on broilers performance, digestibility, and digestive organ size. *Poult Sci.* 83:169–174.
- Hossain EMD, Kim GM, Lee SK, Yang CJ. 2012. Growth performance, meat quality, oxidative stability and fatty acid composition of meat from broilers fed diets supplemented with a medicinal plant and probiotics. *Asian-Australas J Anim Sci.* 25:1159–1168.
- Jwher DMT, Abd SK, Mohammad AG. 2013. The study of using effective microorganisms (EM) on health and performance of broiler chicks. *Iraqi J Vet Sci.* 27:73–78.
- Kokoszynski D, Bernacki Z, Saleh M, Steczny K, Binkowska M. 2017. Body conformation and internal organs characteristics of different commercial broiler lines. *Braz J Poult Sci.* 19:47–52.
- Mahajan P, Sahoo J, Panda PC. 1999. Effects of probiotic feeding and seasons on the growth performance and carcass quality of broilers. *Indian J Poult Sci.* 34:167–176.
- Malik HEE, Hafzalla RHH, Ali OHA, Elhassan MM, Dousa OBM, Ali AM, Elamin K. 2016. Effect of probiotics and acidifiers on carcass yield, internal organs, cuts and meat to bone ration of broiler chicken. *IOSR J Agric Vet Sci.* 9:18–23.
- Marcu A, Vacaru-Opris I, Marcu A, Nicula M, Dronca D, Kelciov B. 2012. Effect of different levels of dietary protein and energy on the growth and slaughter performance at “Hybro PN+” broiler chickens. *Anim Sci Biotech.* 45:424–431.
- Mutus R, Kacabagli N, Alp M, Acar N, Eren M, Gezens SS. 2006. The effect of dietary probiotic supplementation on tibial bone characteristics and strength in broilers. *Poult Sci.* 85:1621–1625.
- Olnod CG, Beski SSM, Iji P, Choct M. 2015. Delivery routes for probiotics: Effects on broiler performance, intestinal morphology and gut microflora. *Anim Nutr.* 1:192–202.
- Parvaneh K, Jamaluddin R, Karimi G, Erfani R. 2014. Effect of probiotics supplementation on bone mineral content and bone mass density. *Scientific World J.* 2014:1–6.
- Pelicia K, Mendes AA, Saldanha ESPB, Pizzolante CC, Takahashi SE, Moreira J, Garcia RG, Quinteiro RR, Paz ICLA, Komiyama CM. 2004. Use of prebiotics and probiotics of bacterial and yeast origin for free-range broiler chickens. *Braz J Poult Sci.* 6:163–169.
- Przenioslo-Siwczynska M, Kwiatek K. 2013. Why has antibiotic growth promoters been banned in animal nutrition? *Vet Life.* 88:104–108.
- Radu-Rusu RM, Vacaru-Orpis I, Radu-Rusu CG. 2008. Quantitative and qualitative features of meat production in Cobb 500 chicken hybrid. *Lucrari Stiintifice.* 4:690–697.
- SAS Institute. 2014. SAS/STAT user’s guide, version 9.4. Cary.
- Sato RN, Loddi MM, Nakaghi LSO. 2002. Use of antibiotic and/or probiotic as growth promoters in initial rations of chickens. *Braz J Poult Sci.* 4 (suppl.):37.
- Sharifi SD, Sharia Timadari F, Yaghobfar A. 2012. Effect of inclusion of hull-less barley and enzyme supplementation of broiler diet on growth performance, nutrient digestion and dietary metabolizable energy content. *J Centr Eur Agric.* 13:193–207.
- Souza de LFA, Araujo DN, Stefani LM, Giometti IC, Cruz-Polycarpo VC, Polycarpo G, Burbarelli MF. 2018. Probiotics on performance, intestinal morphology and carcass characteristics of broiler chickens raised with lower or higher environmental challenge. *Austral J Vet Sci.* 50:35–41.
- Swiatkiewicz S, Koreleski J. 2007. Feed additives with immunomodulatory acting in poultry feeding. *Vet Med.* 63:1291–1295.
- Takahashi SE, Mendes AA, Saldanha ESPB, Pizzolante CC, Delicia K, Quinteiro RR, Komiyama CM, Garcia RG, Almeida Paz CL. 2005. Efficiency of prebiotics and probiotics on the performance, yield, meat quality and presence of *Salmonella* spp. in carcass of free-range broiler chickens. *Braz J Poult Sci.* 7:151–157.
- Willis WL, Reid L. 2008. Investigating the effects of dietary probiotic feeding regiment on broiler chicken production and *Camphylobacter jejuni* presence. *Poult Sci.* 87:606–611.
- Wondmeneh E, Getachew T, Dessie T. 2011. Effect of effective microorganisms (EM) on the growth performance of Fayoumi and Horro chicks. *Int J Poult Sci.* 10:185–188.
- Yang Y, Iji PA, Choct M. 2009. Dietary modulation of gut microflora in broiler chickens: a review of the role of six kinds of alternatives to in-feed antibiotics. *Worlds Poult Sci J.* 65:97–114.
- Yegani M, Korver DR. 2008. Factors affecting intestinal health in poultry. *Poult Sci.* 87:2052–2063.
- Zamanzad S, Ghavidel K, Nazer AN, Maheri SS, Mirzaei-Aghsaghall AA, Mohammadian M, Siata SA. 2011. Effects of *Lactobacillus* based probiotic on growth performance, mortality rate and carcass yield in broiler chickens. *Ann Biol Res.* 2:325–331.
- Ziaie H, Bashtani M, Karimi Torshizi MA, Naeemipour H, Farhangfar H, Zeinali A. 2011. Effect of antibiotic and its alternatives on morphometric characteristics, mineral content and bone strength of tibia in Ross broiler chickens. *Glob Vet.* 7:315–322.





## 6.2. OŚWIADCZENIE AUTORA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr inż. Kamil Paweł Stęczny

(tytuł zawodowy, imiona i nazwisko autora rozprawy doktorskiej)

Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy w Bydgoszczy

(miejsce pracy/afiliacja)

### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, iż mój wkład autorski w niżej wymienionych artykułach naukowych stanowiących cykl publikacji rozprawy doktorskiej był następujący\* :

1. Kamil Stęczny, Dariusz Kokoszyński, Effect of probiotic preparations (EM) on productive characteristics, carcass composition and microbial contamination in a commercial broiler chicken farm, Animal Biotechnology (Taylor & Francis), 2020, DOI:10.1080/10495398.2020.1754841, pkt. MNiSW 40, IF = 1,487.

Wykonane zadania przez Doktoranta w ramach artykułu: 70%

- a) opracowanie koncepcji badań
- b) uczestnictwo w pracach badawczych
- c) napisanie publikacji
- d) współautorstwo odpowiedzi na recenzje

2. Kamil Stęczny, Dariusz Kokoszyński, Effects of probiotics and sex on physicochemical, sensory and microstructural characteristics of broiler chicken meat, Italian Journal of Animal Science (Taylor & Francis), 2019, 18 (1), 1385-1393, DOI:10.1080/1828051X.2019.1667269, pkt. MNiSW 40, IF=1,805.

Wykonane zadania przez Doktoranta w ramach artykułu: 70%

- a) opracowanie koncepcji badań
- b) uczestnictwo w pracach badawczych
- c) napisanie publikacji
- d) współautorstwo odpowiedzi na recenzje

3. Kamil Stęczny, Dariusz Kokoszyński, Effect of probiotic preparations (EM) and sex on morphometric characteristics of the digestive system and leg bones, and caecal microflora in broiler chickens, 2020, Journal of Applied Animal Research (Taylor & Francis), 48, 1, 45-50, pkt. MNiSW 70, IF=1,248.

Wykonane zadania przez Doktoranta w ramach artykułu: 70%

- a) opracowanie koncepcji badań
- b) uczestnictwo w pracach badawczych
- c) napisanie publikacji
- d) współautorstwo odpowiedzi na recenzje



Podpis Autora rozprawy doktorskiej



Podpis promotora

Bydgoszcz 16.11.2020

### 6.3. OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

dr hab. inż. Dariusz Józef Kokoszyński  
(tytuł zawodowy, imiona i nazwisko współautora)

Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy w Bydgoszczy  
(miejsce pracy/afiliacja)

#### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, iż mój wkład autorski w niżej wymienionym/wymienionych artykule/artykułach naukowym/naukowych był następujący\*:

1. Kamil Stęczny, Dariusz Kokoszyński, Effect of probiotic preparations (EM) on productive characteristics, carcass composition and microbial contamination in a commercial broiler chicken farm, Animal Biotechnology (Taylor & Francis), 2020, DOI10.1080/10495398.2020.1754841, pkt. MNiSW 40, IF=1,487.

Wykonane zadania w ramach artykułu: 30%

- a) korekta treści artykułu naukowego
- b) współautorstwo w napisaniu odpowiedzi na recenzję

2. Kamil Stęczny, Dariusz Kokoszyński, Effects of probiotics and sex on physicochemical, sensory and microstructural characteristics of broiler chicken meat, Italian Journal of Animal Science (Taylor & Francis), 2019, 18 (1), 1385-1393, DOI:10.1080/1828051X.2019.1667269, pkt. MNiSW 40, IF=1,805.

Wykonane zadania w ramach artykułu: 30%

- a) korekta treści artykułu naukowego
- b) współautorstwo w napisaniu odpowiedzi na recenzję

3. Kamil Stęczny, Dariusz Kokoszyński, Effect of probiotic preparations (EM) and sex on morphometric characteristics of the digestive system and leg bones, and caecal microflora in broiler chickens, 2020, Journal of Applied Animal Research (Taylor & Francis), 48, 1, 45-50, pkt. MNiSW 70, IF=1,248.

Wykonane zadania w ramach artykułu: 30%

- a) korekta treści artykułu naukowego
- b) współautorstwo w napisaniu odpowiedzi na recenzję

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie wyżej wymienionych prac przez mgr inż. Kamila Stęczonego jako część rozprawy doktorskiej opartej na zbiorze opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych.

Bydgoszcz, 16.11.2020

  
.....  
Podpis współautora