

**POLITECHNIKA
BYDGOSKA**
im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich

**RADA NAUKOWA DYSCYPLINY
ZOOTECHNIKA I RYBACTWO**

ROZPRAWA DOKTORSKA

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

mgr inż. Patrycja Reszka

**WPŁYW POŻYTECZNYCH MIKROORGANIZMÓW EM
NA WYNIKI PRODUKCYJNE, ŚLUZÓWKĘ JELITA CZCZEGO
ORAZ JAKOŚĆ MIĘSA ŚWIŃ**

*The influence of effective microorganisms EM
on the production traits, jejunum mucosa
and meat quality of pigs*

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

PROMOTOR

DR HAB. INŻ. JOANNA BOGUCKA, PROF. PBŚ
KATEDRA FIZJOLOGII ZWIERZĄT I ZOOFIZJOTERAPII
WYDZIAŁ HODOWLI I BIOLOGII ZWIERZĄT
POLITECHNIKA BYDGOSKA IM. J. J. ŚNIADECKICH W BYDGOSZCZY

PROMOTOR POMOCNICZY

DR HAB. INŻ. HANNA JANKOWIAK, PROF. PBŚ
KATEDRA HODOWLI I ŻYWIENIA ZWIERZĄT
WYDZIAŁ HODOWLI I BIOLOGII ZWIERZĄT
POLITECHNIKA BYDGOSKA IM. J. J. ŚNIADECKICH W BYDGOSZCZY

**BYDGOSZCZ
2021**

Podziękowania

*Serdeczne podziękowania kieruję do Pani Promotor,
dr hab. inż. Joanny Boguckiej, profesor PBS, której pomoc
w powstaniu niniejszej rozprawy doktorskiej jest nieoceniona.
Dziękuję za zaufanie, poświęcony mi czas i cenne merytoryczne wskazówki.*

*Serdeczne podziękowania kieruję do pomocniczej Pani Promotor,
dr hab. inż. Hanny Jankowiak, profesor PBS,
za cenną merytoryczną pomoc i wsparcie.*

*Dziękuję również moim rodzicom, rodzeństwu, narzeczonemu
i przyjaciółom za ogromne wsparcie i wiarę we mnie
w ciągu ostatnich, intensywnych lat.*

SPIS TREŚCI

1. Wstęp	7
2. Wykaz artykułów naukowych stanowiących cykl publikacji rozprawy doktorskiej	9
3. Uzasadnienie spójności tematycznej cyklu publikacji rozprawy	10
3.1. Hipoteza badawcza, cel i zakres badań	11
3.1.1. Hipoteza badawcza	11
3.1.2. Cel i zakres badań	11
3.2. Materiał i metody badań	12
3.2.1. Żywienie i utrzymanie zwierząt	12
3.2.2. Histomorfologia jelita czczego świń	15
3.2.3. Analiza ekspresji genów	16
3.2.4. Jakość mięsa świń	17
3.2.5. Mikrostruktura mięśnia <i>longissimus lumborum</i> (LL) świń	18
3.2.6. Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym z siarczanem dodecylu sodu (SDS-PAGE)	19
3.2.6.1. Przygotowanie próbek do analizy	19
3.2.6.2. Elektroforeza żelowa	19
3.2.6.3. Analiza obrazu	19
3.2.7. Analiza statystyczna	20
3.3. Wyniki	21
3.3.1. Wyniki produkcyjne świń	21
3.3.2. Histomorfologia jelita czczego świń	22
3.3.3. Ekspresja genów	24
3.3.4. Jakość mięsa świń	24
3.3.5. Mikrostruktura mięśnia <i>longissimus lumborum</i> świń	26
3.3.6. Udział białek tkanki mięśniowej w mięśniu <i>longissimus lumborum</i>	28
3.4. Dyskusja	31
3.4.1. Wyniki produkcyjne świń	31
3.4.2. Histomorfologia jelita czczego świń	31
3.4.3. Ekspresja genów	32
3.4.4. Jakość mięsa świń	33
3.4.5. Mikrostruktura mięśnia <i>longissimus lumborum</i> świń	34
3.4.6. Udział białek tkanki mięśniowej w mięśniu <i>longissimus lumborum</i>	35
3.5. Podsumowanie	38
3.6. Literatura	39
4. Streszczenie	46
5. Abstract	48
6. Załączniki	50
6.1. Kopie artykułów naukowych stanowiących cykl publikacji rozprawy doktorskiej ..	50
6.2. Oświadczenie Autora rozprawy doktorskiej	77
6.3. Oświadczenia Współautorów artykułów naukowych	79

1. WSTĘP

Głównym celem stosowania antybiotyków jako dodatków do pasz dla zwierząt gospodarskich było przeciwdziałanie schorzeniom przewodu pokarmowego, powodowanym przez patogenną mikroflorę, wpływając tym samym na parametry odchowu, takie jak masa ciała, przyrosty dobowe oraz czas trwania tuczu. Jednakże, ich stosowanie przyczyniało się m. in. do rozwoju zjawiska antybiotykooporności bakterii. Stało się to podstawą do wprowadzenia w styczniu 2006 roku zakazu stosowania antybiotyków jako stymulatorów wzrostu. Wszelkie suplementy diety (m. in. probiotyki, prebiotyki, synbiotyki, zioła) stały się obiektem zainteresowań naukowców i przedmiotem wielu badań prowadzonych w celu znalezienia skutecznej alternatywy. Koncepcja probiotyków została pierwotnie opracowana przez Metchnikoff (1907), gdzie wskazano ich korzystny wpływ na zwierzę-żywicielea poprzez poprawę równowagi mikrobiologicznej w jelitach. Probiotyki są preparatami zawierającymi zdefiniowane, żywe mikroorganizmy, które podawane w odpowiednich ilościach zasiedlają przewód pokarmowy, wywierając korzystny wpływ na organizm gospodarza (Liao i Nyachoti, 2017). Prowadzone w ostatnich latach badania nad skutecznością działania efektywnych mikroorganizmów (EM) wykazały ich dodatni wpływ na parametry wzrostu (Guerra i wsp., 2007; Giang i wsp., 2011), współczynnik konwersji paszy (Davis i wsp., 2008; Ganeshkumar i wsp., 2009), zdrowotność jelit, zwiększoną odporność na choroby, lepszą absorpcję składników odżywczych (Delia i wsp., 2012), jakość tuszy (Sudikas i wsp., 2010) i jakość mięsa, m. in. soczystość, sprężystość, kruchość oraz barwę (Jukna i wsp., 2005; Suo i wsp., 2012; Meng i wsp., 2010). Uważa się, że bakterie probiotyczne wspomagają szczelność nabłonka jelitowego, zmniejszając tym samym podatność na choroby, poprzez wzrost pożądanych bakterii jelitowych, produkcję określonych substancji bioaktywnych (np. bakteriocyn) oraz mikro-środowiskowe obniżenie pH poprzez produkcję kwasów (Delia i wsp., 2012). W produkcji probiotyków dla zwierząt hodowlanych najczęściej stosowanymi mikroorganizmami są: *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. brevis*, *L. plantarum*, *Bifidobacterium bifidum*, *B. lactis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *S. boulardii*, *Aspergillus oryzae*, *Bacillus cereus*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *Enterococcus faecium* i *Pediococcus pentosaceus*. Wszystkie wymienione gatunki bakterii i drożdży cechuje odporność na warunki panujące w przewodzie pokarmowym oraz zdolność do kolonizacji i namnażania w jelitach (Ohashi i Ushida, 2009; Verdenelli i wsp., 2009). Mikrobiota jelitowa bierze udział w ochronie przed patogenami (*Escherichia coli*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Clostridium* i *Rotavirus*), dlatego też stosowanie EM może być skuteczne w ich zwalczaniu (Delia i wsp., 2012). Probiotyki ograniczają występowanie bakterii z grupy *Escherichia coli*, zapobiegając produkcji amin, które są toksyczne i mogą podrażniać jelita, doprowadzając do biegunek (Patel i wsp., 2012). Bakterie zasiedlające przewód pokarmowy mogą również modyfikować mikrostrukturę jelit i układ immunologiczny poprzez zwiększone wytwarzanie przeciwciał (Ng i wsp., 2009).

Zmiany morfometryczne i funkcjonalne jelit oraz mikrostruktury mięsa i jakości mięsa są spowodowane czynnikami żywieniowymi (składniki diety, zawartość błonnika, system i metody żywienia) (Babinska i wsp., 2005; Balasubramanian i wsp., 2016; Bocian i wsp., 2016; Bogucka i wsp., 2019; Brzobohatý i wsp., 2013; Chang i wsp., 2018; Rekiel i wsp., 2010; Zhou i wsp., 2015).

W przewodzie pokarmowym zwierząt, którego główną funkcją jest trawienie i wchłanianie składników odżywczych, żyją bogate i złożone zbiorowiska bakterii. Nagromadzenie mikroorganizmów jest związane z dużą ilością niestrawionych składników pokarmowych i endogennych (śluzu, enzymów) podatnych na fermentację mikrobiologiczną. Układ ten jest nieustannie narażony na wpływy środowiska, a zatem na jego skład i funkcje wpływają czynniki zewnętrzne. Zaburzenia prawidłowego funkcjonowania mikrobioty w przewodzie pokarmowym mogą wywoływać szereg chorób, których

następstwem będzie pogorszenie trawienia i przyswajania składników odżywczych. Przyleganie patogenów do powierzchni błony śluzowej i zaburzenia mikroflory stanowią pierwszy etap infekcji jelitowych. Ochronna rola EM polega na adhezji i namnażaniu ich na powierzchni błony śluzowej, stanowiąc konkurencję dla patogenów o miejsce przylegania i składniki odżywcze (Arnall i Lallès, 2016; Collado i wsp., 2007). Ponadto, następstwem korzystnego oddziaływania EM na błonę śluzową jelita cienkiego i przyswajalność składników odżywczych jest poprawa parametrów wzrostu świń, a także mikrostruktury mięśni (Bogucka i wsp., 2019; van der Aar i wsp., 2017).

W 2020 roku światowa produkcja wieprzowiny, która jest najczęściej wybieranym mięsem przez konsumentów, zarówno w krajach Unii Europejskiej, jak i na świecie, wyniosła około 94,330 mln ton, w tym 24,150 mln ton w UE, która zajmuje drugie miejsce. Liderem są Chiny znajdujące się na pierwszym miejscu (34,000 mln ton) i Stany Zjednoczone plasujące się na trzeciej pozycji (13,176 mln ton) (www.statista.com). Wieprzowina zawarta w diecie człowieka korzystnie wpływa na stan zdrowotny skóry, oczu, układ szkieletowy i nerwowy, a także stan psychiczny człowieka, o ile jest spożywana w odpowiednich ilościach (Singh i wsp., 2003; Nistor i wsp., 2012). W dzisiejszych czasach dużą uwagę przywiązuje się do bezpieczeństwa żywności, co wynika z wysokich oczekiwań konsumentów. Niestety, wieprzowina może być potencjalnym źródłem bakterii chorobotwórczych, takich jak *Salmonella spp.*, *Toxoplasma gondii*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter spp.* oraz *Staphylococcus aureus*, co wynika z dużego zagęszczenia zwierząt na jednostkę powierzchni. Zatem, ograniczenie namnażania patogennej mikroflory w organizmie zwierzęcia jest priorytetem współczesnej hodowli. Uzyskanie bezpiecznej wieprzowiny, wolnej od patogenów, o odpowiednich walorach dietetycznych, jest możliwe dzięki zastosowaniu EM, jako suplementu diety (Baer i wsp., 2013; Kurchaeva i wsp., 2018). Z drugiej strony, intensywne selekcje hodowlane prowadzone w ostatnich latach, mająca na celu uzyskanie wyższej mięsności tuczników, prowadzi do zwiększonego występowania zmian histopatologicznych w mięśniach, takich jak zmiana wielkości włókien (atrofia, hipertrofia) oraz ich kształtu, rozszczepienia włókien (tzw. *splittingu*), a także martwicy włókien (Bogucka i wsp., 2007; Migdał i wsp., 2005). Na mikrostrukturę mięśnia wpływ mają również uwarunkowania genetyczne, żywienie i masa ciała świń (Choi i Kim, 2009; Bogucka i Kapelański, 2005; Bogucka i Kapelański, 2016; Brzobohatý i wsp., 2013; Lebedová i wsp., 2018; Pisula i Pospiech, 2011).

2. WYKAZ ARTYKUŁÓW NAUKOWYCH STANOWIĄCYCH CYKL PUBLIKACJI ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

1. **(P-1) Reszka P.**, Dunisławska A., Sławińska A., Siwek M., Kapelański W., Bogucka J. Influence of the effective microorganisms (EM) on performance, intestinal morphology, and gene expression in the jejunal mucosa of pigs fed different diets. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 2020, 104, 5, 1444-1453, DOI: 10.1111/jpn.13404, Punktacja MNiSW = 100 pkt., *Impact Factor* = 1,597.
2. **(P-2) Reszka P.**, Cygan-Szczegielniak D., Jankowiak H., Cebulska A., Mikołajczak B., Bogucka J. Effects of effective microorganisms on meat quality, microstructure of the *longissimus lumborum* muscle, and electrophoretic protein separation in pigs fed on different diets. *Animals* 2020, 10, 10, 1-16, DOI: 10.3390/ani10101755, Punktacja MNiSW = 100 pkt., *Impact Factor* = 2,323.

3. UZASADNIENIE SPÓJNOŚCI TEMATYCZNEJ CYKLU PUBLIKACJI ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Niniejsza rozprawa doktorska dotyczy oceny wpływu probiotyku EM Bokashi zawierającego efektywne mikroorganizmy na histomorfologię jelita czczego i ekspresję genów w jego błonie śluzowej (**P-1**) oraz jakość mięsa, mikrostrukturę mięśnia *longissimus lumborum* i elektroforetyczny rozdział białek w mięśniu świń (**P-2**).

Wprowadzenie powyższego preparatu do diety świń może wywołać korzystne zmiany w strukturze jelita czczego, poprawiając tym samym trawienie i wchłanianie składników pokarmowych. Z kolei, te zmiany mogą pozytywnie wpływać na mikrostrukturę mięśnia, umożliwiając uzyskanie wysokojakościowej wieprzowiny, co jest niezwykle istotne również z praktycznego punktu widzenia. Ponadto, wieloszczepowe preparaty probiotyczne, będące jedną z najczęściej wybieranych dodatków paszowych, posiadają szereg innych zalet, m.in. zwiększają odporność na stres, skracają czas rekonwalescencji po antybiotykoterapii, a także poprawiają ogólną zdrowotność zwierząt poprzez zasiedlanie przewodu pokarmowego pożądanymi bakteriami, które poprzez obniżanie pH środowiska, ograniczają rozwój patogenów.

Rozprawa doktorska składająca się z cyklu publikacji powstała na bazie tego samego doświadczenia przeprowadzonego na czterorasowych tucznikach (♀ pbz x wbp z ♂ pietrain x duroc) w Stacji Kontroli Użytkowości Rzeźnej Trzody Chlewnej w Melnie. Pierwsza publikacja opierała się na wynikach uzyskanych z analizy próbek jelita czczego (**P-1**), natomiast druga – mięśnia *longissimus lumborum* (**P-2**). Zwierzęta dodatkowo podzielono na 3 grupy w zależności od zastosowanego systemu żywienia. W pierwszej grupie (C) zwierzęta żywiono standardowo z zastosowaniem poekstrakcyjnej śruty sojowej (100%), natomiast w I wariacie żywieniowym (grupa E1) i II wariacie żywieniowym (grupa E2) soję zastąpiono w różnym stopniu krajowymi źródłami białka, tj. grochem i łubinem. Wykorzystanie roślin strączkowych miało na celu określenie czy mogą być one skutecznie wykorzystywane, jako zamienniki drogiej, importowanej soi oraz wskazanie, w połączeniu z którą z zastosowanych diet dodatek EM przyniesie najlepsze efekty.

Niniejsze doświadczenie pozwoliło zweryfikować i pogłębić dotychczasową wiedzę na temat wpływu EM na organizm świni.

3.1. HIPOTEZA BADAWCZA, CEL I ZAKRES BADAŃ

3.1.1. Hipoteza badawcza

1. Dodatek efektywnych mikroorganizmów (EM) w diecie świń wpływa korzystnie na parametry produkcyjne oraz cechy histomorfologiczne jelita czczego i ekspresję genów w jego błonie śluzowej w konsekwencji zwiększonego wchłaniania substancji pokarmowych oraz poprawy zdrowotności jelita (**P-1**).

2. Dodatek EM poprzez poprawę funkcjonalności jelita cienkiego może przyczynić się do zmian w mikrostrukturze mięśni szkieletowych świń, a następnie jakości mięsa (**P-2**).

3.1.2. Cel i zakres badań

Celem ogólnym niniejszej rozprawy doktorskiej było określenie wpływu efektywnych mikroorganizmów na: parametry produkcyjne, cechy morfologiczne jelita czczego oraz ekspresję genów w błonie śluzowej jelita czczego (**P-1**), a także jakość mięsa, mikrostrukturę mięśnia *longissimus lumborum* (*LL*) i elektroforetyczny rozdział wybranych białek w mięśniu (**P-2**) świń żywionych różnymi dietami.

Cele szczegółowe:

(P-1) Celem eksperymentu była ocena potencjału trawiennego jelita wskutek zmian zachodzących w strukturze jelita czczego, a także ekspresji genów związanych z metabolizmem i funkcjonowaniem przewodu pokarmowego pod wpływem suplementacji probiotycznej.

(P-2) Celem eksperymentu była analiza zmian w udziale poszczególnych typów włókien mięśniowych, ich średnicy i gęstości, udziale tłuszczu śródmięśniowego, występowaniu zmian patologicznych oraz podstawowych parametrów jakości mięsa pod wpływem suplementacji probiotycznej.

3.2. MATERIAŁ I METODY BADAŃ

3.2.1. Żywnienie i utrzymanie zwierząt

Doświadczenie przeprowadzono w Stacji Kontroli Użytkowości Rzeźnej Trzody Chlewnej w Melnie. Badaniami objęto 150 czterorasowych warchlaków pochodzących z krzyżowania ♀ F1 (pbz x wbp) z ♂ F1 (pietrain x duroc). Początkowa masa ciała była zbliżona i wynosiła ok. 30 kg. Zwierzęta umieszczono w dwóch oddzielnych pomieszczeniach - kontrolnym (grupy: C, E1, E2) i doświadczalnym (grupy: C+EM, E1+EM, E2+EM), o identycznej konstrukcji i wyposażeniu. Zwierzęta oznakowano i umieszczono w jednakowych kojcach, wyposażonych w autokarmnik i automatyczne poidło smoczkowe, pozwalające na stały dostęp do wody (**P-1, P-2**).

Tuczniaki podzielono na trzy główne grupy w zależności od zastosowanego sposobu żywienia – C, E1 i E2 (tabela 1). Następnie, zwierzęta podzielono na podgrupy: żywione bez dodatku probiotyku (kontrolne) - C, E1 i E2, oraz żywione z dodatkiem probiotyku (doświadczalne) - C+EM, E1+EM, E2+EM, w celu oceny wpływu suplementacji EM Bokashi. W I fazie tuczu probiotyk EM Bokashi podawano w ilości 5 kg na 1 tonę paszy, natomiast w II fazie tuczu w ilości 3 kg na 1 tonę paszy. Wartość dietetyczną oraz skład skarmianych pasz przedstawiono w tabeli 2. Natomiast skład preparatu EM Bokashi przedstawiono w tabeli 3 (**P-1, P-2**).

Tabela 1. Układ doświadczenia

C		E1 – I wariant żywieniowy		E2 – II wariant żywieniowy	
C	C+EM	E1	E1+EM	E2	E2+EM
n=25	n=25	n=25	n=25	n=25	n=25
♂ 13 ♀ 12	♂ 12 ♀ 13	♂ 12 ♀ 13	♂ 13 ♀ 12	♂ 13 ♀ 12	♂ 12 ♀ 13

Grupa C - żywienie standardowe w oparciu o poekstrakcyjną śrutę sojową w I i II fazie tuczu (100%); grupa E1 i E2 – w pierwszej fazie tuczu żywienie z udziałem 50% soi i 50% grochu i łubinu; grupa E1 – w II fazie tuczu 25% soi i 75% grochu i łubinu; grupa E2 - w II fazie tuczu białko soi zastąpiono w 100% grochem i łubinem; grupy doświadczalne, żywione z dodatkiem probiotyku - C+EM, E1+EM, E2 + EM

Tabela 2. Wartość dietetyczna i skład skarmianych pasz

Wartość dietetyczna	C		E1		E2	
	I faza tuczu (30-70 kg)	II faza tuczu (70-115 kg)	I faza tuczu (30-70 kg)	II faza tuczu (70-115 kg)	I faza tuczu (30-70 kg)	II faza tuczu (70-115 kg)
Sucha masa, g	877	875	877	875	877	875
Energia metaboliczna, MJ	13,39	13,11	13,32	13,09	13,32	13,12
Białko ogólne, g	170	159	171	157	171	160
Tłuszcz, g	27	20	29	20	29	20
Lizyna, g	10,6	9,7	10,6	9,7	10,6	9,7
Wapń, g	5,9	5,8	5,9	5,8	5,9	5,8
Fosfor, g	5,3	5,2	5,3	5,2	5,3	5,2
Sód, g	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7
Witamina A, IU	10 000	10 000	10 000	10 000	10 000	10 000
Witamina D, IU	2 200	2 200	2 200	2 200	2 200	2 200
Witamina E, IU	80	80	80	80	80	80
Skład paszy, %						
Śruta sojowa 46% BO	16,00	12,00	10,00	4,00	10,00	-
Pszenica 12%	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00

Jęczmień 12%	35,00	45,00	30,00	41,00	30,00	35,00
Pszenżyto 10%	25,30	20,00	26,00	20,00	26,00	20,00
Olej sojowy	1,00	0,30	1,30	0,30	1,30	0,30
Łubin 37%	-	-	7,00	9,00	7,00	12,0
Groch 21%	-	-	3,00	3,00	3,00	10,00
PORKOVITAL T GROCH 2.5%	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50
SELACID GG DRY 25 BR	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
Razem	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

Tabela 3. Skład EM Bokashi (Laskowska i wsp., 2019)

	Skład drobnoustrojów	Zawartość na gram produktu
1.	<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	5×10^4 JTK/g
2.	<i>Lactobacillus casei</i>	5×10^8 JTK/g
3.	<i>Lactobacillus plantarum</i>	5×10^8 JTK/g
4.	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.5×10^6 JTK/g
5.	<i>Enterococcus faecium</i>	5×10^9 JTK/g
6.	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	5×10^8 JTK/g
7.	<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>	5×10^8 JTK/g
8.	<i>Bacillus licheniformis</i>	4×10^9 JTK/g
9.	<i>Bacillus cereus var. toyoi</i>	4×10^9 JTK/g
10.	<i>Bacillus subtilis</i>	4×10^{11} JTK/g
11.	<i>Clostridium butyricum</i>	1×10^8 JTK/g

JTK- jednostka tworząca kolonię

Zebrane dane w trakcie tuczu pozwoliły na obliczenie: początkowej i końcowej masy ciała, czasu trwania tuczu, średnich przyrostów dobowych, przyrostów całkowitych masy ciała oraz zużycia paszy na 1 kg przyrostu (**P-1**). Tuczniaki o masie ciała około 115 kg poddano ubojowi w zakładach mięsnych, zgodnie z obowiązującą procedurą (**P-1**, **P-2**).

3.2.2. Histomorfologia jelita czczego świń

Do badań histologicznych próbki jelita czczego (ok. 3 cm) pobrano bezpośrednio po uboju (**P-1**). Następnie utrwalono je w 4% formalinie zobojętnionej CaCO_3 , odwodniono, prześwietlono i przepojono parafiną w procesorze tkankowym (Thermo Shandon, Wielka Brytania). Następnie próbki zatopiono w bloczki parafinowe przy użyciu stacji do zatapiania (Medite, Niemcy) i skrawano na mikrotomie rotacyjnym (Thermo Shandon, Wielka Brytania) na skrawki o grubości 10 μm . Skrawki umieszczano na szkiełkach podstawowych powleczonych białkiem jaja kurzego z dodatkiem gliceryny. Preparaty odparafinowano oraz nawodniono przed barwieniem. Następnie wykonano barwienie PAS (Periodic Acid-Schiff). Pomiar wysokości i szerokości kosmków jelitowych, grubości błony śluzowej oraz głębokości krypt jelitowych wykonano za pomocą mikroskopu Delta Optical Evolution 300 wyposażonego w kamerę TouPCam™ i programu do komputerowej analizy obrazu mikroskopowego MultiScan18.03 (Computer Scanning Systems II, Warszawa, Polska). Pomiar wysokości

kosmków jelitowych wykonano na 10 losowo wybranych kosmkach z przekroju poprzecznego jelita. Długość kosmka mierzono od jego szczytu do podstawy, w miejscu ujścia krypty jelitowej. Szerokość kosmka mierzono w połowie jego wysokości. Powierzchnię kosmków obliczono według wzoru podanego przez Rubio i wsp. (2010): $3,1416 \times sk \times wk$, gdzie sk - szerokość kosmka, wk - wysokość kosmka. Grubość śluzówki określono jako odległość między nabłonkiem śluzówki a warstwą mięśniową. Głębokość krypt jelitowych była mierzona między 10 kosmkami (Uni i wsp., 1998). Liczbę komórek kubkowych obojętnych, PAS-pozytywnych obliczono na powierzchni 10 losowo wybranych kosmków jelitowych i wyrażono jako średnią liczbę komórek kubkowych na 1 kosmek jelitowy (**P-1**).

3.2.3. Analiza ekspresji genów

Błonę śluzową jelita czczego pobrano od 5 osobników z każdej grupy i utrwalono w buforze stabilizującym RNA (fixRNA EURx, Gdańsk, Polska) (**P-1**). Izolację RNA przeprowadzono przy pomocy odczynnika TRIzol® LS (Ambion/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), w którym tkankę homogenizowano za pomocą homogenizatora TissueRuptor (Qiagen GmbH, Hilden, Niemcy). Dodatkowego oczyszczenia RNA dokonano przy pomocy komercyjnego zestawu z kolumnami (Universal RNA Purification Kit, EURx, Gdańsk, Polska). Analizę jakościową i ilościową wyizolowanego RNA przeprowadzono przy pomocy rozdzielania elektroforetycznego w 2% żelu agarozowym oraz pomiaru absorbancji przy użyciu NanoDrop 2000 (Scientific Nanodrop Products, Wilmington, USA). Przy użyciu zestawu Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit do RT-qPCR (ThermoScientific/ Fermentas, Wilno, Litwa) dokonano syntezy cDNA zgodnie z protokołem producenta. Uzyskany cDNA rozcieńczono do 70 ng/μl i przeznaczono do dalszej analizy. Reakcje RT-qPCR prowadzono w całkowitej objętości 10 μl. Mieszanina reakcyjna zawierała Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (ThermoScientific/Fermentas, Wilno, Litwa), 1 μM startera sensownego (ang. forward), 1 μM startera antysensownego (ang. reverse) i 2 μl rozcieńzonego cDNA (140 ng). Analiza ekspresji genów została przeprowadzona dla wytypowanego panelu genów związanych z układem immunologicznym (*IL10*, *IL1B*), metabolizmem kwasów tłuszczowych (*FABP4*, *FFAR2*), transportem glukozy (*GLUT1*, *GLUT2*, *GLUT5*), kodujących białka związane z połączeniami szczelinowymi (*CLDN1*, *TJAP1*) oraz genu kodującego glikoproteinę (*MUC6*). Jako geny referencyjne zastosowano *ACTB* i *RPL4* (**P-1**), które wytypowano na podstawie danych literaturowych. Startery do reakcji qPCR zostały oparte na literaturze lub zaprojektowane na podstawie sekwencji NCBI przy użyciu NCBI Primer Blast (tabela 4) (Ye i wsp., 2012). Reakcje przeprowadzono w LightCycler II 480 (Roche Diagnostics, Bazylea, Szwajcaria) stosując następujący program termiczny: 15 min preinkubacji (95°C), 40 cykli amplifikacji: 10 s denaturacja (95°C), 15 s przyłączenie starterów (58°C), 30 s wydłużanie starterów (72°C). Każdą reakcję przeprowadzono w dwóch powtórzeniach technicznych. Względną analizę ekspresji genów przeprowadzono metodą $\Delta\Delta CT$ (delta delta wartość cyklu progowego), która umożliwia wyliczenie różnicy poziomu ekspresji genu badanego pomiędzy nieznaną próbą, a próbą referencyjną. Metoda ta pozwala na określenie, które z wytypowanych genów kandydujących ulegają ekspresji do mRNA w bezpośredniej reakcji na stymulację (Livak i Schmittgen, 2001). Dla każdej próbki obliczono różnice w wartościach cyklu progowego (Ct) między genami docelowymi i referencyjnymi (delta CT). Jako kalibratory zastosowano próbki kontrolne bez suplementacji EM. Znormalizowany poziom ekspresji genów obliczono ze wzoru $R = 2^{-\Delta\Delta CT}$.

Tabela 4. Sekwencje starterów do analizy ekspresji genów

Gen	Sekwencja starterów	Numer dostępu NCBI	Wielkość produktu (pz)	Referencje
Geny referencyjne				
<i>ACTB</i>	F: CACGCCATCCTGCGTCTGGA R: AGCACCGTGTGGCGTAGAG	414396	380	Nygaard i wsp. 2007
<i>RPL4</i>	F: CAAGAGTAACTACAACCTTC R: GAACTCTACGATGAATCTTC	100038029	122	Nygaard i wsp., 2007
Geny badane				
<i>CLDN1</i>	F: CCAGTGAAGAGAGCCTGACC R: TGATGAGGTGCAGAAGATGC	100625166	174	Nossol i wsp., 2015
<i>FFAR2</i>	F: CGCTACCTGGGAGTGGCTT R: CGGCCTTCTGGGTTGAGTT	100126285	151	Li i wsp. 2014
<i>FABP4</i>	F: TGGAAACTTGTCTCCAGTG R: GGTACTTTCTGATCTAATGGTG	399533	147	Li i wsp. 2014
<i>GLUT1</i>	F: TTCTCTGCTGCCACTAGGAT R: GTGGAGGTCGGGTTCTTAG	102164419	123	Projekt własny*
<i>GLUT2</i>	F: CGGAACACCCAAAACGTGTC R: TCAAGGTTTCGTCTTGCCTCC	397429	286	Projekt własny*
<i>GLUT5</i>	F: CGAAGGGGAACATGGACACA R: TGCTTCGCCCTTCAGTTCAT	100625876	124	Projekt własny*
<i>IL1B</i>	F: CCAAAGAGGGACATGGAGAA R: GGGCTTTTGTCTGCTTGAG	396565	123	Brogaard i wsp. 2015
<i>IL10</i>	F: CTGAGCTGGGCATGGTAGAG R: GGGGGACAACAGTAGGTGAA	397106	108	Projekt własny*
<i>MUC6</i>	F: CTGTCGTGGTCTCCAGTGGT R: CTGACACTGCGGTCTCAACA	100626121	111	Projekt własny*
<i>TJAP1</i>	F: GGGGCTCTGAACCATGTCTG R: GGTCTAAAAGGCTGGAGGG	100736996	161	Projekt własny*

* Startery zostały zaprojektowane w oparciu o wersję genomu Sscrofa 10.2.; pz- par zasad; F- ang. Forward - starter sensowny; R- ang. Reverse - starter antysensowny

3.2.4. Jakość mięsa świń

Analizy laboratoryjne jakości mięsa przeprowadzono w 48 godzin po uboju na 60 próbkach mięśnia *longissimus lumborum* (LL), które przechowywano w temperaturze 4-6°C (P-2). Stopień zakwaszenia tkanki mięśniowej zmierzono 48 godzin po uboju (pH₄₈) stosując pH-metr Elmetron CP-401 z elektrodą sztyletową. Sprzęt skalibrowano przy użyciu buforów: pH 7,0 i pH 4,0 firmy Elmetron. Zdolność utrzymania wody (WHC) została określona według metodyki Graua i Hamma (1952), zmodyfikowanej przez Pohja i Niinivaara (1957). Próbkę mielonego mięsa o masie 300 mg umieszczono na bibule filtracyjnej Whatman, pomiędzy dwiema szklanymi płytkami i pod stałym obciążeniem 2 kg przez 5 minut. Procent zawartości wody luźnej w mięsie obliczono na podstawie obszaru infiltracji soku mięsnego, zakładając, że 1 cm² infiltracji odpowiada 10 mg wody. Powierzchnię infiltracji soku zmierzono za pomocą planimetru.

Wyciek termiczny określono według metodyki Walczaka (1959). Próbkę mięsa o masie 20 g umieszczono w higroskopijnej gazie i ogrzewano w łaźni wodnej w temperaturze 85°C

przez 10 minut. Następnie, próbkę ochłodzono do temperatury 4°C i zważono. Na podstawie różnicy masy przed i po obróbce cieplnej obliczono procentową utratę masy.

Barwę mięsa mierzono na plastrze surowego mięsa za pomocą fotokolorymetru Minolta CR 310 (Konica Minolta, Japonia) o średnicy otworu pomiarowego 50 mm. Standaryzacji aparatu dokonano za pomocą białej płytki kalibracyjnej CR310 o współrzędnych $Y = 92,80$, $x = 0,3175$ i $y = 0,3333$. Określono parametry barwy poszczególnych prób w systemie CIE $L^*a^*b^*$ (L^* – jasność, a^* – udział barwy czerwonej, b^* – udział barwy żółtej) (CIE, 1986), z zastosowaniem iluminantu D65 i standardowego obserwatora 2°.

Marmurkowatość określono na plastrze surowego mięsa o masie 120 g. Wizualną ocenę przeprowadził 5-osobowy zespół specjalistów w skali 10-stopniowej, na podstawie modeli kanadyjskich i amerykańskich (Cheng i wsp., 2015; NPPC, 1999), gdzie 1 pkt. = brak zawartości tłuszczu śródmięśniowego, 10 pkt. = bardzo duża marmurkowatość.

Kruchość mięsa określono za pomocą urządzenia do badania wytrzymałości Instron 3342 wyposażonego w nakładkę Warner-Bratzler, według metody Szalata i wsp. (1999). Próby mięsa o masie 120 g ogrzewano w łaźni wodnej do momentu osiągnięcia temperatury wewnętrznej 70°C. Obróbkę cieplną przeprowadzono w 0,85% roztworze NaCl. Wycięto pięć słupków o wymiarach 10 mm x 10 mm wzdłuż włókien mięśniowych. Następnie słupki umieszczano w trójkątnym wgłębieniu pod ostrzem i przecięto prostopadłe do włókien mięśniowych. Wynik odczytano jako maksymalną siłę cięcia wyrażoną w N.

Na plastrze surowego mięsa (120 g) odrysowano kontur powierzchni mięśnia *LL* (powierzchnia oka połędwicy) i następnie obliczono pole powierzchni (cm²) metodą planimetryczną.

3.2.5. Mikrostruktura mięśnia *longissimus lumborum* (LL) świni

W celu oceny mikrostruktury próbki mięśnia *LL* (**P-2**) pobrano pomiędzy 4. a 5. kręgiem lędźwiowym, o wymiarach 5 x 15 mm i zamrożono w ciekłym azocie, w temperaturze -196°C. Następnie próbki mięśnia przeniesiono do kriostatu (Thermo Shandon, Wielka Brytania) i ścięto na skrawki histologiczne o grubości 10 µm w temperaturze około -25°C. Skrawki umieszczono na szkiełku podstawowym i poddano reakcjom histochemicznym.

W celu oznaczenia typów włókien mięśniowych przeprowadzono kombinowaną reakcję na aktywność dwóch enzymów (Ziegen, 1979): tetrazolinowej reduktazy NADH-TR (inkubacja preparatów w płynie inkubacyjnym: NADH, NBT, 0,1M bufor fosforanowy o pH 7,4, w temp. 37°C przez 60 min.) oraz ATP-azy miofibrylarnej (preinkubacja preparatów w kwaśnym roztworze o pH 4,0 przez 3 min., a następnie inkubacja w płynie inkubacyjnym: ATP, CaCl₂, barbituran sodu o pH 9,6 w temp. 37°C przez 30 min.). Efektem reakcji jest przekształcenie bezbarwnych soli tetrazolowych w widoczne granule formazanu, co pozwala na określenie metaboliczno-strukturalnego typu włókien: STO (włókno wolno kurczące się oksydatywne, wybarwiające się na kolor czarny), FTO (włókna szybko kurczące się oksydatywne, wybarwiające się na kolor niebieski) i FTG (włókna szybko kurczące się glikolityczne, niewybarwiające się).

Barwienie czerwienią oleistą wykonano w celu określenia procentowej zawartości tłuszczu śródmięśniowego, który barwi się na kolor czerwony, według metodyki podanej przez Dubovitzę i wsp. (1973).

Barwienie topograficzne H+E (hematoksyliną i eozyną) przeprowadzono w celu określenia zmian patologicznych w mięśniach, takich jak: włókna olbrzymie, martwica włókien oraz rozszczepienie włókien (tzw. *splitting*).

Obrazy mikroskopowe zapisano na dysku komputera i z wykorzystaniem mikroskopu Ci-L firmy NIKON, wyposażonego w kamerę NIKON DS-Fi3 o rozdzielczości 5,9 MPix oraz oprogramowanie NIS ELEMENTS umożliwiające wykonanie pomiarów liniowych

i planimetrycznych oraz cyfrową analizę obrazów mikroskopowych, obliczono udział poszczególnych typów włókien mięśniowych na powierzchni 1,5 mm² oraz zmierzono ich średnicę według metody podanej przez Brooke'a (1970): pomiar najkrótszych średnic. Gęstość włókien mięśniowych obliczono na podstawie średniej liczby włókien na powierzchni 1,5 mm². Całkowita liczba włókien mięśniowych została obliczona poprzez pomnożenie gęstości włókien i powierzchni oka polędwicy. Wykorzystując funkcję filtru obiektów o wskazanym kolorze, która oblicza procent koloru czerwonego, obliczono zawartość tłuszczu śródmięśniowego na powierzchni 3 mm². Obliczono również liczbę włókien normalnych oraz włókien ze zmianami patologicznymi na powierzchni 1,5 mm² i na jej podstawie wyliczono procentową zawartość tych włókien.

3.2.6. Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym z siarczanem dodecyłu sodu (SDS-PAGE)

3.2.6.1. Przygotowanie próbek do analizy

Próbki surowego, mrożonego w ciekłym azocie mięsa (2 mg) zawieszono w 98 µL buforu o pH 6,8 i składzie: 8 M mocznik, 2 M tiomocznik, 0,05 M Tris-HCl, 0,075 M ditiotreitól – DTT, 3% siarczan dodecyłu sodu – SDS oraz 0,05% błękit bromofenolowy. Następnie próby ogrzewano przez 3 minuty w temperaturze 98°C. Stężenie białka w próbce określono za pomocą zestawu 2-D Quant Kit (GE Healthcare Bio-Sciences). Na każdą ścieżkę żelu naniesiono próbkę zawierającą 20 µg białka (**P-2**).

3.2.6.2. Elektroforeza żelowa

Rozdział białek (**P-2**) przeprowadzono przy użyciu SDS-PAGE (żelowa elektroforeza płytowa wykonywana w akrylamidzie w obecności SDS) w 15% dwufazowych żelach poliakrylamidowych (Fritz i Greaser, 1991). Żel rozdzielający zawierał 30% akrylamid, 75% gliceryna, 3 M Tris o pH 8,8, 10% SDS, 1% nadsiarczan amonu oraz 16 µl TEMED-u. W skład żelu zagęszczającego wchodził: 10% akrylamid, 5% gliceryna, 0,125 M Tris o pH 6,8, 10% SDS, 1% nadsiarczan amonu, 25 µl TEMED, bufor do barwienia i woda destylowana. Niniejsze żele przygotowano na płytkach o wymiarach 80 x 100 mm, przy wykorzystaniu płytki dystansowej o grubości 0,75 mm. Bufor elektroforetyczny składał się z: 0,25 M Tris, 1,92 M gliceryny, 0,5% SDS oraz 10 mM 2-merkptoetanolu. Wzorcem do kalibracji masy cząsteczkowej białek (w zakresie 10-250 kDa) był Standard Protein Ladder PageRuler Plus (ThermoScientific). Do przeprowadzenia rozdziału elektroforetycznego użyto aparatu typu SE 250 (HoeferScientific Instruments Company, Holliston, MA, USA) ustawiając wartość natężenia prądu 40 mA na 2 żele. W celu wizualizacji białek wykonano 30-minutowe barwienie stosując: 0,05% błękit kumassi (naturalny barwnik, z ang. *Coomassie Brilliant Blue R-250*), 50% metanol oraz 10% kwas octowy. Ostatnim etapem było kilkugodzinne odbarwienie prób w roztworze zawierającym 10% metanolu i 4,5% kwasu octowego.

3.2.6.3. Analiza obrazu

Stosując system do analizy obrazu Image Master® VDS (Pharmacia Biotech, Austria) uzyskano zdjęcia żeli poliakrylamidowych, które analizowano w programie Image Master® 1D Elite v. 4.0. Założono, że powierzchnia pików wszystkich prążków białek rozdzielonych na jednej ścieżce żelu stanowiła 100%. Wielkość pojedynczego pasma wyrażono jako procentowy udział w stosunku do ogółu białek danej ścieżki (**P-2**).

3.2.7. Analiza statystyczna

Wyniki tuczu i oceny histomorfologicznej jelita czczego (**P-1**) poddano dwuczynnikowej analizie wariancji przy użyciu programu STATISTICA 10.0 PL. Czynnikiem doświadczalnym była grupa żywieniowa oraz suplementacja probiotyczna diety świń. Obliczono średnią arytmetyczną i błąd standardowy średniej (*SEM*). Istotne różnice między grupami określono testem Tukeya. Obliczono interakcję pomiędzy żywieniem a suplementacją probiotyczną. Analizę statystyczną ekspresji genów (**P-1**) wykonano poprzez porównanie wartości cyklu progowego grup eksperymentalnych do grupy kontrolnej metodą testu t-Studenta.

Wyniki oceny jakości mięsa i mikrostruktury mięśnia *LL* (**P-2**) poddano analizom przy użyciu programu STATISTICA 13.1. W celu określenia istotności statystycznych między grupami eksperymentalnymi w ramach jednego systemu żywienia (C vs. C+EM; E1 vs. E1+EM; E2 vs. E2+EM) zastosowano nieparametryczny test U Manna – Whitneya dla wyników, które nie spełniały założeń rozkładu normalnego i homogeniczności wariancji. Dla pozostałych parametrów przeprowadzono parametryczną analizę wariancji ANOVA. Obliczono średnią arytmetyczną i odchylenie standardowe (*SD*). Istotne różnice między grupami określono testem Tukeya. Zastosowano również współczynnik korelacji rang Spearmana do określenia zależności między wybranymi parametrami. W celu określenia różnic między systemami żywienia (C vs. E1 vs. E2 oraz C+EM vs. E1+EM vs. E2+EM) wykorzystano test Kruskala-Wallisa oraz porównanie średnich rang (**P-2**).

3.3. WYNIKI

3.3.1. Wyniki produkcyjne świń

Wyniki produkcyjne świń przedstawiono w tabeli 5 (P-1).

Tabela 5. Wpływ efektywnych mikroorganizmów (EM) na wyniki produkcyjne świń żywionych różnymi dietami

Cecha	C		E1		E2		SEM	P		
	C	C+EM	E1	E1+EM	E2	E2+EM		G	EM	G x EM
Masa ciała na początku tuczu, kg	32,15	33,15	30,55	32,30	32,00	29,45	0,40	ns	ns	ns
Masa ciała na końcu tuczu, kg	111,10 ^b	113,55 ^a	112,40	112,95	112,35	113,60	0,35	ns	0,05	ns
Dni tuczu	85	87	87	86	88	88	0,91	ns	ns	ns
Średnie przyrosty dobowe w całym okresie tuczu, g	930	930	950	950	920	960	0,01	ns	ns	ns
Przyrost całkowity podczas tuczu, kg	78,95	80,40	81,85	80,65	80,35	84,15	0,56	ns	ns	ns
Średnie zużycie paszy na 1 kg przyrostu masy ciała, kg	3,08	3,04	3,00	3,14	3,13	2,96	0,03	ns	ns	ns

Grupa C - żywienie standardowe w oparciu o poekstrakcyjną śrutę sojową w I i II fazie tuczu (100%); grupa E1 i E2 – w pierwszej fazie tuczu żywienie z udziałem 50% soi i 50% grochu i łubinu; grupa E1 – w II fazie tuczu 25% soi i 75% grochu i łubinu; grupa E2 - w II fazie tuczu białko soi zastąpiono w 100% grochem i łubinem; grupy doświadczalne, żywione z dodatkiem probiotyku - C+EM, E1+EM, E2 + EM; ^{a, b} – różnice statystycznie istotne przy $P \leq 0,05$; G – grupa żywieniowa

Masa ciała zwierząt na początku tuczu była na zbliżonym poziomie we wszystkich badanych grupach i mieściła się w zakresie od 29,45kg w grupie E2+EM do 33,15 kg w grupie C+EM. Badania wykazały istotną statystycznie wyższą końcową masę ciała w grupie C+EM, żywionej z dodatkiem EM, w porównaniu do grupy kontrolnej C ($P \leq 0,05$). Średnie przyrosty dobowe i zużycie paszy na 1 kg przyrostu masy ciała to najważniejsze wskaźniki świadczące o efektywności tuczu. Jednakże, w badaniach własnych nie wykazano istotnego wpływu suplementacji EM Bokashi zarówno na te parametry, jak i na czas trwania tuczu oraz przyrost całkowity masy ciała.

3.3.2. Histomorfologia jelita czczego świń

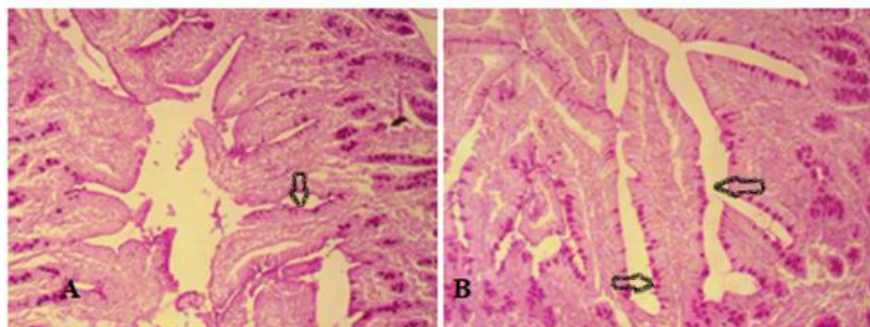
W tabeli 6. przedstawiono wyniki oceny histomorfologicznej jelita czczego (P-1).

Tabela 6. Wpływ efektywnych mikroorganizmów (EM) na histomorfologię jelita czczego świń żywionych różnymi dietami

Cecha	C		E1		E2		SEM	P		
	C	C+EM	E1	E1+E M	E2	E2+E M		G	EM	G x EM
Wysokość kosmków (μm)	308,29 _b	347,01 _a	324,97 _B	362,41 _A	268,95 _B	389,87 _A	4,60	ns	<0,001	<0,001
Szerokość kosmków (μm)	88,62 ^B	102,23 _A	100,86	94,64	84,74 ^B	114,20 _A	1,15	ns	<0,001	<0,001
Powierzchnia kosmków (μm^2)	88.956 _{,52^B}	121.99 _{0,90^A}	107.11 _{5,05}	110.98 _{7,02}	73.356 _{,15^B}	143.88 _{9,13^A}	2.60 _{8,55}	ns	<0,001	<0,001
Głębokość krypt (μm)	201,23	197,72	224,45 _A	195,19 _B	211,67	207,44	2,27	ns	0,01	0,02
Wysokość kosmków/ głębokość krypt	1,61 ^b	1,85 ^a	1,51 ^B	1,99 ^A	1,38 ^B	1,97 ^A	0,03	ns	<0,001	0,048
Grubość błony śluzowej (μm)	509,62	544,72	549,41	557,60	480,61 _B	597,31 _A	5,20	ns	<0,001	<0,001
Liczba komórek kubkowych/1 kosmek	17,65	17,95	18,31	18,37	17,46 ^B	19,64 ^A	0,17	ns	0,01	0,01

Grupa C - żywienie standardowe w oparciu o poekstrakcyjną śrutę sojową w I i II fazie tuczu (100%); grupa E1 i E2 - w pierwszej fazie tuczu żywienie z udziałem 50% soi i 50% grochu i łubinu; grupa E1 - w II fazie tuczu 25% soi i 75% grochu i łubinu; grupa E2 - w II fazie tuczu białko soi zastąpiono w 100% grochem i łubinem; grupy doświadczalne, żywione z dodatkiem probiotyku - C+EM, E1+EM, E2 + EM; ^{a, b} - różnice statystycznie istotne przy $P \leq 0,05$; ^{A, B} - różnice statystycznie istotne przy $P \leq 0,01$; G - grupa żywieniowa

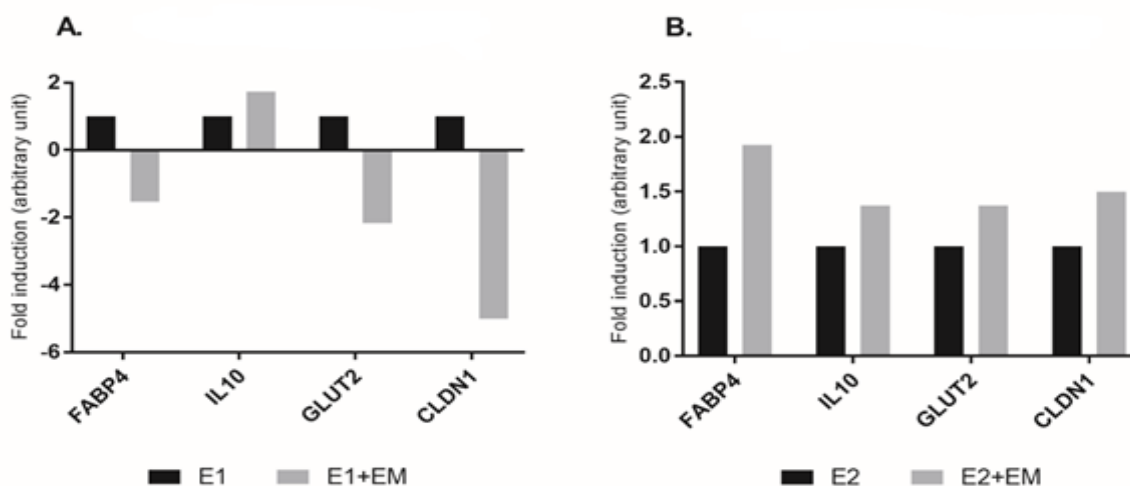
We wszystkich grupach suplementowanych probiotykiem EM Bokashi wykazano jego korzystny wpływ na wysokość kosmków jelitowych, które były najwyższe w grupie E2+EM ($P \leq 0,001$). W odniesieniu do szerokości kosmków jelitowych, również stwierdzono pozytywny wpływ EM na tę cechę w grupach C+EM i E2+EM, w porównaniu do grup kontrolnych ($P \leq 0,001$). W tych grupach odnotowano również istotnie większą powierzchnię kosmków jelitowych ($P \leq 0,001$), przy czym największą powierzchnią cechowało się jelito czcze świń pochodzących z grupy doświadczalnej E2+EM. Ponadto, dla powyższych parametrów stwierdzono wysoko istotną interakcję między żywieniem i dodatkiem EM Bokashi ($P \leq 0,001$). W badaniach zanotowano również istotnie mniejszą głębokość krypt jelitowych w grupie E1+EM (195,19 μm), w porównaniu do grupy E1 (224,45 μm) ($P \leq 0,001$). W tym przypadku można stwierdzić, że jest to zjawisko korzystne, ponieważ wraz ze spłyceniem krypt obserwowano także wydłużenie kosmków jelitowych, co z kolei wpływa na prawidłowe funkcjonowanie jelita cienkiego. Kolejnym analizowanym parametrem był stosunek wysokości kosmków do głębokości krypt, będący głównym wskaźnikiem potencjału trawiennego jelita. We wszystkich grupach żywionych z dodatkiem pożytecznych mikroorganizmów, stwierdzono ich korzystny wpływ na tę cechę ($P \leq 0,05$; $P \leq 0,001$). Badania wykazały również największą grubość błony śluzowej jelita czczego w grupie doświadczalnej E2+EM (597,31 μm), w porównaniu do grupy E2 (480,61 μm) ($P \leq 0,001$). Co więcej, zanotowano istotną statystycznie interakcję między żywieniem i uzupełnieniem diety w preparat EM Bokashi dla tej cechy ($P \leq 0,001$). Ostatnim analizowanym parametrem była liczba komórek kubkowych, odpowiadających za syntezę i wydzielanie glikoprotein, które stanowią rozległą barierę zapobiegającą przenikaniu patogenów do nabłonka. W grupie doświadczalnej E2+EM stwierdzono istotnie większą liczbę komórek kubkowych (19,64/1 kosmek), w porównaniu do grupy kontrolnej E2 (17,46/1 kosmek) ($P \leq 0,001$) (fot. 1).



Fot. 1. Komórki kubkowe jelita czczego (strzałki). A - zdjęcie mikroskopowe kosmków jelitowych w grupie C żywionej bez probiotyku; B - zdjęcie mikroskopowe kosmków jelitowych w grupie E2+EM żywionej z dodatkiem EM Bokashi; powiększenie x100; barwienie PAS

3.3.3. Ekspresja genów

Na rycinie 1 zaprezentowano zmiany w poziomie ekspresji genów w błonie śluzowej jelita czczego świń (**P-1**), dla których uzyskano wyniki istotne statystycznie - *FABP4*, *IL10*, *GLUT2* i *CLDN1*. U świń pochodzących z grupy doświadczalnej E1+EM (ryc. 1A) wpływ zastosowanego preparatu EM Bokashi na wzrost ekspresji genów wykazano tylko w przypadku genu *IL10*. Natomiast, u zwierząt z grupy doświadczalnej E2+EM, otrzymujących w diecie dodatek probiotyku, zaobserwowano wzrost ekspresji czterech badanych genów: *FABP4*, *IL10*, *GLUT2* i *CLDN1* (ryc. 1B).



Rycina 1. Wpływ EM na zmiany w poziomie ekspresji genów w błonie śluzowej jelita czczego u świń żywionych różnymi dietami; Rycina 1A- grupa E1; Rycina 1B- grupa E2; Fold induction (arbitrary unit) – zmiana krotności (jednostka arbitralna)

3.3.4. Jakość mięsa świń

Wyniki oceny jakości mięsa świń (**P-2**) przedstawiono w tabeli 7.

Tabela 7. Wpływ EM na jakość mięsa świń żywionych różnymi dietami

Cecha	C		E1		E2	
	C	C+EM	E1	E1+EM	E2	E2+EM
pH ₄₈	5,14 ± 0,12	5,09 ± 0,09	5,13 ± 0,06	5,19 ± 0,10	5,11 ± 0,05	5,13 ± 0,07
Zdolność utrzymania wody, %	15,57 ^b ± 2,49	18,16 ^a ± 2,50	17,77 ± 2,13	17,01 ± 1,70	18,89 ± 3,72	16,28 ± 1,88
Wyciek termiczny, %	24,39 ± 1,50	24,25 ± 2,54	24,44 ± 0,63	24,80* ± 1,96	24,80 ^a ± 2,50	22,38 ^{b*} ± 1,25

L* - jasność	56,30 ± 1,92	57,59 ± 3,48	56,49 ± 2,36	55,65 ± 2,55	56,13 ± 1,15	56,39 ± 2,52
a* - udział barwy czerwonej	13,91 ± 0,66	14,13 ± 0,86	13,99 ± 1,04	14,41 ± 0,56	14,21 ± 0,78	14,00 ± 0,98
b* - udział barwy żółtej	4,50 ± 0,64	4,25 ± 0,77	4,27 ± 0,96	4,51 ± 0,80	4,89 ± 0,55	4,56 ± 0,91
Marmurkowatość, punkty	1,87 ± 0,79	1,47 ± 0,50	1,59 ± 0,49	1,70 ± 0,60	1,39 ± 0,48	1,55 ± 0,51
Kruchość, N	47,94 ± 2,80	46,83* ± 5,74	47,27 ^a ± 7,62	56,27 ^{b*} ± 7,28	53,57 ± 5,78	51,34* ± 5,03
Powierzchnia oka polędwicy, cm ²	53,10 ± 5,67	55,76 ± 6,15	53,41 ± 4,45	52,62* ± 2,21	57,59 ± 4,96	57,93* ± 3,31

Grupa C - żywienie standardowe w oparciu o poekstrakcyjną śrutę sojową w I i II fazie tuczu (100%); grupa E1 i E2 – w pierwszej fazie tuczu żywienie z udziałem 50% soi i 50% grochu i łubinu; grupa E1 – w II fazie tuczu 25% soi i 75% grochu i łubinu; grupa E2 - w II fazie tuczu białko soi zastąpiono w 100% grochem i łubinem; grupy doświadczalne, żywione z dodatkiem probiotyku - C+EM, E1+EM, E2+EM; ^{a, b} – różnice statystycznie istotne przy $P \leq 0,05$; * statystycznie istotne różnice między systemami żywienia (C vs. E1 vs. E2; C+EM vs. E1+EM vs. E2+EM) przy $P \leq 0,05$

Pierwszym analizowanym parametrem w zakresie cech jakości mięsa było pH. Stwierdzono, że zastosowanie preparatu EM Bokashi nie wpłynęło istotnie na stopień zakwaszenia tkanki mięśniowej w 48 godzin po uboju zwierząt, gdzie wartość tej cechy we wszystkich analizowanych grupach mieściła się w zakresie od 5,09 (grupa C+EM) do 5,19 (grupa E1+EM). Do spadku wartości pH dochodzi wskutek akumulacji kwasu mlekowego w mięśniach w okresie poubojowym, w wyniku beztlenowej glikogenolizy (Pisula i Pospiech, 2011). Kolejnym analizowanym parametrem była zdolność utrzymania wody. Badając wpływ pożytecznych mikroorganizmów stwierdzono ich niekorzystny wpływ na tę cechę w mięsie pozyskanym od tuczników z grupy doświadczalnej C+EM, w porównaniu do grupy kontrolnej C ($P \leq 0,05$). W przypadku wycieku termicznego, wykazano korzystny wpływ EM w grupie doświadczalnej E2+EM, w porównaniu z grupą E2 (odpowiednio: 22,38 vs 24,80%) ($P \leq 0,05$). Na wyciek termiczny istotny wpływ miała również dieta. Mięso pochodzące od świń z grupy E2+EM, w której soję w II fazie tuczu zastąpiono w 100% grochem i łubinem (II wariant żywieniowy), charakteryzowało istotnie mniejszy wyciek termiczny, niż mięso z grupy E1+EM, której dietę w II fazie tuczu stanowiła w 25% soja i 75% groch i łubin (I wariant żywieniowy) ($P \leq 0,05$). W zakresie barwy i marmurkowatości mięsa nie wykazano wpływu dodatku EM Bokashi. Następnie oceniono kruchość mięsa, gdzie wykazano, iż mięso pochodzące z grupy E1+EM, żywionej z dodatkiem probiotyku, było twardsze, niż mięso z grupy E1 ($P \leq 0,05$). Zanotowano również istotny wpływ żywienia na kruchość mięsa, która różniła się pomiędzy grupami C+EM, E1+EM i E2+EM, odpowiednio: 46,83 vs 56,27 vs 51,34 ($P \leq 0,05$). Ostatnim analizowanym parametrem była powierzchnia oka polędwicy, która nie zmieniła się po zastosowaniu EM Bokashi. Wpływ na tę cechę miała natomiast dieta. Statystycznie istotnie większą powierzchnię oka polędwicy wykazano w grupie E2+EM (57,93 cm²), w porównaniu do grupy E1+EM (52,62 cm²) ($P \leq 0,05$).

3.3.5. Mikrostruktura mięśnia *longissimus lumborum* świń

W tabeli 8 przedstawiono wyniki oceny mikrostruktury mięśnia LL (P-2).

Tabela 8. Wpływ EM na mikrostrukturę mięśnia *longissimus lumborum* świń żywionych różnymi dietami

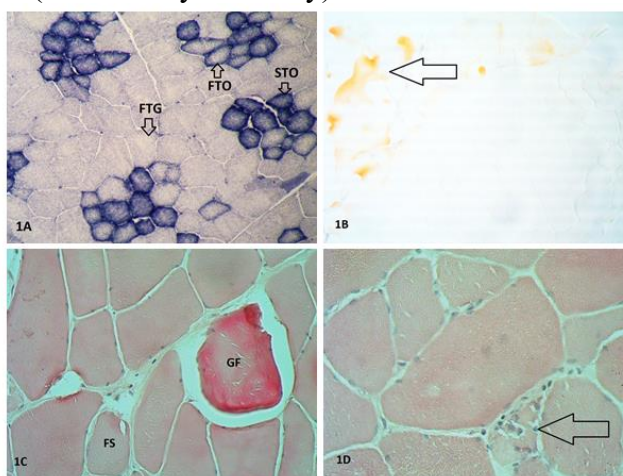
Cecha		C		E1		E2	
		C	C+EM	E1	E1+EM	E2	E2+EM
Udział włókien, %	STO	13,60 ± 2,50	16,33 ± 6,60	14,36 ± 4,68	14,51 ± 3,60	16,10 ± 4,41	15,41 ± 4,77
	FTO	13,69 ± 2,82	13,52 ± 3,57	13,80 ± 2,40	14,05 ± 3,27	14,70 ± 3,76	15,13 ± 2,20
	FTG	72,71 ± 3,21	70,15 ± 9,25	71,84 ± 6,35	71,44 ± 3,49	69,20 ± 16,14	69,46 ± 20,62
Średnica włókien, μm	STO	35,03 ± 4,34	35,86 ± 4,69	38,86 ± 5,61	40,82 ± 5,21	37,11 ± 3,38	39,53 ± 2,65
	FTO	35,44 ± 6,52	40,66 ± 6,63	35,78 ^a ± 3,88	43,17 ^b ± 3,51	37,24 ^a ± 5,46	39,42 ^b ± 2,26
	FTG	47,14 ± 4,50	52,30 ± 8,71	44,68 ^{a*} ± 5,16	50,57 ^b ± 3,46	51,26 [*] ± 2,63	52,27 ± 3,26
Gęstość włókien mięśniowych (liczba włókien/1,5 mm ²)	Suma	244 ± 48	228 ± 67	243 ± 60	205 ± 22	222 ± 20	232 ± 23
	STO	35 ± 10	34 ± 9	33 ± 7	30 ± 8	34 ± 10	28 ± 10
	FTO	34 ± 10	31 ± 11	33 ± 7	29 ± 7	27 ± 8	31 ± 7
	FTG	175 ± 34	163 ± 65	177 ± 52	146 ± 16	161 ± 13	173 ± 21
Całkowita liczba włókien mięśniowych (x1000)		744 ^a ± 368	694 ^b ± 488	743 ± 371	617 ± 254	660 ± 406	652 ± 439
Udział tłuszczu śródmięśniowego, %		1,66 ± 1,55	2,27 ± 1,13	1,84 ± 1,21	1,67 ± 0,96	1,66 ± 2,05	2,45 ± 1,79

Włókna normalne, %	97,22 ± 2,02	97,36 ± 1,97	95,95 ± 2,72	98,27± 1,02	96,72 ± 1,71	96,60 ± 1,86
Włókna olbrzymie, %	1,99 ± 1,84	1,29 ± 1,29	1,76 ± 1,80	1,10 ± 1,17	1,87 ± 1,16	1,95 ± 1,50
Martwica włókien, %	0,11 ± 0,18	0,34 ± 0,53	0,84 ± 3,03	0,80 ± 0,77	0,60 ± 0,82	0,30 ± 0,46
<i>Splitting</i> , %	0,68 ^{a*} ± 0,25	1,01 ^b ± 0,92	1,45 ^{a*} ± 1,1	0,83 ^b ± 0,81	0,81 ^{a*} ± 0,77	1,15 ^b ± 0,82

Grupa C - żywienie standardowe w oparciu o poekstrakcyjną śrutę sojową w I i II fazie tuczu (100%); grupa E1 i E2 – w pierwszej fazie tuczu żywienie z udziałem 50% soi i 50% grochu i łubinu; grupa E1 – w II fazie tuczu 25% soi i 75% grochu i łubinu; grupa E2 - w II fazie tuczu białko soi zastąpiono w 100% grochem i łubinem; STO - włókna wolnokurczące się, oksydatywne; FTO - włókna szybko kurczące się, oksydatywne; FTG - włókna szybko kurczące się, glikolityczne; grupy doświadczalne, żywione z dodatkiem probiotyku - C+EM, E1+EM, E2 + EM; ^{a, b} – różnice statystycznie istotne przy $P \leq 0,05$; * statystycznie istotne różnice między systemami żywienia (C vs. E1 vs. E2; C+EM vs. E1+EM vs. E2+EM) przy $P \leq 0,05$

W żadnej z badanych grup nie stwierdzono wpływu EM Bokashi na udział włókien STO, FTO i FTG (fot. 2). Zastosowanie dodatku efektywnych mikroorganizmów wpłynęło natomiast na zwiększenie średnicy włókien FTO w mięśni *LL* świń z grupy doświadczalnej E1+EM i E2+EM oraz włókien FTG w grupie doświadczalnej E1+EM ($P \leq 0,05$), w porównaniu do grup, którym nie podano preparatu probiotycznego. Ponadto, wykazano wpływ żywienia na średnicę włókien FTG. Istotnie większe średnice tych włókien odnotowano w grupie kontrolnej E2, której dietę stanowił w 100% w II fazie tuczu groch i łubin, w porównaniu do grupy kontrolnej E1, której dietę stanowiła soja w 25% oraz groch i łubin w 75% (odpowiednio: 51,26 vs. 44,68 μm) ($P \leq 0,05$). Kolejną analizowaną cechą była gęstość włókien mięśniowych, wyrażona jako liczba poszczególnych typów włókien na jednostce powierzchni mięśnia. W zakresie tego parametru nie wykazano istotnego wpływu efektywnych mikroorganizmów. Stwierdzono natomiast istotnie mniejszą całkowitą liczbę włókien mięśniowych w grupie doświadczalnej C+EM ($P \leq 0,05$), co wpływa na strukturę mięsa. Jeśli chodzi o zawartość tłuszczu śródmięśniowego w mięśni *LL* świń, nie wykazano wpływu EM na ten parametr. Kształtował się on na stosunkowo niskim poziomie, typowym dla dzisiejszych szybko rosnących świń o wysokiej mięsności, w zakresie od 1,66% w grupach C i E2 do 2,45% w grupie E2+EM (fot. 2). W niniejszych badaniach kolejne analizy dotyczyły wpływu EM na występowanie zmian histopatologicznych w mięśni *LL* (**P-2**). Określono udział włókien prawidłowych, który mieścił się w zakresie od 95,95% w grupie E1 do 98,27% w grupie E1+EM. Natomiast, wśród zmian patologicznych najczęściej obserwowaną były włókna olbrzymie, które stanowiły od 1,10% w grupie doświadczalnej E1+EM do 1,99% w grupie kontrolnej C. Nie stwierdzono również istotnego wpływu EM na występowanie włókien martwiczych. Natomiast, w przypadku *splittingu* włókien, niekorzystny wpływ zastosowania EM Bokashi wykazano w grupach C+EM (1,01%) i E2+EM (1,15%), w których udział tych włókien był istotnie wyższy, w porównaniu do grup kontrolnych C (0,68%) i E2 (0,81%) ($P \leq 0,05$). Odmienne wyniki uzyskano w grupie E1+EM, w której dodatek EM zmniejszył udział rozszczepienia włókien (1,45% vs. 0,83%; $P \leq 0,05$). Ponadto, wykazano istotny wpływ diety na ten parametr. Najniższy udział *splittingu* włókien (0,68%) odnotowano w grupie C, w której żywienie przez cały okres trwania tuczu opierało się w 100% na

poekstrakcyjnej śrucie sojowej (fot. 2). Natomiast, najwyższy odsetek włókien rozszczepionych stwierdzono w mięśni świń pochodzących z grupy E1, które żywiono mieszanką paszową z udziałem 50% soi i 50% grochu i łubinu w I fazie tuczu oraz 25% soi i 75% udziałem grochu i łubinu w II fazie tuczu (I wariant żywieniowy).



Fot. 2. 1A- typy włókien mięśniowych, reakcja na aktywność tetrazolinowej reduktazy NADH-TR oraz ATP-azy miofibrylarnej, powiększenie x125; 1B- tłuszcz śródmięśniowy, barwienie czerwienią oleistą, powiększenie x125; 1C- GF- włókno olbrzymie, FS- *splitting* włókien, barwienie H+E, powiększenie x250; 1D- martwica włókien, barwienie H+E, powiększenie x400

3.3.6. Udział białek tkanki mięśniowej w mięśni *longissimus lumborum*

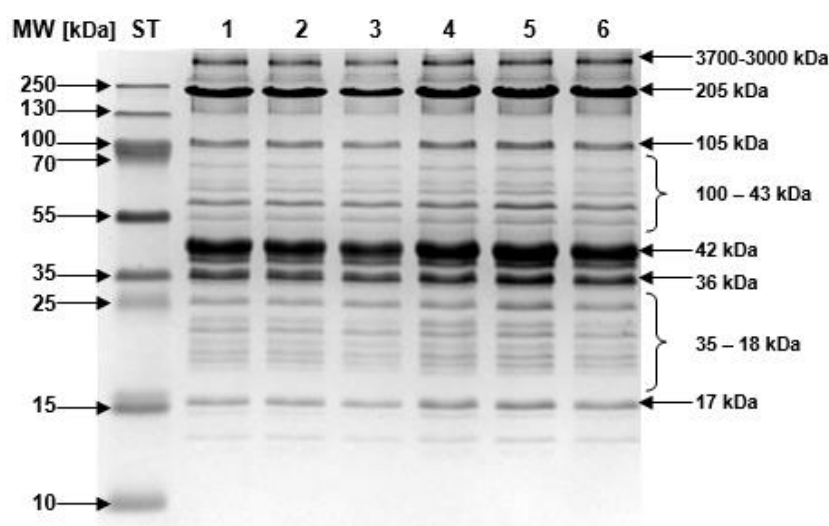
Udział wybranych białek tkanki mięśniowej w mięśni *LL* przedstawiono w tabeli 9 (P-2). Dodatkowo, na elektroforegramie przedstawiono pasma poszczególnych białek mięśniowych we wszystkich analizowanych grupach (ryc. 2).

Tabela 9. Wpływ EM na procentowy udział białek tkanki mięśniowej w m. *longissimus lumborum* u świń żywionych różnymi dietami

Masa molekularna białek (kDa)	C		E1		E2	
	C	C+EM	E1	E1+EM	E2	E2+EM
3000-3700 titina	7,407* ± 0,428	7,385* ± 0,431	6,152* ± 0,836	5,785* ± 1,051	6,708 ± 1,173	6,832 ± 0,760
205 miozyna i produkty degradacji titiny	18,118 ^a ± 0,385	17,102 ^b ± 0,883	17,118 ± 1,171	15,807 ± 1,789	18,060 ± 0,892	17,912 ± 2,195
105 alfa aktynina	5,402 ± 1,75	6,022 ± 0,406	5,732 ± 1,654	5,365 ± 1,496	6,627 ± 0,624	6,382 ± 1,017
100-43	6,070 ± 0,492	6,305 ± 0,896	6,112 ± 0,552	7,047 ± 0,905	6,588 ± 0,796	6,920 ± 0,578

42 aktyna	32,207 ± 3,048	31,270 ± 1,596	33,010 ± 2,380	33,885* ± 3,045	30,063 ± 2,294	30,002* ± 2,476
36 troponina-T	10,057 ± 0,790	10,783 ± 0,646	10,568 ^b ± 0,389	11,172 ^a ± 1,296	9,700 ± 1,196	9,918 ± 1,142
35-18 w tym produkty degradacji troponiny-T	9,092 ± 0,877	9,287 ± 0,776	9,563 ± 0,727	9,525 ± 1,599	9,492 ± 2,204	9,392 ± 1,215
17 mioglobina	5,478 ± 2,378	5,282 ± 0,823	5,365 ± 0,936	5,4383 ± 1,189	6,110 ± 0,834	6,347 ± 1,513

Grupa C - żywienie standardowe w oparciu o poekstrakcyjną śrutę sojową w I i II fazie tuczu (100%); grupa E1 i E2 – w pierwszej fazie tuczu żywienie z udziałem 50%soi i 50% grochu i łubinu; grupa E1 – w II fazie tuczu 25% soi i 75% grochu i łubinu; grupa E2 - w II fazie tuczu białko soi zastąpiono w 100% grochem i łubinem; grupy doświadczalne, żywione z dodatkiem probiotyku - C+EM, E1+EM, E2+EM; ^{a, b} – różnice statystycznie istotne przy $P \leq 0,05$; * statystycznie istotne różnice między systemami żywienia (C vs. E1 vs. E2; C+EM vs. E1+EM vs. E2+EM) przy $P \leq 0,05$



Rycina 2. Porównanie rozdziałów białek w mięśniu *longissimus lumborum*: 1, 3, 5 (odpowiednio grupy kontrolne: C, E1, E2) oraz 2, 4, 6 (odpowiednio grupy doświadczalne: C+EM, E1+EM, E2+EM)

Spośród analizowanych białek, te o masie cząsteczkowej 42 kDa stanowiły największy odsetek (od 30% w grupie E2+EM do 33,88% w grupie E1+EM). Natomiast, najmniejszym udziałem w zakresie od 5,3 do 6,6% cechowały się białka o masie 17 i 105 kDa. W badaniach wykazano, że suplementacja diety świń preparatem EM Bokashi nie miała statystycznie istotnego wpływu na udział większości analizowanych białek. Tylko dla białek o masie cząsteczkowej 205 kDa, których udział był niższy w grupie C+EM, w porównaniu do grupy kontrolnej C, oraz dla białek o masie 36 kDa, których wyższy udział odnotowano w grupie E1+EM, w porównaniu do grupy E1, stwierdzono istotny statystycznie wpływ pożytecznych mikroorganizmów ($P \leq 0,05$). Ponadto, odnotowano istotny statystycznie wpływ żywienia na udział białek o masie 3000–3700 kDa oraz 42 kDa.

Dodatkowo, w badaniu określono korelacje pomiędzy białkami, a cechami jakości mięsa i mikrostruktury mięśnia *LL* (**P-2**). Korelacje istotne statystycznie, zarówno dodatnie jak i ujemne, wykazano pomiędzy białkami, a % udziałem tłuszczu śródmięśniowego i włókien FTO oraz niektórymi cechami jakości mięsa, tj. barwą, pH₄₈, kruchością oraz powierzchnią oka polędwicy. Istotnie statystycznie, dodatnie korelacje wykazano pomiędzy % włókien FTO, a białkami o masie cząsteczkowej 100–43 kDa ($r_{xy} = 0,557$), 36 kDa ($r_{xy} = 0,803$) oraz 35–18 kDa ($r_{xy} = 0,574$) przy $P \leq 0,05$. Stwierdzono również dodatnią korelację ($r_{xy} = 0,629$) pomiędzy białkiem o masie cząsteczkowej 205 kDa, a udziałem tłuszczu śródmięśniowego ($P \leq 0,05$). Istotną statystycznie, ujemną korelację wykazano pomiędzy białkiem o masie 17 kDa, a udziałem włókien FTO ($r_{xy} = -0,73$; $P \leq 0,05$). Ujemne korelacje stwierdzono również pomiędzy kruchością mięsa, a białkiem o masie cząsteczkowej w zakresie 35-18 kDa ($r_{xy} = -0,634$) oraz liczbą ($r_{xy} = -0,620$) i % włókien FTO ($r_{xy} = -0,789$), a białkiem o masie 105 kDa ($P \leq 0,05$).

3.4. DYSKUSJA

3.4.1. Wyniki produkcyjne świń

Na tempo wzrostu świń wpływ ma m.in.: rasa, warunki środowiskowe i żywienie (rodzaj skarmianej paszy, stosowanych dodatków paszowych, czy systemu żywienia). W badaniach własnych wykazano korzystny wpływ efektywnych mikroorganizmów na wzrost końcowej masy ciała świń (**P-1**), co potwierdzają wcześniejsze doniesienia innych autorów (Balasubramanian i wsp., 2018; Kritas i wsp., 2015). Badania Balasubramanian i wsp. (2018) wykazały korzystny wpływ probiotyku zawierającego *Bacillus coagulans* (1×10^9 JTK/g), *B. licheniformis* (5×10^8 JTK/g), *B. subtilis* (1×10^9 JTK/g), *Clostridium butyricum* (1×10^8 JTK/g) na wzrost masy ciała u trzyrasowych mieszańców ($P < 0,05$). Doświadczenie Kritas i wsp. (2015) z udziałem probiotyku zawierającego *Bacillus subtilis* C-3102 również wykazało pozytywny jego wpływ zarówno na lochy, jak i ich potomstwo. Suplementacja ograniczyła utratę masy ciała loch podczas laktacji oraz zwiększyła masę ciała prosiąt w momencie odsadzenia ($P < 0,05$). Uzupełnienie diety tuczników 0,1% YGM - mieszanką kultur drożdży, ekstraktu czosnkowego i oleju czosnkowego, skutkowało wyższą końcową masą ciała, w porównaniu do grup kontrolnych ($P < 0,05$) (Yang i Ho, 2020). W badaniach własnych nie wykazano wpływu suplementacji EM na średnie przyrosty dobowe. Odmienne wyniki uzyskano w badaniach Balasubramanian i wsp. (2018). Badania Shim i wsp. (2005) przeprowadzone na odsadzonych prosiętach, żywionych z 0,2% dodatkiem oligofruktozy, również wykazały wyższe średnie przyrosty dobowe, w porównaniu do grupy kontrolnej ($P < 0,05$). Potwierdzają to także badania Liu i wsp. (2018) z udziałem probiotyku zawierającego *Bacillus subtilis* i *Enterococcus faecium* przeprowadzone na trzyrasowych prosiętach rasy Yorkshire x Landrace x Duroc. Probiotyk zwiększył średnie przyrosty dobowe o 12%, w stosunku do grupy kontrolnej ($P < 0,05$).

3.4.2. Histomorfologia jelita czczego świń

Pod wpływem czynników żywieniowych (dieta o zróżnicowanym udziale białka, energii, roślin strączkowych, dieta suplementowana dodatkami paszowymi- pro- lub prebiotykami) i formy żywienia (ograniczone, *ad libitum*) występują różnorodne zmiany w strukturze jelit, w tym takie, które wpływają na stopień wchłaniania składników pokarmowych (Mroz, 2001; Rekiel i wsp., 2008). Stosowanie preparatów probiotycznych zawierających efektywne mikroorganizmy ma korzystny wpływ na cechy histomorfometryczne, co wykazano zarówno w badaniach własnych, jak i przytoczonych poniżej. W niniejszych badaniach (**P-1**) probiotyk zawierający pożyteczne mikroorganizmy zwiększył wysokość i szerokość kosmków jelitowych - palczastych wybrzuszeń błony śluzowej pokrytych nabłonkiem jelitowym, które ulegają modyfikacjom w zależności od miejsca położenia. Wzrost wysokości i szerokości kosmków oznacza zwiększenie powierzchni chłonnej jelita. Mair i wsp. (2010) również odnotowali korzystny wpływ probiotyku zawierającego enterokoki, pałeczki kwasu mlekowego i bifidobakterie na wzrost wysokości kosmków jelitowych w jelicie cienkim ($P < 0,10$). Podobnie, w badaniach Suo i wsp. (2012) stwierdzono wzrost wysokości kosmków w jelicie cienkim świń, które otrzymywały *Lactobacillus plantarum* ZJ316 ($P = 0,003$). Kolejne badania potwierdzające powyższe wyniki zostały przeprowadzone przez Bilić-Šobot i wsp. (2016). Autorzy wykazali korzystny wpływ hydrolizowanych tanin (garbników)- naturalnych i bezpiecznych dodatków paszowych, stanowiących od 1 do 3% dawki na wzrost wysokości i szerokości kosmków jelitowych w jelicie cienkim knurów. Ponadto, w badaniach własnych, u świń żywionych z dodatkiem EM stwierdzono większe pole powierzchni kosmków jelitowych. Wskazuje to zarówno na poprawę trawienia i absorpcji, oraz szybsze tempo regeneracji komórek obecnych w kosmkach.

W badaniach Boguckiej i wsp. (2019) dodatek 1% Lavipanu (*Lactococcus lactis* B/00039, *Carnobacterium divergens* KKP/2012p, *Lactobacillus casei* B/00080, *Lactobacillus plantarum* B/00081 i *Saccharomyces cerevisiae* KKP 2059p) do diety kurcząt również spowodował zwiększenie pola powierzchni kosmków w dwunastnicy, jelicie czczym ($P < 0,01$) i krętym ($P < 0,05$), w porównaniu do grupy kontrolnej. W badaniach własnych wpływ preparatu EM Bokashi na głębokość krypt jelitowych stwierdzono tylko w grupie E1. W kryptach odbywa się proliferacja komórek, produkcja czynników odporności przeciwbakteryjnej (defensyn) oraz przeciwciał (Rekiel i wsp., 2008; Manning i Gibson, 2004). Jak podaje Pluske i wsp. (1997) zanik kosmków i pogłębienie krypt, powoduje zmniejszenie zdolności trawiennej oraz przyczynia się do wystąpienia biegunki poodsadzeniowej. Badania własne wykazały korzystny wpływ EM Bokashi na stosunek wysokości kosmków/głębokości krypt (WK/GK). Jest on wskaźnikiem potencjału trawiennego jelita oraz wskazuje na dojrzałość błony śluzowej (Montagne i wsp., 2003). Badania Mishra i wsp. (2016) wykazały wzrost wysokości kosmków i wskaźnika WK/GK ($P < 0,01$) w jelicie czczym świń żywionych z dodatkiem *Saccharomyces cerevisiae* NCDC 49 i *L. acidophilus*. Bontempo i wsp. (2006) zaobserwowali natomiast wzrost wysokości kosmków i głębokości krypt oraz niższy stosunek WK/GK u prosiąt żywionych z dodatkiem probiotyku (*S. cerevisiae* ssp. *boulardii* 2×10^6 JTK/g paszy). Podobne wyniki uzyskali Dowarah i wsp. (2016) w badaniach przeprowadzonych na tucznikach, których dietę uzupełniono *L. acidophilus* NCDC-15 lub szczepem *Pediococcus acidilactici* FT28. Autorzy zaobserwowali wzrost wysokości kosmków i głębokości krypt oraz zmniejszenie stosunku WK/GK. W badaniach własnych suplementacja diety świń EM Bokashi zwiększyła grubość błony śluzowej w grupie E2+EM ($P \leq 0,01$). Błona śluzowa przewodu pokarmowego świni, poza trawieniem i wchłanianiem pokarmu, odgrywa również ważną rolę w walce z patogenami i toksynami, które w nim występują. Rozwój błony śluzowej ma swój początek już w zarodku i odnawia się samoistnie przez całe życie. Jej homeostaza jest utrzymywana poprzez regulację proliferacji, różnicowanie i apoptozę komórek nabłonka (Yang i wsp., 2013). Wyniki badań Babińskiej i wsp. (2005) potwierdzają korzystny wpływ *L. acidophilus* i *Bifidobacterium* na morfologię przewodu pokarmowego, wątroby i trzustki. Na prawidłowe funkcjonowanie błony śluzowej wpływają różne czynniki - środowiskowe, genetyczne oraz żywieniowe (Yang i wsp., 2013). W badaniach własnych dodatek EM Bokashi spowodował wzrost liczby komórek kubkowych w grupie doświadczalnej E2+EM. Nabłonek pokrywający kosmki jelitowe składa się głównie z enterocytów i wyspecjalizowanych komórek wydzielniczych, takich jak komórki kubkowe, które są odpowiedzialne za wydzielanie mucyn, zapewniając organizmowi pierwszą barierę ochronną. Komórki kubkowe mają kluczowe znaczenie dla utrzymania homeostazy jelitowej i integralności nabłonka jelitowego, a ich utrata lub dysfunkcja może prowadzić do zaburzeń w funkcjonowaniu jelita cienkiego (Jung i Saif, 2017). Badania przeprowadzone przez Rubio i wsp. (2010), w których świnię żywiono mieszanką pełnowartościową, wykazały, że liczba komórek kubkowych w jelicie czczym wynosiła 15,5 komórek kubkowych/100 komórek. Według innych autorów (Prieto i wsp., 2014) zastosowanie suplementacji probiotycznej (*Bacillus pumilus*) u odsadzonych prosiąt również zwiększyło liczbę komórek kubkowych/1 kosmek ($P < 0,01$). Z kolei Giannenas i wsp. (2016) nie zaobserwowali wpływu *Enterococcus faecium* na tę cechę u tuczników. Według Baum i wsp. (2002) dodatek *Saccharomyces boulardii* i *Bacillus cereus* wpływa korzystnie na strukturę nabłonka i morfologię krypt.

3.4.3. Ekspresja genów

W badaniach własnych uzupełnienie diety preparatem EM Bokashi zwiększyło aktywność genu kodującego cytokinę *IL10*, w grupie doświadczalnej E2, w porównaniu z grupą kontrolną (P-1). *IL10* jest cytokiną przeciwzapalną związaną ze szlakiem typu Th2, a jej wydzielanie odbywa się poprzez aktywację limfocytów i makrofagów. Wzrost poziomu

względnej ekspresji genu *IL10* może wywierać korzystny efekt w kontekście odpowiedzi immunologicznej w błonie śluzowej jelit, gdyż *IL10* hamuje aktywność cytokin prozapalnych, przeciwdziałając wystąpieniu stanu zapalnego. Wyniki zgodne z powyższymi uzyskano w badaniach Laskowskiej i wsp. (2019), gdzie również wykazano korzystny wpływ suplementacji EM Bokashi na wzrost stężenia *IL10* w surowicy ciężarnych loch (Laskowska i wsp., 2019). Badania przeprowadzone na innych gatunkach zwierząt gospodarskich (kura) lub modelowych (mysz) wydają się potwierdzać wzrost ekspresji genów po zastosowaniu suplementacji probiotycznej. Kolejnym analizowanym genem, w przypadku którego stwierdzono wzrost ekspresji, był *FABP4*, kodujący białko wiążące kwasy tłuszczowe. Przyjmuje się, że jego funkcja jest związana z gromadzeniem, transportem i metabolizmem kwasów tłuszczowych. Powyższe wyniki potwierdzają badania Suzuki i wsp. (2017) przeprowadzone na myszach, których dietę suplementowano probiotykiem zawierającym *Lactobacillus rhamonus* i *Lactococcus lactis*. W badaniach własnych wykazano również wzrost ekspresji genu *GLUT2*. Białko kodowane przez ten gen jest odpowiedzialne za dwukierunkowy transport glukozy (Stelzer i wsp., 2011). Według Faseleh Jahromi i wsp. (2016) dodanie probiotyków do diety kurcząt brojlerów skutkuje wyższą ekspresją genu *GLUT2*, co jest związane ze zwiększonym wychwytem glukozy. Ostatnim analizowanym genem, w przypadku którego stwierdzono korzystny wpływ dodatku EM na wzrost jego ekspresji, był *CLDN1*, kodujący białko związane z połączeniami między komórkami nabłonka i śródbłonka. Badania dotyczące wpływu wieloszczepowych probiotyków na komórki nabłonka, w szczególności: *L. rhamnosus* GG, *L. plantarum* i *L. salivarius*, wykazały ich korzystny wpływ na zwiększenie ekspresji białek związanych ze szczelnością jelit i połączeniami szczelinowymi (claudin-1, claudin-3 i JAM-1) (Miyachi i wsp., 2012; Patel i wsp., 2012). Połączenia te tworzą barierę fizyczną i regulują przepuszczalność ściany przewodu pokarmowego (Stelzer i wsp., 2011).

3.4.4. Jakość mięsa świń

Końcowe pH w dużym stopniu wpływa na cechy jakości mięsa, takie jak: wodochłonność, wyciek termiczny, barwa oraz kruchość. W badaniach Rybarczyka i wsp. (2016) oraz Rybarczyka i wsp. (2020) przeprowadzonych na mieszańcach dwurasowych, podobnie jak w badaniach własnych, nie zaobserwowano wpływu dodatku EM Bokashi na końcowe pH mięsa (P-2). Z kolei Zhang i wsp. (2015) wykazali wpływ naturalnego dodatku do paszy o działaniu przeciwutleniającym i przeciwzapalnym - resweratrolu (w ilości 300 mg/1 kg paszy) na zwiększenie wartości stopnia zakwaszenia mięsa mierzonego w 24 godziny po uboju ($P < 0,05$). Kolejnym parametrem, ważnym z perspektywy konsumenta i producenta z uwagi na przydatność mięsa do dalszego przetwarzania i jego kulinarne wykorzystanie jest zdolność utrzymania wody (Bogucka i Kapelański, 2005). Według Dowarah i wsp. (2018) *Pediococcus acidilactis* FT28 podawany loszkom rasy HD K-75 (krzyżówka Hampshire x rasa lokalna) w ilości 200 g/świnie/dzień wpływa na poprawę zdolności utrzymania wody ($P < 0,05$). Odmiennie wyniki badań przedstawili Chang i wsp. (2018), którzy nie zaobserwowali wpływu probiotyku zawierającego *Lactobacillus plantarum* (2.2×10^8 JTK/mL) na ten parametr w mięsie pochodzącym od 3-rasowych mieszańców (Landrace x Yorkshire x Duroc). Wysoka zdolność utrzymania wody może wskazywać na powolne i stałe tempo spadku pH w pierwszych godzinach po uboju (Cebulska i wsp., 2018). W badaniach własnych stwierdzono korzystny wpływ żywienia na wyciek termiczny w II wariacie żywieniowym, w grupie E2+EM, w której soję w II fazie tuczu zastąpiono w 100% grochem i łubinem. Odmiennie wyniki uzyskali Bocian i wsp. (2016), którzy nie wykazali wpływu żywienia świń roślinami strączkowymi na wyciek termiczny i kruchość mięsa. Z kolei w badaniach Zaworskiej-Zakrzewskiej i wsp. (2020) dieta świń z dodatkiem 5% surowych nasion soi wpłynęła istotnie na barwę mięsa. W badaniach własnych nie wykazano wpływu EM Bokashi na barwę mięsa, co jest zgodne z wynikami uzyskanymi przez Balasubramanian i wsp. (2018). Natomiast,

Mohammed i wsp. (2020) uzyskali wyższe wskaźniki jasności barwy mięsa w wyniku suplementacji *Bacillus subtilis*. Konsumenci preferują ciemniejszą, intensywną barwę mięsa, stąd wyższe wskaźniki jasności nie są korzystnym rezultatem. Kolejnym analizowanym parametrem była marmurkowatość, która w niniejszych badaniach kształtowała się na poziomie 1,39 pkt. (grupa E2) do 1,87 pkt. (grupa C), określana jako równomierne rozmieszczenie tłuszczu śródmięśniowego w śródmięśnej i omięśnej wewnętrznej. Według Černauskienė i wsp. (2011) probiotyki wpływają na barwę mięsa, jego marmurkowatość i jędrność, polepszając właściwości organoleptyczne mięsa. Następnie oceniono kruchość mięsa, na którą wpływ może mieć żywienie, wiek, rasa, obrót przed- i poubojowy zwierząt, a także czas i warunki, w jakich dojrzewa mięso oraz aktywność proteolityczna w trakcie przechowywania (Bocian i wsp., 2017). Według niniejszych badań dodatek EM w paszy zwierząt doświadczalnych zróżnicował kruchość mięsa. Według Chang i wsp. (2018) oraz Liu i wsp. (2013) suplementacja probiotyczna nie wpływa na kruchość mięsa. Niejednoznaczne wyniki uzyskano w badaniach Rybarczyka i wsp. (2020), w których probiotyk w dawce 0,5% wpływał na większe straty podczas rozmrażania i większą siłę cięcia, co jest efektem niekorzystnym oraz korzystnie na zwiększone wartości zaczerwienienia (a^*), zażółcenia (b^*) i nasycenia barwy (C^*), w porównaniu do grupy otrzymującej go w ilości 0,3% i grupy kontrolnej. Natomiast, Li i Zhang (2007) wykazali, że uzupełnienie diety *Lactobacillus CAU6001* stanowiącym 0,5% dawki wpływa korzystnie na jakość mięsa drobiowego. Według doniesień Sun i Kim (2020) suplementacja diety tuczników mieszanką kultur drożdży, ekstraktu czosnkowego i olejku czosnkowego - YGM w dawce 0,1% nie wpłynęła na jakość mięsa. W badaniach własnych dodatek EM Bokashi nie miał wpływu na wielkość powierzchni oka polędwicy. Jest to zgodne z badaniami Balasubramanian i wsp. (2016), którzy również nie wykazali wpływu 0,01% i 0,02% dodatku *Bacillus spp.* na wartość tej cechy (odpowiednio: 68,67 i 69,47 cm²). Efektywność suplementacji probiotycznej zależy od rodzaju zastosowanych bakterii, poziomu i czasu suplementacji, składu diety oraz interakcji z innymi składnikami diety (Meng i wsp., 2010).

3.4.5. Mikrostruktura mięśnia *longissimus lumborum* świń

Na cechy jakości mięsa – kruchość, barwę, smakowitość - w dużym stopniu wpływa struktura włókien mięśniowych, w szczególności ich liczba i średnica, oraz udział tłuszczu śródmięśniowego (Pisula i Pospiech, 2011). W badaniach własnych nie zaobserwowano zmian w udziale i gęstości włókien mięśniowych (**P-2**). Udział i średnice włókien STO, FTO i FTG mogą wykazywać zmienność w zależności od sposobu żywienia (Pisula i Pospiech, 2011). Lebedová i wsp. (2018) zaobserwowali istotnie niższy udział włókien FTG (81,38%) w grupie żywionej *ad libitum*, w porównaniu do świń z grup R1 i R2, o ograniczonym żywieniu (odpowiednio: 84,03 i 84,18%, $P < 0,05$). Zróżnicowany poziom białka surowego w diecie świń mieszańców również w istotny sposób wpływa na udział włókien STO, FTO i FTG w mięśni *LL* ($P < 0,001$) (Brzobohaty i wsp., 2013). Najwyższy poziom śrutu rzepakowej skutkowało największym udziałem włókien STO (16%), które są najbardziej pożądanymi z punktu widzenia jakości mięsa. Natomiast, mieszańce otrzymujące najniższy poziom białka surowego wykazały największy udział włókien FTG (86%) (Brzobohaty i wsp., 2013). W niniejszych badaniach zastosowanie EM Bokashi jako dodatku do diety świń zwiększyło średnice włókien FTO w grupie E1 i E2 oraz włókien FTG w grupie E1. Większy udział włókien FTG, o większej średnicy, wpływa na większą masę mięśnia (Pisula i Pospiech, 2011). Dodatek do diety oleju słonecznikowego lub oliwy z oliwek również wpływa na zwiększenie grubości włókien mięśniowych w mięśni *LL* świń (Pisula i Pospiech, 2011). Natomiast, Tian i wsp. (2021) zaobserwowali zmniejszenie średnicy włókien w mięśni *longissimus thoracis* w grupie świń żywionych *Lactobacillus reuteri 1*, w porównaniu z grupą otrzymującą antybiotyk olaquindoks i aureomycynę. Podobne wyniki uzyskano w badaniach Zhou i wsp.

(2016) po suplementacji diety tuczników 0,08% polifenolowym ekstraktem z liści *Eucommia ulmoides* Oliver (PEE) ($P < 0,05$). Duża liczba drobnych włókien przyczynia się do poprawy jakości mięsa (Choi i Kim, 2009). Inni autorzy (Bogucka i wsp., 2018; Brzobohaty i wsp., 2015; Skiba i wsp., 2012) wykazali wpływ ograniczonego żywienia na zwiększenie udziału i średnicy włókien FTG. Zmiany w sposobie żywienia, tj. różnicowanie poziomu białka i energii, suplementacja diety różnego rodzaju dodatkami paszowymi (probiotyki, prebiotyki, synbiotyki), czy stosowanie żywienia ograniczonego lub *ad libitum* mają duże znaczenie w kontekście zmian zachodzących w strukturze włókien mięśniowych (Pisula i Pospiech, 2011).

Stosunkowo niska zawartość tłuszczu śródmięśniowego u współcześnie hodowanych świń może być efektem realizowanych programów hodowlanych ukierunkowanych na wysoką mięsność (Liu i wsp., 2015). Z obserwacji wielu autorów wynika, że tradycyjne rasy (np. puławska) zawierają większą ilość tłuszczu śródmięśniowego, niż mieszańce komercyjne. Zawartość tłuszczu śródmięśniowego wpływa na kruchość, soczystość i smakowitość (Kasprzyk i Bogucka, 2020; Tomović i wsp., 2016). Badania Rybarczyka i wsp. (2020) wykazały, że 0,5% dodatek EM Probiotyk do diety świń zmniejsza (1,17%), a 0,3% dodatek zwiększa (1,58%) zawartość tłuszczu śródmięśniowego w mięśni *LL*, w porównaniu do grupy kontrolnej (1,33%). Natomiast, badania Vaclavkovej i wsp. (2016) nie wykazały wpływu sprzężonego kwasu linolowego w diecie tuczników na poziom tłuszczu śródmięśniowego. W badaniach Lopes i wsp. (2014) stwierdzono istotny, korzystny wzrost zawartości tłuszczu śródmięśniowego przy 5% obniżeniu poziomu białka w diecie ($P < 0,003$). Dodatek witaminy A (dVitA; 100 000 IU) do diety knurów rasy duroc spowodował wzrost zawartości tłuszczu śródmięśniowego u ich potomstwa o aż 20% (Olivares i wsp., 2009). Zawartość tłuszczu śródmięśniowego w mięśni *LL* świń poniżej 1% lub powyżej 3,5% uważa się za wadę jego jakości (Pisula i Pospiech, 2011).

Ostatnim etapem analizy mikrostruktury mięśnia *LL* świń było określenie wpływu pożytecznych mikroorganizmów na występowanie zmian histopatologicznych. W badaniach własnych wykazano, iż włókna normalne stanowiły około 96-98%, co jest zgodne z wynikami innych autorów (Bogucka i wsp., 2018). Według Wojtysiak (2012) na występowanie włókien olbrzymich wpływ ma żywienie, postępowanie ze zwierzętami przed ubojem, uwarunkowania genetyczne i rasa - głównie w odniesieniu do osobników wrażliwych na stres. Włókna te obserwuje się znacznie częściej w białych mięśniach świń, niż w mięśniach czerwonych. Odsetek włókien olbrzymich jest ściśle skorelowany z obniżonymi cechami jakości mięsa i niższym pH tkanki mięśniowej (Vrecl i wsp., 2020). Natomiast, na martwicę włókien mięśniowych, której odsetek w badaniach własnych był najniższy, wskazuje obecność histiocytozów, limfocytów i makrofagów (Bogucka i wsp., 2007). Rozszczepienie włókien (*splitting*), w zakresie którego wyniki badań własnych nie były jednoznaczne, jest jedną ze zmian patologicznych spowodowaną nadmiernym przeciążeniem włókien mięśniowych. Zwykle wiąże się to z grubymi włóknami i jest wynikiem niedotlenienia i niskiego wchłaniania metabolitów (Makovický i Makovický, 2020). W badaniach Boguckiej i wsp. (2018) zaobserwowano korzystny wpływ dodatku synbiotyku do diety kurcząt brojlerów na niższy % rozszczepienia włókien. Pomimo niejednoznacznych wyników badań Semenova i wsp. (2019) autorzy zalecają stosowanie dodatków paszowych w celu ograniczenia występowania zmian patologicznych, co wydaje się mieć istotny związek z jakością mięsa.

3.4.6. Udział białek tkanki mięśniowej w mięśni *longissimus lumborum*

W niniejszym badaniu wykazano istotny statystycznie wpływ suplementacji EM na udział 2 z 8 badanych białek mięśnia *LL* (**P-2**). Zmiany w udziale białka o masie cząsteczkowej 205 kDa mogą sugerować wpływ zastosowanych efektywnych mikroorganizmów na procesy

poubojowej degradacji i zmianę integralności kompleksu aktomiozyny. Zmniejszenie udziału tego białka, co wykazano w badaniach własnych, może wskazywać na procesy utleniania, które mogą prowadzić do zmian funkcjonalnych białek mięśniowych, w tym aktywności systemu kalpain - enzymów szczególnie podatnych na utlenianie (Huff-Lonergan i wsp., 2010; Zhang i wsp., 2013). Utlenianie kalpain zmniejsza szybkość dojrzewania mięsa i jest czynnikiem zwiększającym wielkość wycieku. Ponadto, system kalpainowy jest odpowiedzialny za poubojową proteolizę białek, decydując tym samym o kruchości i zdolności utrzymania wody (Pisula i Pospiech, 2011). W badaniach Cheng i wsp. (2020) wykazano, że dodatek polifenoli morwy hamował utlenianie białek sarkoplazmatycznych i miofibrylarnych w plastrach mięsa wieprzowego. Szybsze i bardziej rozległe procesy degradacji białek miofibrylarnych i cytoszkietowych w trakcie dojrzewania mięsa sprzyjają większej zdolności utrzymania wody oraz zmniejszają wielkość wycieku (Pisula i Pospiech, 2011). Badania Malva i wsp. (2017) przeprowadzone na owcach rasy merynos włoski, które żywiono z dodatkiem komosy ryżowej i/lub siemienia lnianego, wykazały zmniejszony udział miozyny w grupie doświadczalnej. Natomiast, zastosowanie tylko siemienia lnianego wpłynęło na zmniejszenie udziału Tn-T (Malva i wsp., 2017). Miozyna stanowi najważniejsze białko tkanki mięśniowej, ponieważ w istotny sposób wpływa na właściwości technologiczne mięsa, tj. zdolność wiązania i utrzymywania wody oraz jego kruchość (Pisula i Pospiech, 2011). Adeyemi i wsp. (2015) nie zaobserwowali wpływu uzupełnienia diety rzepakiem i olejem palmowym na zmiany w rozdzielach elektroforetycznych białek w mięsie kóz. Badania Sugiharto i wsp. (2019) przeprowadzono w celu oceny wpływu 0.5% dodatku kilku szczepów *Bacillus* na mięsień piersiowy kurcząt brojlerów zakażonych *Escherichia coli*. Stwierdzono, że pasma 51 i 53 kDa były mniej intensywne w grupie żywionej z dodatkiem probiotyku, w porównaniu do grupy kontrolnej.

W badaniach własnych stwierdzono istotne statystycznie korelacje - dodatnie i ujemne pomiędzy białkami, a cechami jakości mięsa i mikrostruktury mięśnia LL. Takie oddziaływanie jednych cech na drugie wynika z intensywnie i wielopłaszczyznowo przebiegających procesów chemicznych zachodzących w mięśni. Wykazana w niniejszych badaniach ujemna korelacja pomiędzy % włókien FTO, a białkiem o masie cząsteczkowej 17 kDa, która odpowiada mioglobinie, może wynikać z jej mniejszej zawartości we włóknach FTO, w porównaniu do włókien STO. Zawartość mioglobiny w mięśni zależy w szczególności od gatunku i rodzaju mięśnia (Pisula i Pospiech, 2011). Mięśnie z większym udziałem włókien o metabolizmie glikolitycznym, są bardziej podatne na wczesną poubojową degradację proteolityczną (Lee i wsp., 2010). Większy udział tych włókien, odnotowany w badaniach własnych, wskazuje na wyższą zawartość enzymów glikolitycznych. Zwiększone uwalnianie białek miofibrylarnych mięsa do frakcji rozpuszczalnej może wskazywać na bardziej intensywną proteolizę (Marino i wsp., 2014). Procesy proteolityczne zachodzące w mięśni po uboju oraz podczas przechowywania i dojrzewania mięsa determinują cechy jakości mięsa, takie jak kruchość, barwa i smakowitość. Degradacja proteolityczna białek miofibrylarnych i cytoszkietowych w istotny sposób wpływa na kształtowanie kruchości mięsa, wskazując na zmiany strukturalne w mięśniach szkieletowych (Grześ i wsp., 2017). W badaniach własnych, stwierdzono ujemną, istotną statystycznie korelację ($r_{xy}=-0,634$; $P\leq 0,05$) pomiędzy kruchością mięsa, a białkami o masie w zakresie 35-18 (kDa) odpowiadającej m.in. produktom degradacji troponiny-T. Stwierdzono również zależność pomiędzy białkiem o masie 105 (kDa), które odpowiada swoją masą alfa aktyninie, a liczbą i udziałem włókien FTO (odpowiednio $r_{xy}=-0,620$ i $r_{xy}=-0,789$; $P\leq 0,05$). Wyższy udział włókien FTO przy jednocześnie niższym stężeniu tych białek oraz innych ważnych produktów degradacji białek miofibrylarnych i cytoszkietowych, może wskazywać na mniej intensywny proces kruszenia mięsa. Proces ten polega na degradacji lub uwolnieniu białek tkanki mięśniowej, w szczególności białek o masie 3700, 105 i 38 kDa oraz wiąże się ze zmianą udziału białek frakcji wycieku wirówkowego w zakresie 3700–2400

i 38–36 kDa (Grześ i wsp., 2017). Wskaźnikiem procesu dojrzewania i kruszenia mięsa jest troponina-T oraz produkty jej degradacji. Osłabienie struktury sarkomeru wskutek degradacji białek może wpływać na lepszą kruchość mięsa (Iwańska i wsp., 2016). Uzyskana w badaniach własnych zależność potwierdza wzrost kruchości w miarę wzrostu ilości tych produktów.

W badaniach własnych wykazano również dodatnią korelację pomiędzy pasmem 205 kDa, które zawierało w swoim składzie łańcuchy ciężkie miozyny MHC, a udziałem tłuszczu śródmięśniowego, którego zawartość jest jedną z głównych cech związanych z jakością mięsa, a jego równomierne rozmieszczenie nadaje mięsu odpowiednią barwę, kruchość i soczystość (Pisula i Pospiech, 2011). Jednakże, zależności pomiędzy zawartością tłuszczu śródmięśniowego i składem kwasów tłuszczowych, a obecnością izoform miozyny nie potwierdziły badania Velotto i wsp. (2018) przeprowadzone na świnia rasy Cinta Senese.

3.5. PODSUMOWANIE

Podsumowując, przeprowadzone doświadczenie, którego celem było określenie wpływu efektywnych mikroorganizmów na parametry produkcyjne, cechy morfologiczne jelita czczego oraz ekspresję genów w jego błonie śluzowej (**P-1**), a także jakość mięsa, mikrostrukturę i elektroforetyczny rozdział wybranych białek w mięśni *longissimus lumborum* (*LL*) (**P-2**) u świń żywionych różnymi dietami, pozwoliło na zweryfikowanie postawionych hipotez.

Ponadto, przeprowadzone doświadczenie pozwoliło na sformułowanie poniższych wniosków:

1. Nie wykazano wpływu zastosowania efektywnych mikroorganizmów (EM) w diecie na cechy produkcyjne świń. Dodatek probiotyku wpłynął jedynie na zwiększenie końcowej masy ciała tuczników w grupie żywionej standardowo w oparciu o poekstrakcyjną śrutę sojową (**P-1**).
2. Suplementacja preparatem EM Bokashi wpłynęła korzystnie na cechy histomorfologiczne jelita czczego świń (wysokość, szerokość oraz pole powierzchni kosmków jelitowych, stosunek wysokości kosmków do głębokości krypt), co świadczy o wysokim potencjale trawiennym jelita. Większa liczba komórek kubkowych w jelicie na skutek zastosowania EM wykazana w II wariantcie żywieniowym wiąże się z większą ilością wydzielanego śluzu, poprawiając tym samym szczelność nabłonka jelitowego, co z kolei wpływa na poprawę ogólnej zdrowotności zwierząt (**P-1**).
3. Żywienie świń suplementem probiotycznym zawierającym EM spowodowało korzystny wzrost ekspresji genów w błonie śluzowej jelit, w większości w II wariantcie żywieniowym, związanych z metabolizmem kwasów tłuszczowych i glukozy, odpowiedzią układu immunologicznego poprzez wzrost aktywności cytokin przeciwzapalnych oraz tworzeniem ścisłych połączeń, poprawiając szczelność nabłonka jelitowego świń (**P-1**).
4. Nie odnotowano wyraźnego wpływu EM na cechy jakości mięsa świń oraz mikrostruktury mięśnia *longissimus lumborum*. Dodatek preparatu probiotycznego do diety wpłynął korzystnie na wielkość wycieku termicznego z mięsa w II wariantcie żywieniowym, a także spowodował zwiększenie średnicy włókien mięśniowych szybko kurczliwych, szczególnie widoczne w przypadku I wariantu żywieniowego. W tej samej grupie świń probiotyk zawierający EM wpłynął na obniżenie udziału włókien rozszczeplonych (**P-2**).
5. Dodatek do diety EM skutkował zmniejszeniem udziału białka o masie 205 kDa. Wskazywać to może na procesy utleniania, które spowalniają proces kruszenia mięsa. Korzystny wpływ suplementacji probiotycznej stwierdzono w przypadku białka o masie 36 kDa, odpowiadającego troponinie-T, którego większy udział może wskazywać na bardziej intensywny proces kruszenia mięsa (**P-2**).
6. Uzyskane wyniki badań w wariantach żywieniowych I i II wskazują, że stosowanie grochu i łubinu- krajowych źródeł białka, jako zamienników soi, może być z powodzeniem stosowane w żywieniu świń (**P-1, P-2**).

3.6. LITERATURA

1. Adeyemi K.D., Sabow A.B., Shittu R.M., Karim R., Sazili A., 2015. Influence of dietary canola oil and palm oil blend and refrigerated storage on fatty acids, myofibrillar proteins, chemical composition, antioxidant profile and quality attributes of semimembranosus muscle in goats. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 6(51), 1–13.
2. Arnal M.E., Lallès J.P., 2016. Gut epithelial inducible heat-shock proteins and their modulation by diet and the microbiota. *Nutr. Rev.* 74(3), 181–197.
3. Babinska I., Rotkiewicz T., Otrocka-Domagała I., 2005. The effect of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium spp.* administration on the morphology of the gastrointestinal tract, liver and pancreas in piglets. *Pol. J. Vet. Sci.* 8(1), 29–35.
4. Baer A.A., Miller M.J., Dilger A.C., 2013. Pathogens of interest to the pork industry: A review of research on interventions to assure food safety. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 12(2), 183–217.
5. Balasubramanian B., Li T., Kim W.H., 2016. Effects of supplementing growing-finishing pig diets with *Bacillus spp.* probiotic on growth performance and meat-carcass grade quality traits. *R. Bras. Zootec.* 45(3), 93–100.
6. Balasubramanian B., Lee S.I., Kim I.H., 2018. Inclusion of dietary multi-species probiotic on growth performance, nutrient digestibility, meat quality traits, faecal microbiota and diarrhea score in growing-finishing pigs. *Ital. J. Anim. Sci.* 17(1), 100–106.
7. Baum B., Liebler-Tenorio E.M., Enss M.L., Pohlenz J.F., Breves G., 2002. *Saccharomyces boulardii* and *Bacillus cereus var. toyoi* influence the morphology and the mucins of the intestine of pigs. *Z Gastroenterol.* 40(5), 277–284.
8. Bilić-Šobot D., Kubale V., Škrlep M., Čandek-Potokar M., Prevolnik Povše M., Fazarinc G., Škorjanc D., 2016. Effect of hydrolysable tannins on intestinal morphology, proliferation and apoptosis in entire male pigs. *Arch. Anim. Nutr.* 70(5), 378–388.
9. Bocian M., Kapelański W., Adamowicz M., Jankowiak H., Cebulska A., Gimińska A., Mońko A., 2016. Influence of nutrition of pigs with legume-enriched mixtures on the quality of pork. *Nauka Przyr. Technol.* 10(4), 1–8.
10. Bocian M., Jankowiak H., Kapelański W., Reszka P., Szafrńska M., 2017. Results of pork meat quality assessment in relation to its tenderness. *Post. Nauk. Technol. Przem. Rol. Spoż.* 72(3), 5–14.
11. Bogucka J., Kapelański W., 2005. Microstructure of *longissimus lumborum* muscle in pigs of several breeds and its relation to meat quality traits. *Folia Biol.* 53(4), 85–90.
12. Bogucka J., Elminowska-Wenda G., Walasik K., Kapelański W., 2007. Incidence of histopathological changes in *longissimus lumborum* muscle of wild boar-domestic pig hybrids. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 57(4), 49–52.
13. Bogucka J., Kapelański W., 2016. Microstructure of *longissimus lumborum* muscle and meat quality of native Polish pig breeds: Żłotnicka Spotted and Puławska. *Ann. Anim. Sci.* 16(4), 1199–1210.
14. Bogucka J., Ribeiro D.M., Costa R.P.R., Bednarczyk M., 2018. Effect of synbiotic dietary supplementation on histological and histopathological parameters of Pectoralis major muscle of broiler chickens. *Czech J. Anim. Sci.* 63(7), 263–271.
15. Bogucka J., Ribeiro D.M., Bogusławska-Tryk M., Dankowiakowska A., da Costa R.P.R., Bednarczyk M., 2019. Microstructure of the small intestine in broiler chickens fed a diet with probiotic or synbiotic supplementation. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 103(6), 1785–1791.
16. Bontempo V., Giancamillo A.D., Savoini G., Dell'Orto V., Domeneghini C., 2006. Live yeast dietary supplementation acts upon intestinal morpho-functional aspects and growth in weanling piglets. *Anim. Feed. Sci. Tech.* 129(3-4), 224–236.
17. Brooke M.H., 1970. Some comments on neural influence on the two histochemical types of muscle fibres. In *Physiology and Biochemistry on Muscle as a Food*; Briskey, E.J., Cassens, R.G., Marsh, B.B. (red.), University Wisconsin: Madison, WI, USA, 131.
18. Brzobohatý L., Stupka R., Cítek J., Šprysl M., Okrouhlá M., Vehovský K., Kluzáková E., 2013. The effects of different nutrient composition in the feed on the muscle fibers typology in pigs. *Res. Pig Breed.* 7(2), 7–11.

19. Brzobohaty L., Stupka R., Citek J., Šprysl M., Okrouhlá M., Vehovský K., 2015. The influence of controlled nutrition intensity on the muscle fiber characteristics in fattening pigs. *J. Cent. Eur. Agric.* 16(1), 92–99.
20. Cebulska A., Václavková E., Bocian M., Dybała J., Wisniewska A., Kapelanski W., 2018. Quality and dietary value of pork meat of the Puławska and Złotnicka Spotted breeds, and commercial fattening pigs. *Ann. Anim. Sci.* 18(1), 281–291.
21. Černauskienė J., Bartkeviciute Z., Hammerer J., Kozłowski K., Jeroch H., 2011. The effect of ‘Bonvital’, a probiotic product containing *Enterococcus faecium* on the fattening performance, carcass characteristics and meat quality of pigs under production conditions. *Vet. Med. Zoot.* 54(76), 20–25.
22. Chang S.Y., Belal A.A., Kang A.R., Choi Y.I., Kim Y.H., Choe H.S., Heo J.Y., Shim K.S., 2018. Influence of probiotics-friendly pig production on meat quality and physicochemical characteristics. *Korean J. Food Sci. Anim. Resour.* 38(2), 403–416.
23. Cheng W., Cheng J.H., Sun D.W., Pu H., 2015. Marbling analysis for evaluating meat quality: methods and techniques. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 14(5), 523–535.
24. Cheng J., Xu L., Xiang R., Liu X., Zhu M., 2020. Effects of mulberry polyphenols on oxidation stability of sarcoplasmic and myofibrillar proteins in dried minced pork slices during processing and storage. *Meat Sci.* 160, 107973.
25. Choi Y.M., Kim B.C., 2009. Muscle fiber characteristics, myofibrillar protein isoforms, and meat quality. *Livest. Prod. Sci.* 122(2-3), 105–118.
26. CIE, 1986. Colorimetry, Publication CIE 15.2, wyd. 2; Vienna, Austria.
27. Collado M.C., Grześkowiak Ł., Salminen S., 2007. Probiotic strains and their combination inhibit in vitro adhesion of pathogens to pig intestinal mucosa. *Curr. Microbiol.* 55(3), 260–265.
28. Davis M.E., Parrott T., Brown D.C., de Rodas B.Z., Johnson Z.B., Maxwell C.V., Rehberger T., 2008. Effect of a *Bacillus*-based direct-fed microbial feed supplement on growth performance and pen cleaning characteristics of growing-finishing pigs. *J. Anim. Sci.* 86(6), 1459–1467.
29. Delia E., Tafaj M., Männer K., 2012. Efficiency of probiotic in farm animals. *Probiotic in Animals*. Rijeka, HR: Everlon Cid Rigobelo, IntechOpen.
30. Dowarah R., Verma A.K., Agarwal N., Patel B.H.M., Singh P., 2016. Effect of swine based probiotic on performance, diarrhoea scores, intestinal microbiota and gut health of grower-finisher crossbred pigs. *Livest. Sci.* 195, 74–79.
31. Dowarah R., Verma A.K., Agarwal N., Singh P., 2018. Efficacy of species-specific probiotic *Pediococcus acidilactici* FT28 on blood biochemical profile, carcass traits and physicochemical properties of meat in fattening pigs. *Res. Vet. Sci.* 117, 60–64.
32. Dubovitz W., Brooke M., Neville H.E., 1973. *Muscle Biopsy: A modern approach*; W.B. Saunders Company LTD London: Toronto, ON, Canada.
33. Faseleh Jahromi M., Wesam Altaher Y., Shokryazdan P., Ebrahimi R., Ebrahimi M., Idrus Z., Tufarelli V., Liang J.B., 2016. Dietary supplementation of a mixture of *Lactobacillus* strains enhances performance of broiler chickens raised under heat stress conditions. *Int. J. Biometeorol.* 60(7), 1099–1110.
34. Fritz J.D., Greaser M.L., 1991. Changes in titin and nebulin in postmortem bovine muscle revealed by gel-electrophoresis, western blotting and immunofluorescence microscopy. *J. Food Sci.* 56(3), 607–610.
35. Ganeshkumar S., Gnanaraj P.T., Sivakumar T., Karthickeyan S., Murugan M., 2009. Effect of probiotic supplementation on the carcass traits and sensory qualities of swill fed pork. *Tamil. J. Vet. Anim. Sci.* 5(4), 157–160.
36. Giang H.H., Viet T.Q., Ogle B., Lindberg J.E., 2011. Effects of supplementation of probiotics on the performance, nutrient digestibility and faecal microflora in growing- finishing pigs. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 24(5), 655–661.
37. Giannenas I., Doukas D., Karamoutsios A., Tzora A., Bonos E., Skoufos I., Tsinas A., Christaki E., Tontis D., Florou-Paneri P., 2016. Effects of *Enterococcus faecium*, mannan oligosaccharide, benzoic acid and their mixture on growth performance, intestinal microbiota, intestinal morphology and blood lymphocyte subpopulations of fattening pigs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 220, 159–167.

38. Grau R., Hamm R., 1952. Eine einfache methode zur bestimmung der Wasserbindung Im fleisch. Fleischwirtschaft. 4, 295–297.
39. Grześ B., Pospiech E., Iwańska E., Mikołajczak B., Łyczyński A., Koćwin-Podsiadła M., Krzęcio-Niczyporuk E., 2017. The relationship between protein changes in porcine *longissimus* muscle at different courses of meat tenderisation. Eur. Food Res. Technol. 243(11), 2025–2034.
40. Guerra N.P., Bernardez P.F., Mendez J., Cachaldora P., Pastrana Castro L., 2007. Production of four potentially probiotic lactic acid bacteria and their evaluation as feed additives for weaned piglets. Anim. Feed Sci. Technol. 134(1-2), 89–107.
41. Huff-Lonergan E., Zhang W.G., Lonergan S.M., 2010. Biochemistry of postmortem muscle-lessons on mechanisms of meat tenderization. Meat Sci. 86(1), 184-195.
42. Iwańska E., Mikołajczak B., Grześ B., Pospiech E., 2016. Wpływ procesu poubojowego dojrzewania mięsa wieprzowego na zmiany profilu białek i kruchość. Med. Weter. 72(7), 458-462.
43. Jukna C., Jukna V., Šimkus A., 2005. The effect of probiotics and phytobiotics on meat properties and quality in pigs. Vet. Med. Zoot. 29(51), 80–84.
44. Jung K., Saif L.J., 2017. Goblet cell depletion in small intestinal villous and crypt epithelium of conventional nursing and weaned pigs infected with porcine epidemic diarrhea virus. Res. Vet. Sci. 110, 12-15.
45. Kasprzyk A., Bogucka J., 2020. Meat quality of Pulawska breed pigs and image of *longissimus lumborum* muscle microstructure compared to commercial DanBred and Naima hybrids. Arch. Anim. Breed. 63(2), 293–301.
46. Kritas S.K., Marubashi T., Filioussis G., Petridou E., Christodoulopoulos G., Burriel A.R., Tzivara A., Theodoridis A., Pískoriková M., 2015. Reproductive performance of sows was improved by administration of a sporing bacillary probiotic (*Bacillus subtilis* C-3102). J. Anim. Sci. 93(1), 405-413.
47. Kurchaeva E., Ovsynnikova G., Vostroilov A., Maksimov I., 2018. Influence of probiotic preparations on meat quality of farm animals. International scientific and practical conference "AgroSMART - Smart solutions for agriculture" (AgroSMART 2018).
48. Laskowska E., Jarosz Ł., Grądzki Z., 2019. Effect of multi-microbial probiotic formulation Bokashi on pro- and antiinflammatory cytokines profile in the serum, colostrum and milk of sows, and in a culture of polymorphonuclear cells isolated from colostrum. Probiotics Antimicrob. Proteins. 11(1), 220–232.
49. Lebedová N., Okrouhlá M., Zadinová K., Citek Z., Stupka R., 2018. Muscle fibre composition and meat quality in pigs with different nutrition level. In Proceedings of the IOP Conference Series: Materials Science and Engineering, 2nd Nommensen International Conference on Technology and Engineering, Medan, Indonesia.
50. Lee S.H., Joo S.T., Ryu Y.C., 2010. Skeletal muscle fiber type and myofibrillar proteins in relation to meat quality. Meat Sci. 86(1), 166-170.
51. Li G., Yao W., Jiang H., 2014. Short-chain fatty acids enhance adipocyte differentiation in the stromal vascular fraction of porcine adipose tissue. J. Nutr. 144(12), 1887-1895.
52. Li J., Zhang R.J., 2007. Effect of probiotic on performance, carcass traits and meat quality of broiler chickens. Chinese J. Anim. Nutri. 19, 372–378
53. Liao F.S., Nyachoti M., 2017. Using probiotics to improve swine gut health and nutrient utilization. Anim. Nutr. 3(4), 331–343.
54. Liu T.Y., Su B.C., Wang J.L., Zhang C., Shan A.S., 2013. Effects of probiotics on growth, pork quality and serum metabolites in growing-finishing pigs. J. Northeast Agric. Univ. 20(4), 57–63.
55. Liu Y., Kong X., Jiang G., Tan B., Deng J., Yang X., Li F., Xiong X., Yin Y., 2015. Effects of dietary protein/energy ratio on growth performance, carcass trait, meat quality, and plasma metabolites in pigs of different genotypes. J. Animal Sci. Biotechnol. 6(1), 36.
56. Liu J.B., Cao S.C., Liu J., Xie Y.N., Zhang H.F., 2018. Effect of probiotics and xylo-oligosaccharide supplementation on nutrient digestibility, intestinal health and noxious gas emission in weanling pigs. Asian-Australas. J. Anim. Sci. 31(10), 1660-1669.

57. Livak K. J., Schmittgen T. D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$. *Methods*. 25(4), 402–408.
58. Lopes P.A., Costa A.S.H., Costa P., Pires V.M.R., Madeira M.S., Acheha F., Pinto R.M.A., Prates J.A.M., 2014. Contrasting cellularity on fat deposition in the subcutaneous adipose tissue and *longissimus lumborum* muscle from lean and fat pigs under dietary protein reduction. *Anim.* 8(4), 629–637.
59. Mair C., Plitzner C., Pfaffl M.W., Schedle K., Meyer H.D., Windisch W., 2010. Inulin and probiotics in newly weaned piglets: effects on intestinal morphology, mRNA expression levels of inflammatory marker genes and haematology. *Arch. Anim. Nutr.* 64(4), 304–321.
60. Makovický P., Makovický P., 2020. Histological aspects of skeletal muscle fibers splitting of C57BL/6NcrJ mice. *Physiol. Res.* 69(2), 291–296.
61. Malva A., Marino R., Santillo A., Annicchiarico G., Caroprese M., Sevi A., Albenzio M., 2017. Proteomic approach to investigate the impact of different dietary supplementation on lamb meat tenderness. *Meat Sci.* 131, 74–81.
62. Manning T.S., Gibson G.R., 2004. Microbial-gut interactions in health and disease. *Prebiotics. Best Pract. Res.: Clin. Gastroenterol.* 18(2), 287–298.
63. Marino R., Albenzio M., della Malva A., Caroprese M., Santillo A., 2014. Changes in meat quality traits and sarcoplasmic proteins during aging in three different cattle breeds. *Meat Sci.* 98(2), 178–186.
64. Meng Q.W., Yan L., Ao X., Zhou T.X., Wang J.P., Lee J.H., Kim I.H., 2010. Influence of probiotics in different energy and nutrient density diets on growth performance, nutrient digestibility, meat quality, and blood characteristics in growing-finishing pigs. *J. Anim. Sci.* 88(10), 3320–3326.
65. Metchnikoff E., 1907. *The prolongation of life: optimistic studies*. English trans. Mitchell P.C. GP Putnam's Sons, Nowy Jork, 161–183.
66. Migdał W., Wojtysiak D., Pasciak P., 2005. The histochemical profile of fatteners' muscles depending on the type of muscles, gender and breed of fatteners, their body weight, and feeding. *Zywn. Nauk. Technol.* 12(3), 157–168.
67. Mishra D.K., Verma A.K., Agarwal N., Singh P., 2016. Effect of probiotics on blood biochemical profile, immunity and small intestine morphology in growing finishing pigs. *Agric. Res.* 5(4), 407–412.
68. Miyauchi E., O'Callaghan J., Buttó L. F., Hurley G., Melgar S., Tanabe S., Shanahan F., Nally K., O'Toole P.W., 2012. Mechanism of protection of transepithelial barrier function by *Lactobacillus salivarius*: strain dependence and attenuation by bacteriocin production. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 303(9), 1029–1041.
69. Mohammed A.A., Zaki R.S., Negm E.A., Mahmoud M.A., Cheng H.W., 2020. Effect of dietary supplementation of probiotic (*Bacillus subtilis*) on bone mass and meat quality of broiler chickens. *Poult. Sci.* 100(3), 100906.
70. Montagne L., Pluske J.R., Hampson D. J., 2003. A review of interactions between dietary fibre and the intestinal mucosa, and their consequences on digestive health in young non-ruminant animals. *Anim. Feed Sci. Technol.* 108(1–4), 95–117.
71. Mroz Z., 2001. Some developments on Dutch nutritional approaches to protect piglets against post-weaning gastrointestinal disorders in the absence of in-feed antibiotics. *J. Anim. Feed Sci.* 10(1), 153–167.
72. Ng S.C., Hart A.L., Kamm M.A., Stagg A.J., Knight S.C., 2009. Mechanisms of action of probiotics: recent advances. *Inflamm. Bowel Dis.* 15(2), 300–310.
73. Nistor E., Bampidis V., Pentea M., Prundeanu H., Ciolac V., 2012. Nutritional quality of pork produced by mangalitsa breed. *Anim. Sci. Biotechnol.* 45(2), 386–389.
74. Nossol C., Barta-Böszörményi A., Kahlert S., Zuschratter W., Faber-Zuschratter H., Reinhardt N., Ponsuksili S., Wimmers K., Diesing A.K., Rothkötter H.J., 2015. Comparing two Intestinal Porcine Epithelial Cell Lines (IPECs): morphological differentiation, function and metabolism. *PLoS One.* 10(7), e0132323.
75. NPPC (National Pork Producers Council), 1999. NPPC Marbling Standards; NPPC: Des Moines, IA, USA.

76. Nygard A.B., Jørgensen C.B., Cirera S., Fredholm M., 2007. Selection of reference genes for gene expression studies in pig tissues using SYBR green qPCR. *BMC Mol. Biol.* 8(67).
77. Ohashi Y., Ushida K., 2009. Health-beneficial effects of probiotics: Its mode of action. *Anim. Sci. J.* 80(4), 361-371.
78. Olivares A., Daza A., Rey A.I., Lopez-Bote C.J., 2009. Interactions between genotype, dietary fat saturation and vitamin A concentration on intramuscular fat content and fatty acid composition in pigs. *Meat Sci.* 82(1), 6–12.
79. Patel R.M., Myers L.S., Kurundkar A.R., Maheshwari A., Nusrat A., Lin, P.W., 2012. Probiotic bacteria induce maturation of intestinal claudin 3 expression and barrier function. *Am. J. Pathol.* 180(2), 626–635.
80. Pisula A., Pospiech E., 2011. Mięso- podstawy nauki i technologii. Wydawnictwo SGGW, Warszawa.
81. Pluske J.R., Hampson D.J., Williams I.H., 1997. Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review. *Livest. Prod. Sci.* 51(1-3), 215-236.
82. Pohja M.S., Niinivaara F.P., 1957. Die Bestimmung der Wasserbindung des Fleischmittels der Konstant Druck methode. *Fleischwirtschaft.* 9, 193–195.
83. Prieto M.L., O'Sullivan L., Tan S.P., McLoughlin P., Hughes H., O'Donovan O., Rea M.C., Kent R.M., Cassidy J.P., Gardiner G.E., Lawlor P.G., 2014. Evaluation of the efficacy and safety of a marine-derived *Bacillus* strain for use as an in-feed probiotic for newly weaned pigs. *PLoS One.* 9(2), e88599.
84. Rekiel A., Bielecki W., Cichowicz M., Więcek J., Kulisiewicz J., 2008. Effect of chosen feed additives on the histology of mucosa in fatteners intestines. *Med. Wet.* 64(3), 339-343.
85. Rekiel A., Bielecki W., Wiecek J., 2010. The effect of probiotics on the morphological characteristics of the small intestinal mucosa. *Acta Vet. Brno.* 79(4), 519– 524.
86. Rubio L.A., Ruiz R., Peinado M.J., Echavarri A., 2010. Morphology and enzymatic activity of the small intestinal mucosa of Iberian pigs as compared with a lean pig strain. *J. Anim. Sci.* 88(11), 3590– 3597.
87. Rybarczyk A., Romanowski M., Karamucki T., Ligocki M., 2016. The effect of Bokashi probiotic on pig carcass characteristics and meat quality. *Fleischwirtsch. Int.* 31(1), 74–77.
88. Rybarczyk A., Bogusławska-Wąs E., Łupkowskac A., 2020. Effect of EM® probiotic on gut microbiota, growth performance, carcass and meat quality of pigs. *Livest. Sci.* 241, 104206.
89. Semenova A.A., Kuznetsova T.G., Nasonova V.V., Nekrasov R.V., Bogolyubova N.V., 2019. Myopathy as a destabilizing factor of meat quality formation. *Theory Pr. Meat Proc.* 4(3), 24–31.
90. Shim S.B., Verstegen M.W., Kim I.H., Kwon O.S., Verdonk J.M., 2005. Effects of feeding antibiotic-free creep feed supplemented with oligofructose, probiotics or synbiotics to suckling piglets increases the preweaning weight gain and composition of intestinal microbiota. *Arch. Anim. Nutr.* 59(6), 419-427.
91. Singh P., Sabaté J., Fraser G.E., 2003. Does low meat consumption increase life expectancy in humans? *Am. J. Clin. Nutr.* 78(3), 526-532.
92. Skiba G., Raj S., Poławska E., Pastuszewska B., Elminowska- Wenda G., Bogucka J., Knecht D., 2012. Profile of fatty acids, muscle structure and shear force of musculus *longissimus dorsi* (MLD) in growing pigs as affected by energy and protein or protein restriction followed by realimentation. *Meat Sci.* 91(3), 339–346.
93. Stelzer G., Dalah I., Stein T.I., Satanower Y., Rosen N., Nativ N., Oz-Levi D., Olender T., Belinky F., Bahir I., Krug H., Perco P., Mayer B., Kolker E., Safran M., Lancet D., 2011. In-silico human genomics with Gene Cards. *Hum. Genomics.* 5, 709–717.
94. Strona internetowa: www.statistica.com – dostęp styczeń 2021.
95. Sudikas G., Kulpys J., Jerešiūnas A., Juškienė V., Leikus R., Norvilienė J., 2010. The influence of probiotics on carcass, meat and fat quality in pigs. *Vet. Ir Zootech.* 52(74), 79-86.
96. Sugiharto S., Yudiarti T., Isroli I., Widiastuti E., Hi W., Ta S., An A., Nurwantoro N., 2019. Breast muscle characteristics of avian pathogenic *Escherichia Coli* infected broilers fed with antibiotics or probiotic. *Poult. Sci. J.* 7(2), 131-140.

97. Sun H.Y, Kim I.H., 2020. Effect of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) and garlic (*Allium sativum*) product mixture on growth performance, nutrient digestibility, faecal microflora, faecal noxious-gas emission and meat quality in finishing pigs. *Anim. Prod. Sci.* 60(16), 1911-1917.
98. Suo C., Yin Y., Wang X., Lou X., Song D., Wang X., Gu Q., 2012. Effects of *Lactobacillus plantarum* ZJ316 on pig growth and pork quality. *BMC Vet. Res.* 8(1), 89.
99. Suzuki C., Aoki-Yoshida A., Aoki R., Sasaki K., Takayama Y., Mizumachi K., 2017. The distinct effects of orally administered *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* C59 on gene expression in the murine small intestine. *PLoS One.* 12(12), e0188985.
100. Szalata M., Pospiech E., Łyczyński A., Urbaniak M., Frankiewicz A., Mikołajczak B., Medyński A., Rzosińska E., Bartkowiak Z., Danyluk B., 1999. Tenderness of meat from pigs of various quality. *Rocz. Inst. Przem. Mięś. Tuszcz.* 36, 61–76.
101. Tian Z., Cui Y., Lu H., Wang G., Ma X., 2021. Effect of long-term dietary probiotic *Lactobacillus reuteri* 1 or antibiotics on meat quality, muscular amino acids and fatty acids in pigs. *Meat Sci.* 171, 108234.
102. Tomović V.M., Šević R., Jokanović M., Šojić B., Škaljac S., Tasić T., Ikonić P., Polak M.L., Polak T., Demšar L., 2016. Quality traits of *longissimus lumborum* muscle from White Mangalica, Duroc × White Mangalica and Large White pigs reared under intensive conditions and slaughtered at 150 kg live weight: a comparative study. *Arch. Anim. Breed.* 59(3), 401–415.
103. Uni Z., Platin R., Sklan, D., 1998. Cell proliferation in chicken intestinal epithelium occurs both in the crypt and along the villus. *J. Comp. Physiol.* B.168(4), 241– 247.
104. Vaclavkova E., Volek Z., Belkova J., Duskova D., Czauderna M., Marounek M., 2016. Effect of linseed and the combination of conjugated linoleic acid and linseed on the quality and oxidative stability of pig meat and subcutaneous fat. *Vet. Med.* 61(8), 428–435.
105. van der Aar P.J., Molista F., van der Klisb D., 2017. The central role of intestinal health on the effect of feed additives on feed intake in swine and poultry. *Anim. Feed Sci. Technol.* 233, 64-75.
106. Velotto S., Rabie Ashkezary M., De Camillis S., Todaro A., 2018. Myosin heavy chain isoforms, fatty acid composition, sensory evaluation and quality of Cinta Senese pig meat. *Ital. J. Food Sci.* 30(4), 650-661.
107. Verdenelli M.C., Ghelfi F., Silvi S., Orpianesi C., Cecchini C., Cresci A., 2009. Probiotic properties of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus paracasei* isolated from human faeces. *Eur. J. Nutr.* 48(6), 355–363.
108. Vrecl M., Brankovič J., Fazarinc G., 2020. Effect of pig domestication on skeletal muscle development, microstructure, and genetic mechanism involved in myofibre type formation. *IntechOpen.*
109. Walczak Z., 1959. Laboratory method for determining the content of jelly in canned meat. *Rocz. Nauk Rol.* 74, 619–626.
110. Wojtysiak D., 2012. Pathological changes in the microstructure of *longissimus lumborum* muscle from five breeds of pigs. *Folia Biol.* 60(1-2), 55–60.
111. Yang H., Xiong X., Yin Y., 2013. Development and renewal of intestinal villi in pigs. [W:] *Nutritional and Physiological Functions of Amino Acids in Pigs*, Blachier F., Wu G., Yin Y. (red.), Springer, Vienna.
112. Yang S.H., Ho K.I., 2020. Effect of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) and garlic (*Allium sativum*) product mixture on growth performance, nutrient digestibility, faecal microflora, faecal noxious-gas emission and meat quality in finishing pigs. *Anim. Prod. Sci.* 60(16), 1911-1917.
113. Ye J., Coulouris G., Zaretskaya I., Cutcutache I., Rozen S., Madden T., 2012. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinform.* 13(134), 1-11.
114. Zaworska-Zakrzewska A., Kasprowicz-Potocka M., Wiśniewska Z., Rutkowski A., Hejdysz M., Kaczmarek S., Nowak P., Zmudzińska A., Banaszak M., 2020. The chemical composition of domestic soybean seeds and the effects of partial substitution of soybean meal by raw soybean

- seeds in the diet on pigs' growth performance and pork quality (*m. longissimus lumborum*)*. *Ann. Anim. Sci.* 20(2), 521–533.
115. Zhang W.G., Xiao S., Ahn D.U., 2013. Protein oxidation: Basic principles and implications for meat quality. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 53(11), 1191-1201.
 116. Zhang C., Luo J., Yu B., Zheng P., Huang Z., Mao X., He J., Yu J., Chen J., Chen D., 2015. Dietary resveratrol supplementation improves meat quality of finishing pigs through changing muscle fiber characteristics and antioxidative status. *Meat Sci.* 102, 15–21.
 117. Zhou X., Jin E., Li S., Wang C., Qiao E., Wu G., 2015. Effects of dietary supplementation of probiotics (*Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, and *Bacillus natto*) on broiler muscle development and meat quality. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 39(2), 203–210.
 118. Zhou Y., Ruan Z., Li X.L., Mi S.M., Jiang M., Liu W.H., Yang H.S., Wu X., Jiang G.L., Yin Y.L., 2016. *Eucommia ulmoides* Oliver leaf polyphenol supplementation improves meat quality and regulates myofiber type in finishing pigs. *J. Anim. Sci.* 94(3), 164–168.
 119. Ziegen J., 1979. Kombinationen enzymhistochemischer Methoden zur Fasertypen differenzierung und Beurteilung der Skelettmuskulatur. *Acta Histochem.* 65(1), 34–40.

4. STRESZCZENIE

Wpływ pożytecznych mikroorganizmów EM na wyniki produkcyjne, śluzówkę jelita czczego oraz jakość mięsa świń

mgr inż. Patrycja Reszka

Słowa kluczowe: świnie, efektywne mikroorganizmy, jelito czcze, mikrostruktura mięśnia, jakość mięsa

Celem pracy było określenie wpływu EM na wyniki tuczu, morfologię i ekspresję genów w błonie śluzowej jelita czczego (**P-1**) oraz jakość mięsa, mikrostrukturę mięśnia *LL* i elektroforetyczny rozdział białek w mięśniu *LL* (**P-2**) u świń żywionych różnymi dietami. Doświadczeniem objęto 150 warchlaków o początkowej masie ciała około 30 kg. Zwierzęta podzielono na trzy grupy żywieniowe: C, E1 i E2. W grupie C zastosowano żywienie standardowe - w I i II fazie tuczu 100% poekstrakcyjnej śruty sojowej, w grupie E1 i E2 - w I fazie tuczu żywienie z udziałem 50% soi i 50% grochu i łubinu, w grupie E1 w II fazie tuczu 25% soi i 75% grochu i łubinu, w grupie E2 w II fazie tuczu 100% grochu i łubinu. Do diety świń pochodzących z grup C+EM, E1+EM i E2+EM dodano preparat EM Bokashi w ilości 5 kg/tonę paszy w I fazie tuczu i 3kg/tonę paszy w II fazie tuczu. Badania wykazały istotną statystycznie wyższą końcową masę ciała w grupie C+EM. We wszystkich grupach doświadczalnych wykazano korzystny wpływ EM Bokashi na wzrost wysokości kosmków jelitowych. Najszersze kosmki i największą ich powierzchnię odnotowano grupie E2+EM. We wszystkich grupach doświadczalnych stwierdzono wyższy stosunek wysokości kosmków/głębokości krypt, w porównaniu do grup kontrolnych. Grubość błony śluzowej i liczba komórek kubkowych była największa w grupie E2+EM. Wykazano wzrost ekspresji genu *IL10* w grupie E1+EM oraz genów *FABP4*, *IL10*, *GLUT2* i *CLDN1* w grupie E2+EM (**P-1**). Mniejszą zdolność utrzymania wody stwierdzono w grupie C+EM. Korzystny wpływ suplementacji EM stwierdzono w grupie E2 + EM, gdzie wyciek termiczny był mniejszy. Mięso pochodzące od tuczników z grupy E1+EM było twardsze, w porównaniu do grupy E1. Wykazano istotny wpływ żywienia na kruchość i powierzchnię oka polędwicy. Suplementacja EM Bokashi wpłynęła na wzrost średnicy włókien FTO w grupach E1+EM i E2+EM, oraz włókien FTG w grupie E1+EM. W grupie E1+EM stwierdzono korzystny wpływ EM na mniejszy udział rozszczepienia włókien. W grupie C+EM wykazano mniejszy udział białek o masie 205 kDa. Natomiast, w grupie E1+EM po suplementacji EM wykazano korzystny, większy udział białek o masie 36 kDa (**P-2**). Podsumowując, dodatek EM do diety świń zwiększył ich końcową masę ciała oraz wpłynął

korzystnie na cechy histomorfologiczne jelita czczego świń, zwiększając potencjał trawienny jelita i szczelność nabłonka **(P-1)**. Po suplementacji diety EM wykazano korzystny wzrost ekspresji genów związanych z odpowiedzią immunologiczną, metabolizmem kwasów tłuszczowych i glukozy, oraz szczelnością nabłonka jelitowego **(P-1)**. Nie odnotowano wyraźnego wpływu EM na cechy jakości mięsa świń oraz mikrostrukturę mięśnia *LL* **(P-2)**. Mniejszy udział białka o masie 205 kDa oraz większy białka o masie 36 kDa świadczy o, odpowiednio, spowolnionym lub bardziej intensywnym procesie kruszenia mięsa **(P-2)**. Uzyskane wyniki badań w wariantach żywieniowych I i II wskazują, że stosowanie grochu i łubinu, jako zamienników soi, może być z powodzeniem stosowane w żywieniu świń **(P-1, P-2)**.

5. ABSTRACT

The influence of effective microorganisms EM on the production traits, jejunum mucosa and meat quality of pigs

Patrycja Reszka, MSc

Key words: pigs, effective microorganisms, jejunum, muscle microstructure, meat quality

The aim of the study was to determine the effect of EM on fattening results, morphology and gene expression in the jejunum mucosa (**P-1**) and meat quality, microstructure of the *LL* muscle and electrophoretic protein separation in the muscle (**P-2**) in pigs fed different diets. 150 piglets with an initial body weight of about 30 kg were included in the experiment. The animals were divided into three feeding groups: C, E1 and E2. In group C, standard nutrition was used - in the I and II phase of fattening 100% post-extraction soybean meal, in groups E1 and E2 in the I phase of fattening - 50% of soybean and 50% of peas and lupin, in group E1 in the II phase of fattening 25% of soybeans and 75% of peas and lupins, in group E2 in the II phase of fattening 100% of peas and lupins. The EM Bokashi preparation was added to the diet of pigs from the C+EM, E1+EM and E2+EM groups in the amount of 5 kg/ton of feed in I phase of fattening, and 3 kg/ton of feed in II phase of fattening. The studies showed a statistically significant higher final body weight in C+EM group. In all experimental groups, the positive effect of EM Bokashi on the increase in the height of the intestinal villi was demonstrated. The widest villi and their largest area were recorded in E2+EM group. In all experimental groups, a higher ratio of villi height/crypt depth was found as compared to the control groups. The thickness of the mucosa and the number of goblet cells was the highest in E2+EM group. The expression of the *IL10* gene increased in E1+EM group and *FABP4*, *IL10*, *GLUT2*, *CLDN1* genes in E2+EM group (**P-1**). A lower water holding capacity was found in C+EM group. The positive effect of EM supplementation was found in E2+EM group, where thermal leakage was smaller. The meat of the fatteners from E1+EM group was tougher compared to E1 group. A significant influence of nutrition on the tenderness and the surface of the eye of the loin has been shown. Supplementation with EM Bokashi increased the diameter of FTO fibers in E1+EM and E2+EM groups, and FTG fibers in E1+EM group. In E1+EM group, a positive effect of EM was found on the reduction in the share of fiber splitting. In C+EM group, a smaller share of 205 kDa proteins was demonstrated. On the other hand, in E1+EM group, after EM supplementation, a favorable, higher proportion of proteins with a mass of 36 kDa

was shown (P-2). In conclusion, the addition of EM to pigs diet increased their final body weight and had a positive effect on the histomorphological features of the porcine jejunum, increasing the digestive potential of the intestine and the tightness of the epithelium (P-1). After dietary supplementation with EM, a favorable increase in the expression of genes related to the immune response, fatty acid and glucose metabolism, and intestinal epithelial tightness was demonstrated (P-1). There was no clear effect of EM on the quality characteristics of pig meat and the microstructure of the *LL* muscle (P-2). The lower proportion of the 205 kDa protein and the larger 36 kDa protein indicate, a slower or more intense meat crushing process, respectively (P-2). The research results obtained in the feeding variants I and II indicate that the use of peas and lupin as soy substitutes can be successfully used in feeding pigs (P-1, P-2).

6. ZAŁĄCZNIKI

6.1. KOPIE ARTYKUŁÓW NAUKOWYCH STANOWIĄCYCH CYKL PUBLIKACJI ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Influence of the effective microorganisms (EM) on performance, intestinal morphology and gene expression in the jejunal mucosa of pigs fed different diets

Patrycja Reszka¹  | Aleksandra Dunislawska²  | Anna Slawinska²  | Maria Siwek²  |
Wojciech Kapelański³ | Joanna Bogucka¹ 

¹Department of Animal Physiology, Physiotherapy and Nutrition, UTP University of Science and Technology in Bydgoszcz, Bydgoszcz, Poland

²Department of Animal Biotechnology and Genetics, UTP University of Science and Technology in Bydgoszcz, Bydgoszcz, Poland

³Department of Animal Breeding, UTP University of Science and Technology in Bydgoszcz, Bydgoszcz, Poland

Correspondence

Joanna Bogucka, UTP University of Science and Technology in Bydgoszcz, Mazowiecka 28 Street, 85-084 Bydgoszcz, Poland.
Email: bogucka@utp.edu.pl

Abstract

The aim of the study was to determine the influence of the effective microorganisms (EM) on performance parameters, intestinal morphology and gene expression in the jejunal mucosa in pigs under different feeding regimes. The study group comprised of 150 piglets divided into three feeding groups: C, E1 and E2. Feeding groups included: C—standard fodder, blend with a full share of post-extracted soy meal, E1—in the phase I of fattening: pea and lupin/soybean 50/50%; in the phase II of fattening: pea and lupin/soybean 75/25%, and E2—in the phase I of fattening: pea and lupin/soybean 50/50%; in the phase II of fattening: pea and lupin 100%. The experimental factor was addition of a probiotic EM Carbon Bokashi to the diets (C + EM, E1 + EM and E2 + EM). After slaughter, histological evaluation and gene expression analysis were performed. The highest intestinal villi were reported in E2 + EM. A higher intestinal absorption area was demonstrated in groups C + EM and E2 + EM. An interaction between feeding and EM Bokashi supplementation was found in villus surface area crypt depth, villus height/crypt depth and number of goblet cells. Mucosa thickness and number of goblet cells was the largest in E2 + EM. Gene expression of FABP4 increased in E1, and GLUT2 decreased in E2. Gene expression of IL10 and FABP4 increased in E2 + EM. The results indicate that the E2 diet is more optimal for EM Bokashi supplementation, because in this group, EM positively influenced the morphological characteristics of the porcine jejunum and caused an increase in the expression of genes related to the metabolism and functioning of the gastrointestinal tract.

KEYWORDS

gene expression, histology, intestinal health, pigs, probiotics

1 | INTRODUCTION

The gastrointestinal tract (GIT) serves as an interphase between the external and internal environments. The main functions of the GIT include the digestion and absorption of nutrients (small intestine), as well as the fermentation of undigested materials. In addition, the

intestinal epithelium is also the first line of defence and protection of the GIT (and the host organism) from external pathogens. Its functionality complements the activity of the mucosal immune system, whose development and functioning are induced by intestinal microflora (Arnal & Lallès, 2016). In pigs, the greatest concentration of the microorganisms colonizing the GIT is found in the large intestine. The

accumulation of microorganisms in this section of the GIT is associated with a large amount of undigested nutrients and endogenous elements (e.g., mucus and enzymes) that are susceptible to microbial fermentation. Intestinal epithelial cells are the first cells that come into contact with both nutrients and gastrointestinal microflora.

Probiotics were defined by Collins and Gibson (1999) as living microbiological food additives that have a beneficial impact on the host by improving its intestinal balance in animal nutrition, probiotics are considered growth promoters that are capable of colonizing of the host (Breves, Walter, Burmeister, & Schröder, 2001; Schrezenmeir & de Vrese, 2001). In pigs, the beneficial effects of probiotics have been demonstrated on growth efficiency (Giang, Viet, Ogle, & Lindberg, 2011; Guerra, Bernardez, Mendez, Cachaldora, & Pastrana Castro, 2007) and intestinal health and microflora (Mallo, Rioperez, & Honrubia, 2010; Mishra, Verma, Agarwal, Mondal, & Singh, 2014). Delia, Tafaj, and Männer (2012) showed the effect of probiotics on increased resistance to diseases, better feed conversion and nutrient absorption, and finally a beneficial impact on the quality of carcasses. Morphometric and functional changes in the intestinal mucosa are caused by dietary factors (diet components, fibre content, nutrition system and method) (Babinska, Rotkiewicz, & Otrocka-Domagala, 2005; Rekiel, Bielecki, & Wiecek, 2010; Rekiel & Gajewska, 2006). Different bacterial populations present in the GIT are also able to modify the immune system (Lata et al., 2006). Probiotics may lead to increased type A immunoglobulins (IgA) production and macrophage stimulation (Perdigón, Vintiñi, Alvarez, Medina, & Medici, 1999). Administration of probiotics which modulate the humoral and cellular immune response has been reported to prevent intestinal diseases (Erickson & Hubbard, 2000).

Laskowska, Jarosz, and Grądzki (2018) studied the effect of Bokashi on the concentration of pro- and anti-inflammatory cytokines in the sera of sows during pregnancy, in colostrum and milk. Rybarczyk, Romanowski, Karamucki, and Ligocki (2016) determined the impact of EM on the slaughter, technological and sensory quality, as well as on the cholesterol level in the longissimus lumborum (LL) muscle in pigs.

In this study, we use EM Bokashi in combination with different feeding regimes in pigs. The experimental diets have been based on different levels of legume seeds that partially replaced post-extracted soy meal. The aim of the study was to determine how, depending on nutrition, beneficial EM microorganisms affect production parameters, morphological characteristics of the jejunum and gene expression in the jejunal mucosa.

2 | MATERIAL AND METHODS

2.1 | Animals and diets

The research was carried out at the Pig Slaughtering Utility Control Station [Stacja Kontroli Użytkowości Rzeźnej Trzody Chlewnej], Department of Experimental Zootechnics in Mełno, Poland. The

study group comprised 150 piglets (♀ 1:1 ♂), with an initial body weight of approximately 30 kg. The animals were four-way crosses, originating from crossing ♀ F1 (pbz × wbp) with ♂ F1 (pietrain × duroc). The animals came from one of the pig farms in Kuyavian-Pomeranian Voivodeship, where porkers are produced in a closed cycle. Table 1. presents the experimental design. The porkers were divided into three main groups (C, E1 and E2), depending on their nutrition. Two-phase fattening was used with a complete mix of 13.35 MJ energy, 170 g of total protein and 10.6 g of lysine (1st phase) and 13.11 MJ of energy, 159 g of total protein and 9.7 g of lysine (second phase). The composition of the complete mixture and the value of fed feeds are presented in Table 2. C was fed standard fodder, based on post-extracted soy meal (100%). E1 was fed pea and lupin/soybean (50/50%)

TABLE 1 Experimental design

Control group (C)		Experimental group (E1)		Experimental group (E2)	
C	C + EM	E1	E1 + EM	E2	E + EM
n = 25	n = 25	n = 25	n = 25	n = 25	n = 25

Note: Control groups, fed without probiotic, (C—standard fodder, blend with a full share of post-extracted soy meal, E1—in the first phase of fattening: pea and lupin/soybean 50/50%; in the second phase of fattening: pea and lupin/soybean 75/25% and E2—in the first phase of fattening: pea and lupin/soybean 50/50%; in the second phase of fattening: pea and lupin 100%) and experimental groups with the addition of a probiotic to diets (C + EM, E1 + EM and E2 + EM).

TABLE 2 Dietary value and composition of the fodder

Dietary value	Fattening phase I (30–70 kg)	Fattening phase II (70–115 kg)
Dry matter, g	877	875
Metabolic energy, MJ	13.39	13.11
Total protein, g	170	159
Fat, g	27	20
Lysine, g	10.6	9.7
Calcium, g	5.9	5.8
Phosphorus, g	5.3	5.2
Sodium, g	1.7	1.7
Vitamin A, IU	10,000	10,000
Vitamin D, IU	2,200	2,200
Vitamin E, IU	80	80
Composition of the fodder	%	
Soy meal 46% BO	16.00	12.00
Wheat 12%	20.00	20.00
Barley 12%	35.00	45.00
Triticale 10%	25.30	20.00
Soybean oil	1.00	0.30
PORKOVITAL T PEA 2.5%	2.50	2.50
SELACID GG DRY 25 BR	0.20	0.20
Total	100.00	100.00

in the first phase of fattening and pea and lupin/soybean (75/25%) in the second phase of fattening. E2 was fed pea and lupin/soybean 50/50% in the first phase of fattening, and pea and lupin 100% in the second phase of fattening.

The animals were housed in identical rooms, divided into control groups, fed without probiotic (C, E1 and E2) and experimental groups supplemented with the dietary probiotic (C + EM, E1 + EM and E2 + EM). The probiotic was EM Carbon Bokashi (Table 3), and it was supplemented in the amount of 5 kg of the EM per 1 ton of feed (in the first phase of fattening) and 3 kg of EM per 1 ton of feed (in the second phase of fattening). Additional 3-time fogging of the environment with a 20-percent solution of EM was applied in the experimental building during each week.

Each animal was labelled and placed in an individual pen (2 m²), equipped with automatic feeder and nipple drinker, allowing for constant access to water. Dedicated individual bedding spaces allowed to control body mass changes and fodder intake individually. Each porker was subjected to individual control weighing three times during fattening: at the beginning of fattening, at the beginning of the second fattening phase and at the end of fattening (before slaughter). The animals, with a body weight of approximately 115 kg, were slaughtered in meat plants according to routine procedure. Intestinal and tissue samples for histological and molecular analyses were collected directly post-slaughter. During the experiment, the following performance traits were collected: initial body weight (BW), BW at slaughter, duration of fattening, average daily gain (ADG), total weight gain and feed conversion ratio (FCR).

2.2 | Histological examination

Intestinal histology was performed on jejunal tissue (about 3 cm), which was first fixed in 4% formalin neutralized with CaCO₃ and then dehydrated, x-rayed and paraffinized in a tissue processor

TABLE 3 The composition of EM Carbon Bokashi (Laskowska et al., 2018)

	Microbial composition	Content per gram of product (CFU/g)
1.	<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	5×10^4
2.	<i>Lactobacillus casei</i>	5×10^8
3.	<i>Lactobacillus plantarum</i>	5×10^8
4.	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.5×10^6
5.	<i>Enterococcus faecium</i>	5×10^9
6.	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	5×10^8
7.	<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>	5×10^8
8.	<i>Bacillus licheniformis</i>	4×10^9
9.	<i>Bacillus cereus var. toyoi</i>	4×10^9
10.	<i>Bacillus subtilis</i>	4×10^{11}
11.	<i>Clostridium butyricum</i>	1×10^8

(Thermo Shandon). Processed tissue was embedded in paraffin blocks using the transfer station (Medite). The blocks were sliced on a rotational microtome (Thermo Shandon) into 10- μ m-thick sections, which were adhered to the microscope slides with egg white and glycerine. Before staining, the preparations were dewaxed and hydrated. Then, they were stained with Periodic Acid-Shiff (PAS) stain (Dubowitz, Brooke, & Neville, 1973). The measurements of height and width of the intestinal villi, the thickness of the mucosa and the depth of the intestinal crypts were taken using the Delta Optical Evolution 300 microscope equipped with the TouPCam™ camera and the MultiScan18.03 computer microscopy image analysis program (Computer Scanning Systems II). Ten villi were randomly selected from the cross-section for the measurements. The length was measured at the site of the intestinal crypt outlet from the top of the villus to its base. The width of the villus was measured at half its height. The area of the villi was calculated according to the formula by Rubio, Ruiz, Peinado, and Echavari (2010): $3.1416 \times vw \times vh$, where vw—villus width and wk—villus height. Mucosal thickness was determined as the distance between the mucosal epithelium and the muscular layer. The depth of intestinal crypts was measured between 10 villi (Uni, Platin, & Sklan, 1998). The number of neutral, PAS-positive villi was calculated on the surface of 10 randomly selected intestinal villi and expressed as the mean number of goblet cells for 1 intestinal villus.

2.3 | Gene expression analysis

Tissues (liver and intestinal mucosa) were collected ($n = 5$) and stabilized in *fix*RNA solution (EURx). Prior to RNA extraction, the tissues were homogenized with the TissueRuptor homogenizer (Qiagen GmbH) in TRIzol® LS Reagent (Thermo Fisher Scientific). RNA clean-up from the lysate was performed with a commercial kit with columns (Universal RNA Purification Kit, EURx). Quality and quantity of isolated RNA was checked by 2% agarose gel electrophoresis and measured by NanoDrop 2000 (Scientific Nanodrop Products).

cDNA was synthesized by using Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (Thermo Scientific) based on the manufacturer's instruction. After RT reaction, cDNA was diluted to 70 ng/ μ l. RT-qPCR reactions were conducted at the total volume of 10 μ l. Reaction mixture contained Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Scientific), 1 μ M of forward primer, 1 μ M of reverse primer and 2 μ l of diluted cDNA (140 ng). Gene expression analysis was performed for the selected panel of genes. Sequences of the primers (Table 4) were derived from the literature or designed with NCBI Primer Blast (Suzuki et al., 2017). The reactions were carried out in LightCycler II 480 (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) applying the following thermal programme: 15 min pre-incubation (95°C), amplification in 40 cycles: 10 s denaturation (95°C), 15 s annealing of the primers (58°C) and 30 s primers extension (72°C). Each reaction was conducted in two individual technical replicates. The relative quantification

analysis of RT-qPCR data was performed by calculating fold induction of the genes using ddCt method (Livak & Schmittgen, 2001) and geometric average of Ct values (cycle threshold) of reference genes (*ACTB* and *RPL4*). Differences in Ct values between target and reference genes (Delta Ct) were calculated for each sample. Control samples without EM supplementation (C) were used as calibrators. Normalized gene expression level was calculated using the formula $R = 2^{-\text{ddCt}}$.

2.4 | Statistical analyses

The results of the fattening performance and histology were analysed with two-way ANOVA, using nutritional group and EM supplementation as factors (STATISTICA 10.0 PI). The arithmetic mean and standard error of the mean (SEM) were calculated. Significant differences between the groups were determined by Tukey's test. The interaction between feeding and supplementation with the probiotic group was calculated. The gene expression data were analysed by Student's *t* test ($p < .05$) comparing the Ct value of each experimental group (i.e., C + EM, E1 + EM and E2 + EM) with respective controls (i.e., C, E1 and E2).

3 | RESULTS

3.1 | Fattening performance

Results of fattening performance are shown in Table 5. The animals reached the slaughter weight (111.1–113.6 kg) from day 85 (group C) to 88 (group E2 and E2 + EM) of fattening. Statistically higher body weight ($p \leq .05$) was reported in the control group fed with the addition of probiotics (C + EM) compared to the group fed without the addition of EM (C). ADG ranged from 0.92 kg in E2 group to 0.96 kg in E2 + EM group. The study demonstrated no significant impact of the experimental factor (EM probiotics) on the ADG ($p > .05$). Weight gain ranged from 78.95 kg in C group to 84.15 kg in E2 + EM group. No effects of EM on total weight gain were determined ($p > .05$). No effects of EM were found in FCR either ($p > .05$).

3.2 | Porcine jejunal morphology

The results of morphological evaluation of the jejunum obtained from the studied animals are presented in Table 6. The beneficial effect of the EM Bokashi preparation on the intestinal villi height

TABLE 4 Primer sequences for gene expression analysis

Gene symbol	Primer sequence	NCBI accession number	Product size (bp)	Reference
Reference genes				
<i>ACTB</i>	F: CACGCCATCCTGCGTCTGGA R: AGCACCGTGTGGCGTAGAG	414396	380	Nygaard, Jørgensen, Cirera, and Fredholm, (2007)
<i>RPL4</i>	F: CAAGAGTAACTACAACCTTC R: GAACTCTACGATGAATCTTC	100038029	122	Nygaard et al. (2007)
Target genes				
<i>CLDN1</i>	F: CCAGTGAAGAGAGCCTGACC R: TGATGAGGTGCAGAAGATGC	100625166	174	Nossol et al. (2015)
<i>FFAR2</i>	F: CGCTACCTGGGAGTGGCTT R: CGGCCTTCTGGGTTGAGTT	100126285	151	Li, Yao, and Jiang (2014)
<i>FABP4</i>	F: TGGAAACTTGTCTCCAGTG R: GGTACTTTCTGATCTAATGGTG	399533	147	Li et al. (2014)
<i>GLUT1</i>	F: TTCTCTGCTGCCACTAGGAT R: GTGGAGGTCGGGTTCTTAG	102164419	123	This study
<i>GLUT2</i>	F: CGGAACACCCAAAACGTGTC R: TCAAGTTTCGTCTTGCTCC	397429	286	This study ^a
<i>GLUT5</i>	F: CGAAGGGGAACATGGACACA R: TGCTTCGCCCTTCAGTTCAT	100625876	124	This study ^a
<i>IL1B</i>	F: CCAAAGAGGGACATGGAGAA R: GGGCTTTTGTCTGCTTGAG	396565	123	Brogaard et al. (2015)
<i>IL10</i>	F: CTGAGCTGGGCATGGTAGAG R: GGGGACAACAGTAGGTGAA	397106	108	This study ^a
<i>MUC6</i>	F: CTGTCGTGGTCTCCAGTGGT R: CTGACACTGCGGTCTCAACA	100626121	111	This study ^a
<i>TJAP1</i>	F: GGGGCTCTGAACCATGTCTG R: GGTCTAAAAAGGCTGGAGGG	100736996	161	This study ^a

^aStarters were designed based on the genome version Sscrofa 10.2.

was confirmed in all experimental groups ($p < .001$). The highest villi were reported in E2 + EM. The beneficial effect of the EM formulation on the villi width was also found in C + EM and E2 + EM. The widest villi were found in the jejunum of E2 + EM pigs. Intestinal absorption surface was significantly higher ($p \leq .01$) in C + EM and E2 + EM groups in comparison with their respective controls (i.e., C and E2). The largest absorption surface was determined in E2 + EM group. A highly significant interaction between feeding and EM supplementation was found in height, width and surface area of the intestinal villi ($p \leq .001$). The depth of intestinal crypts was similar in groups C and E2. Statistically significant differences ($p \leq .01$) were found only E1 versus E1 + EM, with deeper crypts found in E1. The beneficial effect of the EM Bokashi preparation was demonstrated on the ratio of the villus height to the depth of the crypts (VH/CD) ($p \leq .05$). An increase in the VH/CD ratio, which is an indicator of the digestive potential of the intestine, indicates the maturity of the intestinal mucosa. The thickness of the mucosa was the largest in E2 + EM and significantly different than in E2 ($p \leq .05$). The highest number of goblet cells was also observed in group E2 + EM. What is more, a significant interaction between feeding and addition of EM for a number of traits was found (Table 6), for example mucosal thickness ($p \leq .001$) and the number of goblet cells ($p \leq .01$).

3.3 | The analysis of gene expression

The results of gene expression analysis are presented in Figure 1. Among the ten tested genes, statistically significant changes in the level of gene expression associated with diet and the addition of probiotics were demonstrated for *FABP4*, *IL10*, *GLUT2* and *CLDN1*. The animals fed without the addition of probiotics showed an increase in the expression of the *FABP4* gene (group E1) (Figure 1a) and a decrease in the expression of the *GLUT2* gene (group E2) (Figure 1b).

On the other hand, the experiment in which animals received a probiotic additive revealed an increase in the expression of two genes, *FABP4* and *IL10* (group E2) (Figure 1b).

4 | DISCUSSION

4.1 | The fattening performance

In this study, a positive effect of the EM supplementation on the BW concerned only the C group, which was fed a standard diet, based on a blend with a full share of post-extraction soy meal (GMO). Chen et al. (2005) indicated that a diet enriched with a probiotic preparation (*Lactobacillus acidophilus*, 1.0×10^7 CFU (colony-forming unit)/g; *Saccharomyces cerevisiae*, 4.3×10^6 CFU/g; and *Bacillus subtilis* $2.0 \times 3 \times 10^6$ CFU/g) had a beneficial effect on the BW and growth rate. Similarly, the studies conducted by Balasubramanian, Sang, and Kim (2018) showed that the introduction of a probiotic (*Bacillus coagulans*, 1×10^9 CFU/g; *B. licheniformis*, 5×10^8 CFU/g; *B. subtilis*, 1×10^9 CFU/g; and *Clostridium butyricum* 1×10^8 CFU/g) into the animal diet significantly ($p < .05$) increased BW and ADG. Mahan, Cromwell, Ewan, Hamilton, and Yen (1998) and Quiniou, Dagorn, and Gaudre (2002) also reported that animals from a group fed with a probiotic additive had significantly higher ($p < .01$) growth rates, with lower FCR. The impact of probiotic preparations can be different, because it depends on the type of bacteria used, the level and time of supplementation, diet composition and interaction with other dietary supplements (Meng et al., 2010).

4.2 | Porcine jejunal morphology

The results indicate that the E2 diet is more optimal for the use of the EM Bokashi preparation. In this group, the EM additive positively

TABLE 5 Fattening results

Trait	C		E1		E2		SEM	p-value		
	C	C + EM	E1	E1 + EM	E2	E2 + EM		G	EM	G × EM
BW initial, kg	32.15	33.15	30.55	32.30	32.00	29.45	0.40	ns	ns	ns
BW at slaughter, kg	111.10 ^b	113.55 ^a	112.40	112.95	112.35	113.60	0.35	ns	.05	ns
Duration of fattening, days	85	87	87	86	88	88	0.91	ns	ns	ns
ADG during fattening, kg	0.93	0.93	0.95	0.95	0.92	0.96	0.01	ns	ns	ns
Total weight gain during fattening, kg	78.95	80.40	81.85	80.65	80.35	84.15	0.56	ns	ns	ns
FCR	3.08	3.04	3.00	3.14	3.13	2.96	0.03	ns	ns	ns

Note: G—nutritional group, EM—effective microorganisms (probiotic) supplementation, C—control group—standard nutrition, a blend with a full share (100%) of post-extracted soy meal (GMO); E1—experimental group 1—in the first phase of fattening: pea and lupin/soybean 50%/50%, in the second phase of fattening: pea and lupin/soybean 75%/25%; E2—experimental group 2—in the first phase of fattening: pea and lupin/soybean 50%/50%, in the second phase of fattening: pea and lupin 100%; BW—body weight, ADG—average daily gain, FCR—feed conversion ratio (kg of feed per kg of body weight gain); a, b—statistically significant differences for $p \leq .05$; A, B—statistically significant differences for $p \leq .01$.

TABLE 6 Porcine jejunal morphology

Trait	C		E1		E2		p-value			
	C	C + EM	E1	E1 + EM	E2	E2 + EM	SEM	G	EM	G × EM
Villus height, μm	308.29 ^b	347.01 ^a	324.97 ^b	362.41 ^A	268.95 ^B	389.87 ^A	4.60	ns	<.001	<.001
Villus width, μm	88.62 ^B	102.23 ^A	100.86	94.64	84.74 ^B	114.20 ^A	1.15	ns	<.001	<.001
Villus surface area, μm^2	88,956.52 ^B	121,990.90 ^A	107,115.05	110,987.02	73,356.15 ^B	143,889.13 ^A	2,608.55	ns	<.001	<.001
Crypt depth, μm	201.23	197.72	224.45 ^A	195.19 ^B	211.67	207.44	2.27	ns	ns	ns
Villus height/crypt depth	1.61 ^b	1.85 ^a	1.51 ^B	1.99 ^A	1.38 ^B	1.97 ^A	0.03	ns	<.001	ns
Mucosal thickness, μm	509.62	544.72	549.41	557.60	480.61 ^B	597.31 ^A	5.20	ns	<.001	<.001
No. of goblet cells/villus	17.65	17.95	18.31	18.37	17.46 ^B	19.64 ^A	0.17	ns	ns	ns

Note: G—nutritional group, EM—effective microorganisms (probiotic) supplementation, C—control group—standard nutrition, a blend with a full share (100%) of post-extracted soy meal (GMO); E1—experimental group 1—in the first phase of fattening: pea and lupin/soybean 50%/50%, in the second phase of fattening: pea and lupin/soybean 75%/25%; E2—experimental group 2—in the first phase of fattening: pea and lupin/soybean 50%/50%, in the second phase of fattening: pea and lupin 100%; a, b—statistically significant differences for $p \leq .05$; A, B—statistically significant differences for $p \leq .01$.

influenced the morphological characteristics of the porcine intestine. Histological examinations determine the effect of various diets (for example, dairy diet, diet with a varied share of broad beans) and their forms (limited or ad libitum) on the morphometric characteristics of the intestine (Mroz, 2001).

In this study, EM Bokashi increased the height and width of the intestinal villi. A significant interaction between feeding and addition of EM for a villus height and villus width was also demonstrated. Intestinal villi are finger-shaped bulges of the mucous membrane ($0.2 \times 1 \text{ mm}$) which undergo modifications depending on the place of their location in the intestine. Because their task is to increase the intestinal absorption area, the capillary network is very dense on the tip of the villus. The structures are covered with the intestinal epithelium, under which there is a continuous layer of myofibroblasts participating in the regulation of epithelial renewal and defence processes (Ackermann, Nowicki, & Sarnecka-Keller, 1974). Likewise, Mroz (2001) and Schwarz et al. (2010) showed that some factors in an animal diet (including probiotics, prebiotics and organic acids) increase the height of the intestinal villi. Moreover, the beneficial effect EM Bokashi on villus surface area was noted as well as a significant interaction between feeding and addition of EM for a villus surface area and mucosal thickness.

In this paper, EM Bokashi did not increase the intestinal crypt depth, but Mroz (2001) proved that the depth of crypts increased after the use of a probiotic. Crypts are responsible for the proliferation of epithelial cells, the production of defensins—anti-bacterial immune factors and endocrine substances, such as chomogranin; defence reactions are stimulated in the crypts, promoting the production of antibodies and phagocytosis (Manning & Gibson, 2004). Baum, Liebler-Tenorio, Enss, Pohlenz, and Breves (2002) demonstrated that *Saccharomyces boulardii* and *Bacillus cereus* had a beneficial effect on the epithelial structure and cryptic morphology.

This study confirmed the beneficial influence of EM Bokashi on ratio of VH/CD ratio. The VH/CD ratio is used to assess the degree of nutrient digestion and absorption capacity of the small intestine (Montagne, Pluske, & Hampson, 2003). The VH/CD ratio in the intestine was greater at the age of 9 days in piglets which received the *L. brevis* 1E1 additive and in the duodenum at the age of 22 days, including pigs fed with the addition of *L. brevis* 1E1. Bontempo Giancamillo Savoini Dell'Orto and Domeneghini (2006) observed that the villi height and the crypts depth were greater, and the ratio of villi to crypt was lower in piglets fed with the addition of a probiotic than in animals from the control group. Dowarah, Verma, Agarwal, Patel, and Singh (2016) also showed an increased villus height and crypt depth along with a reduced VH/CD ratio in the group of porkers fed probiotics containing *L. acidophilus* NCDC-15 or the *Pediococcus acidilactici* FT28 strain. Whereas studies by Mishra, Verma, Agarwal, and Singh (2016) showed an increase in villi height and the VH/CD ratio ($p < .01$) in the jejunum in the group of pigs fed on *Saccharomyces cerevisiae* NCDC 49 and *L. acidophilus*.

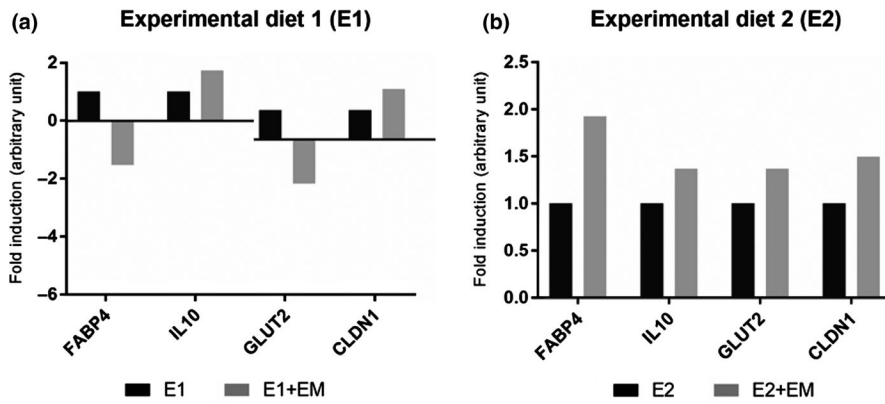


FIGURE 1 Changes in the level of gene expression in (a) E1 and (b) E2 diet groups fed with and without the addition of beneficial EM microorganisms

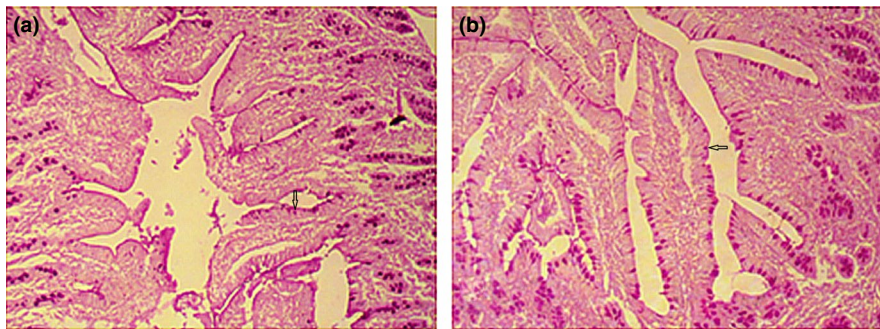


FIGURE 2 Number of goblet cells in jejunal tissue (arrows). (a) microscopic photograph of intestinal villi in the control group C fed without probiotic; (b) microscopic photograph of intestinal villi in the experimental group E2 + EM with the addition of a probiotic to diets. Mag. 100×. PAS reaction [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

Goblet cells are responsible for the secretion of mucus and mucins, providing the body with the first protective barrier. The mucosal epithelial cells also support the activity of this barrier through the production of mucins (Ackermann et al., 1974). The research conducted by Rubio et al. (2010), in which all animals were fed with a full-ration blend, showed that the number of goblet cells in the jejunum was 15.5 goblet cells/100 cells. In our study, the addition of probiotics resulted in an increase in the number of goblet cells in E2 + EM group, which received the probiotic (Figure 2). This confirms the study of Prieto et al. (2014) using *Bacillus pumilus*, who after 22 days of supplementation of weaned piglets showed a higher number of goblet cells/villi ($p < .01$) compared to the control group (13.97 vs. 9.67). However, other authors did not show the effect of *Enterococcus faecium* on increasing the number of goblet cells in the jejunum of fattening pigs (Giannenas et al., 2016).

The research indicates that in pigs the morphological characteristics of the small intestine seem to be rather stable. The study by Rekiel, Bielecki, Więcek, and Kulisiewicz (2010) was aimed at determining the effect of antibiotics (flavomycin) and selected probiotics (*Bacillus toyot*, *Pedococcus acidilactici*) on the morphological properties of the intestinal epithelium in porkers. The histological evaluation of the intestinal mucosa revealed that these additives had diverse effects on the morphological properties and the ability of the cryptic epithelium to proliferate (Rekiel, Bielecki, & Wiecek, 2010; Rekiel, Bielecki, Więcek, et al., 2010). The results of the studies mentioned above are confirmed by the research on *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* conducted by Babinska et al. (2005), which showed that probiotic strains had a beneficial effect on the morphology of the digestive tract, liver and pancreas.

4.3 | Gene expression

The impact of the EM additive on the gastrointestinal mucosa was also analysed at the level of mRNA changes for the following gene panel: genes associated with the immune system (*IL10*, *IL1B*), fatty acid metabolism (*FABP4*, *FFAR2*) and glucose transport (*GLUT1*, *GLUT2*, *GLUT5*); genes encoding proteins related to gap junctions (*CLDN1*, *TJAP1*); and the glycoprotein encoding gene (*MUC6*). The selection of the gene panel was aimed at verifying the influence of probiotics on the metabolism, immune system and gastrointestinal tract structure. The genes for which statistically significant results were received were further discussed.

The addition of the EM Bokashi preparation up-regulate IL10, an anti-inflammatory cytokine, compared to the group not receiving EM. These results suggest that the use of EM is beneficial for the immune response in the gastrointestinal mucosa. The research carried out by Laskowska et al. (2018) focused on the effect of EM Bokashi on the concentrations of pro- and anti-inflammatory cytokines in the serum of pregnant sows, as well as in milk after farrowing. The authors noted an increase in the concentration of IL10 in the experimental group supplemented with EM Bokashi. The in vitro studies on human THP cell line tested the properties of potentially probiotic bacteria. Positive results in the context of an increase in the expression of IL10 were obtained for *L. paracasei* L350, *L. fermentum* L930 *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* IM386 (Čitar et al., 2015).

The *FABP4* gene encodes a fatty acid-binding protein. It is assumed that its function is related to the collection, transport and metabolism of fatty acids. The *GLUT2* gene encodes, among other things, a glycoprotein located in the membrane of the intestines.

The glycoprotein which is encoded by this gene is responsible for bi-directional glucose transport (Stelzer et al., 2011). The *CLDN1* gene encodes a protein associated with the gap junctions between epithelial and endothelial cells. Gap junctions form a physical barrier and regulate the permeability of the gastrointestinal tract wall (Stelzer et al., 2011).

The results obtained for the three genes (*FABP4*, *GLUT2* and *CLDN1*) indicate that the E1 diet is less optimal for the use of the probiotic EM preparation. A reduction of *FABP4*, *GLUT2* and *CLDN1* gene expression was demonstrated in this experimental group (E1). In the experimental E2 diet group, the addition of EM caused an increase in the expression of genes related to the metabolism and functioning of the digestive tract. The research conducted in other species of farm animals (hen) or model animals (mouse) seem to confirm these observations. The addition of probiotics (*Lactobacillus rhamonus* and *Lactococcus lactis*) into the mouse diet increased the expression of the *FABP4* gene (Suzuki et al., 2017). On the other hand, the addition of probiotics to the broiler chicken diet results in the higher expression of *GLUT2*, which is related to the increased glucose uptake (Faseleh Jahromi et al., 2016). The studies examining the effect of mixed probiotics on epithelial cells (in particular: *L. rhamnosus* GG, *L. plantarum* and *L. salivarius*) showed that these bioactive substances increase the expression of gap junction proteins (claudin-1, claudin-3 and JAM-1) (Miyachi et al., 2012; Patel et al., 2012).

5 | CONCLUSION

In conclusion, it can be started that the effectiveness of the in-feed probiotic supplementation in pigs is higher once it is optimized with the nutrition. The results of this research show that the E2 diet is definitely more optimal for the use of the EM Bokashi preparation. The use of this diet and the EM additive positively influenced the morphological characteristics of the porcine jejunum and caused an increase in the expression of the genes related to the metabolism and functioning of the gastrointestinal tract.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors would like to thank Iwona Mielczarek and Aleksandra Kubiak for an excellent technical assistance in the laboratory.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ETHICAL APPROVAL

Ethical review committee approval in Bydgoszcz—decision number 24/2017.

ANIMAL WELFARE STATEMENT

The authors confirm that the ethical policies of the journal, as noted on the journal's author guidelines page, have been adhered to and the appropriate ethical review committee approval has been

received. The authors confirm that they have followed EU standards for the protection of animals used for scientific purposes and feed legislation.

ORCID

Patrycja Reszka  <https://orcid.org/0000-0002-6214-2560>

Aleksandra Dunisławska  <https://orcid.org/0000-0001-6608-0013>

Anna Sławinska  <https://orcid.org/0000-0002-5706-6145>

Maria Siwek  <https://orcid.org/0000-0003-4148-5174>

Joanna Bogucka  <https://orcid.org/0000-0001-5298-1144>

REFERENCES

- Ackermann, J., Nowicki, Z., & Sarnecka-Keller, M. (1974). Układ pokarmowy. *Cytologia i histologia*. (2nd ed.(345–422). Warsaw, PL: Pro-ed.
- Arnal, M. E., & Lallès, J. P. (2016). Gut epithelial inducible heat-shock proteins and their modulation by diet and the microbiota. *Nutrition Reviews*, *74*, 181–197. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuv104>
- Babinska, I., Rotkiewicz, T., & Otrocka-Domagala, I. (2005). The effect of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. administration on the morphology of the gastrointestinal tract, liver and pancreas in piglets. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, *8*, 29–35.
- Balasubramanian, B., Sang, I. L., & Kim, I. H. (2018). Inclusion of dietary multi-species probiotic on growth performance, nutrient digestibility, meat quality traits, faecal microbiota and diarrhoea score in growing–finishing pigs. *Italian Journal of Animal Science*, *17*, 100–106. <https://doi.org/10.1080/1828051X.2017.1340097>
- Baum, B., Liebler-Tenorio, E. M., Enss, M. L., Pohlenz, J. F., & Breves, G. (2002). *Saccharomyces boulardii* and *Bacillus cereus* var. *toyoi* influence the morphology and the mucins of the intestine of pigs. *Zeitschrift fur Gastroenterologie*, *40*, 277–284. <https://doi.org/10.1055/s-2002-30116>
- Bontempo, V., Giancamillo, A. D., Savoini, G., Dell'Orto, V., & Domeneghini, C. (2006). Live yeast dietary supplementation acts upon intestinal morpho-functional aspects and growth in weanling piglets. *Animal Feed Science and Technology*, *129*, 224–236. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.12.015>
- Breves, G., Walter, C., Burmeister, M., & Schröder, B. (2001). In vitro studies on the effects of *Saccharomyces boulardii* and *Bacillus cereus* var. *toyoi* on nutrient transport in pig jejunum. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, *84*, 9–20. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0396.2000.00277.x>
- Brogaard, L., Klitgaard, K., Heegaard, M. H. P., Hansen, M. S., Jensen, T. K., & Skovgaard, K. (2015). Concurrent host-pathogen gene expression in the lungs of pigs challenged with *Actinobacillus pleuropneumonia*. *BMC Genomics*, *16*, 417. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1557-6>
- Chen, Y. J., Son, K. S., Min, B. J., Cho, J. H., Kwon, O. S., & Kim, I. H. (2005). Effects of dietary probiotic on growth performance, nutrients digestibility, blood characteristics and fecal noxious gas content in growing pigs. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, *18*, 1464–1468. <https://doi.org/10.5713/ajas.2005.1464>
- Čitar, M., Hacin, B., Tompa, G., Štempelj, M., Rogelj, I., Dolinšek, J., ... Matijašić, B. B. (2015). Human intestinal mucosa-associated *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains with probiotic properties modulate IL-10, IL-6 and IL-12 gene expression in THP-1 cells. *Beneficial Microbes*, *6*, 325–336. <https://doi.org/10.3920/BM2014.0081>
- Collins, M. D., & Gibson, G. R. (1999). Probiotics, prebiotics and synbiotics: Approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *American Journal of Clinical Nutrition*, *69*, 1052–1057. <https://doi.org/10.1093/ajcn/69.5.1052>

- Delia, E., Tafaj, M., & Männer, K. (2012). Efficiency of probiotic in farm animals. *Probiotic in Animals*. Rijeka, HR: Everlon Cid Rigobelo, IntechOpen.
- Dowarah, R., Verma, A. K., Agarwal, N., Patel, B. H. M., & Singh, P. (2016). Effect of swine based probiotic on performance, diarrhoea scores, intestinal microbiota and gut health of grower-finisher cross-bred pigs. *Livestock Science*, 195, 74–79. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2016.11.006>
- Dubowitz, W., Brooke, M., & Neville, H. E. (1973). *Muscle biopsy: A modern approach*. London, Philadelphia, Toronto: W. B. Saunders Company.
- Erickson, K. L., & Hubbard, N. E. (2000). Probiotic immunomodulation in health and disease. *Journal of Nutrition*, 130, 403–409. <https://doi.org/10.1093/jn/130.2.403S>
- Faseleh Jahromi, M., Wesam Altaher, Y., Shokryazdan, P., Ebrahimi, R., Ebrahimi, M., Idrus, Z., ... Liang, J. B. (2016). Dietary supplementation of a mixture of Lactobacillus strains enhances performance of broiler chickens raised under heat stress conditions. *International Journal of Biometeorology*, 60, 1099–1110. <https://doi.org/10.1007/s00484-015-1103-x>
- Giang, H. H., Viet, T. Q., Ogle, B., & Lindberg, J. E. (2011). Effects of supplementation of probiotics on the performance, nutrient digestibility and faecal microflora in growing- finishing pigs. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 24, 655–661. <https://doi.org/10.5713/ajas.2011.10238>
- Giannenas, I., Doukas, D., Karamoutsios, A., Tzora, A., Bonos, E., Skoufos, I., ... Florou-Paneri, P. (2016). Effects of *Enterococcus faecium*, mannan oligosaccharide, benzoic acid and their mixture on growth performance, intestinal microbiota, intestinal morphology and blood lymphocyte subpopulations of fattening pigs. *Animal Feed Science and Technology*, 220, 159–167. <https://doi.org/10.1016/j.anife.2016.08.003>
- Guerra, N. P., Bernardes, P. F., Mendez, J., Cachaldora, P., & Pastrana Castro, L. (2007). Production of four potentially probiotic lactic acid bacteria and their evaluation as feed additives for weaned piglets. *Animal Feed Science and Technology*, 134, 89–107. <https://doi.org/10.1100/2012/562635>
- Laskowska, E., Jarosz, Ł., & Grądzki, Z. (2018). Effect of multi-microbial probiotic formulation Bokashi on pro- and anti-inflammatory cytokines profile in the serum, colostrum and milk of sows, and in a culture of polymorphonuclear cells isolated from colostrum. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 11, 220–232. <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9380-9>
- Lata, I., Juránková, J., Doubek, J., Příbramská, V., Frič, P., Ditě, P., ... Kosáková, D. (2006). Labelling and content evaluation of commercial veterinary probiotics. *Acta Veterinaria Brno*, 75, 139–144. <https://doi.org/10.2754/avb200675010139>
- Li, G., Yao, W., & Jiang, H. (2014). Short-chain fatty acids enhance adipocyte differentiation in the stromal vascular fraction of porcine adipose tissue. *Journal of Nutrition*, 144, 1887–1895. <https://doi.org/10.3945/jn.114.198531>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)). *Methods*, 25, 402–408.
- Mahan, D. C., Cromwell, G. L., Ewan, R. C., Hamilton, C. R., & Yen, J. T. (1998). Evaluation of the feeding duration of a phase 1 nursery diet to three-week-old pigs of two weaning weights. NCR-42 Committee on swine nutrition. *Journal of Animal Science*, 76, 578–583. <https://doi.org/10.2527/1998.762578x>
- Mallo, J. J., Rioperez, J., & Honrubia, P. (2010). The addition of *Enterococcus faecium* to diet improves piglet's intestinal microbiota and performance. *Livestock Science*, 133, 176–178. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2010.06.057>
- Manning, T. S., & Gibson, G. R. (2004). Microbial-gut interactions in health and disease. Prebiotics. *Best Practice & Research: Clinical Gastroenterology*, 18, 287–298. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2003.10.008>
- Meng, Q. W., Yan, L., Ao, X., Zhou, T. X., Wang, J. P., Lee, J. H., & Kim, I. H. (2010). Influence of probiotics in different energy and nutrient density diets on growth performance, nutrient digestibility, meat quality, and blood characteristics in growing-finishing pigs. *Journal of Animal Science*, 88, 3320–3326. <https://doi.org/10.2527/jas.2009-2308>
- Mishra, D. K., Verma, A. K., Agarwal, N., Mondal, S. K., & Singh, P. (2014). Effect of dietary supplementation of probiotics on growth performance, nutrients digestibility and faecal microbiology in weaned piglets. *Animal Nutrition and Feed Technology*, 14, 283–290. <https://doi.org/10.5958/0974-181X.2014.01336.5>
- Mishra, D. K., Verma, A. K., Agarwal, N., & Singh, P. (2016). Effect of probiotics on blood biochemical profile, immunity and small intestine morphology in growing finishing pigs. *Agricultural Research*, 5, 407–412. <https://doi.org/10.1007/s40003-016-0231-9>
- Miyauchi, E., O'Callaghan, J., Buttó, L. F., Hurley, G., Melgar, S., Tanabe, S., ... O'Toole, P. W. (2012). Mechanism of protection of transepithelial barrier function by Lactobacillus salivarius: Strain dependence and attenuation by bacteriocin production. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 303, 1029–1041. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00003.2012>
- Montagne, L., Pluske, J. R., & Hampson, D. J. (2003). A review of interactions between dietary fibre and the intestinal mucosa, and their consequences on digestive health in young non-ruminant animals. *Animal Feed Science and Technology*, 108, 95–117. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(03\)00163-9](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(03)00163-9)
- Mroz, Z. (2001). Some developments on Dutch nutritional approaches to protect piglets against post-weaning gastrointestinal disorders in the absence of in-feed antibiotics. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 10, 153–167. <https://doi.org/10.22358/jafs/70018/2001>
- Nossol, C., Barta-Böszörményi, A., Kahlert, S., Zuschratter, W., Faber-Zuschratter, H., Reinhardt, N., ... Rothkötter, H. J. (2015). Comparing two intestinal porcine epithelial cell lines (IPECs): Morphological differentiation, function and metabolism. *PLoS One*, 10, e0132323. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132323>
- Nygard, A. B., Jørgensen, C. B., Cirera, S., & Fredholm, M. (2007). Selection of reference genes for gene expression studies in pig tissues using SYBR green qPCR. *BMC Molecular Biology*, 8, 67. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-8-67>
- Patel, R. M., Myers, L. S., Kurundkar, A. R., Maheshwari, A., Nusrat, A., & Lin, P. W. (2012). Probiotic bacteria induce maturation of intestinal claudin 3 expression and barrier function. *The American Journal of Pathology*, 180, 626–635. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.10.025>
- Perdigón, J., Vintiñi, E., Alvarez, S., Medina, M., & Medici, M. (1999). Study of the possible mechanisms involved in the mucosal immune system activation by lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*, 82, 1108–1114. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(99\)75333-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)75333-6)
- Prieto, M. L., O'Sullivan, L., Tan, S. P., McLoughlin, P., Hughes, H., O'Donovan, O., ... Lawlor, P. G. (2014). Evaluation of the efficacy and safety of a marine-derived *Bacillus* strain for use as an in-feed probiotic for newly weaned pigs. *PLoS One*, 9, e88599. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088599>
- Quiniou, N., Dagorn, J., & Gaudre, D. (2002). Variation of piglets' birth weight and consequences on subsequent performance. *Livestock Production Science*, 78, 63–70. [https://doi.org/10.1016/S0301-6226\(02\)00181-1](https://doi.org/10.1016/S0301-6226(02)00181-1)
- Rekiel, A., Bielecki, W., & Wiecek, J. (2010). The effect of Probiotics on the morphological characteristics of the small intestinal mucosa. *Acta Veterinaria Brno*, 79, 519–524. <https://doi.org/10.2754/avb201079040519>
- Rekiel, A., Bielecki, W., Więcek, J., & Kulisiewicz, J. (2010). Histological changes in the small intestinal epithelium in fattening pigs fed selected feed additives. *Acta Veterinaria Brno*, 79, 67–71. <https://doi.org/10.2754/avb201079010067>

- Rekiel, A., & Gajewska, J. (2006). Changes in the intestinal microflora of fatteners, as affected by selected nutritional factors. *Medycyna Weterynaryjna*, *62*, 925–930.
- Rubio, L. A., Ruiz, R., Peinado, M. J., & Echavarri, A. (2010). Morphology and enzymatic activity of the small intestinal mucosa of Iberian pigs as compared with a lean pig strain. *Journal of Animal Science*, *88*, 3590–3597. <https://doi.org/10.2527/jas.2010-3040>
- Rybarczyk, A., Romanowski, M., Karamucki, T., & Ligocki, M. (2016). The effect of Bokashi probiotic on pig carcass characteristics and meat quality. *Fleischwirtschaft*, *31*, 74–77.
- Schrezenmeir, J., & de Vrese, M. (2001). Probiotics, prebiotics and synbiotics- Approaching a definition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *73*, 361–364. <https://doi.org/10.1093/ajcn/73.2.361s>
- Schwarz, C., Plitzner, C., Pfaffl, M. W., Schedle, K., Meyer, H. H., & Windisch, W. (2010). Inulin and probiotics in newly weaned piglets: Effects on intestinal morphology, mRNA expression levels of inflammatory marker genes and haematology. *Archives of Animal Nutrition*, *64*, 304–321. <https://doi.org/10.1080/1745039X.2010.492137>
- Stelzer, G., Dalah, I., Stein, T. I., Satanower, Y., Rosen, N., Nativ, N., ... Lancet, D. (2011). In-silico human genomics with GeneCards. *Human Genomics*, *5*, 709–717. <https://doi.org/10.1186/1479-7364-5-6-709>
- Suzuki, C., Aoki-Yoshida, A., Aoki, R., Sasaki, K., Takayama, Y., & Mizumachi, K. (2017). The distinct effects of orally administered *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* C59 on gene expression in the murine small intestine. *PLoS One*, *12*, e0188985. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188985>
- Uni, Z., Platin, R., & Sklan, D. (1998). Cell proliferation in chicken intestinal epithelium occurs both in the crypt and along the villus. *Journal of Comparative Physiology B*, *168*, 241–247. <https://doi.org/10.1007/s003600050142>

How to cite this article: Reszka P, Dunislawski A, Slawinska A, Siwek M, Kapelański W, Bogucka J. Influence of the effective micro-organisms (EM) on performance, intestinal morphology and gene expression in the jejunal mucosa of pigs fed different diets. *J Anim Physiol Anim Nutr.* 2020;104:1444–1453. <https://doi.org/10.1111/jpn.13404>

Article

Effects of Effective Microorganisms on Meat Quality, Microstructure of the *Longissimus Lumborum* Muscle, and Electrophoretic Protein Separation in Pigs Fed on Different Diets

Patrycja Reszka ^{1,*} , Dorota Cygan-Szczegielniak ¹, Hanna Jankowiak ², Aleksandra Cebulska ², Beata Mikołajczak ³  and Joanna Bogucka ¹

¹ Department of Animal Physiology, Physiotherapy and Nutrition, Faculty of Animal Breeding and Biology, UTP University of Science and Technology, Mazowiecka 28, 85-084 Bydgoszcz, Poland;

cygan@utp.edu.pl (D.C.-S.); bogucka@utp.edu.pl (J.B.)

² Department of Animal Breeding, Faculty of Animal Breeding and Biology, UTP University of Science and Technology, Mazowiecka 28, 85-004 Bydgoszcz, Poland; jankowiak@utp.edu.pl (H.J.);

cebulska@utp.edu.pl (A.C.)

³ Department of Meat Technology, Faculty of Food Science and Nutrition, Poznań University of Life Sciences, Wojska Polskiego 31, 60-624 Poznań, Poland; beata.mikolajczak@up.poznan.pl

* Correspondence: patrycja.reszka09021992@wp.pl

Received: 16 September 2020; Accepted: 25 September 2020; Published: 26 September 2020



Simple Summary: Pork is the most popular meat among consumers in Poland, but it can also be a source of pathogens. Therefore, there is a need to find effective prophylaxis in order to ensure that consumers have access to safe food with the desired nutritional qualities and, above all, food that is free of pathogens. In order to meet these expectations, producers use probiotics containing effective microorganisms (EMs) offered in the market. In this study the same probiotic, EM Bokashi, was used for the first time in combination with three nutritional variants with proteins of different origin.

Abstract: The aim of the study was to determine how effective microorganisms influence meat quality, the microstructure of the longissimus lumborum muscle, and electrophoretic protein separation. The study group consisted of 150 piglets divided into three feeding groups: C, E1, and E2. The feeding groups included C—a standard fodder blend with a full share of post-extracted soya meal; E1—a 50%/50% mix of pea and lupine/soya bean in phase I of fattening and a 75%/25% mix of pea and lupine/soya bean in phase II of fattening; and E2—a 50%/50% mix of pea and lupine/soya bean in phase I of fattening and in 100% pea and lupine in phase II of fattening. The experimental factor was the addition of the EM Carbon Bokashi probiotic to the diet (C + EM, E1 + EM, E2 + EM). Influence of the feeding system on the following parameters was also estimated. After slaughter, the meat quality, LL muscle microstructure, and electrophoretic protein separation were assessed. In the C + EM group, a lower water-holding capacity was demonstrated. Meat from pigs fed the effective microorganism additive was much harder in the E1+EM group compared to meat from pigs from the E1 group. A beneficial effect of effective microorganism was found in the E2 + EM group, where less thermal leakage from the meat was demonstrated. A beneficial effect of the feeding system on thermal leakage and loin eye area in the E2 + EM group was demonstrated. In the C + EM group, a lower total number of muscle fibers was demonstrated. The addition of effective microorganism caused an increase in the diameter of fast twitch fibers in the E1 + EM group. In the same group of pigs, effective microorganisms caused a lower proportion of fiber fission. This nutritional variant appears to be the most appropriate for proteins as well, because it led to the most favorable percentage of individual proteins after effective microorganisms supplementation in the longissimus lumborum muscle.

Keywords: pigs; probiotic; meat quality; muscle fibers; histopathological parameters; intramuscular fat; protein electrophoresis

1. Introduction

Pork is one of the most popular meat choices for consumers worldwide [1]. Unfortunately, it is also often a potential source of pathogens that occur naturally in pigs but cause diseases due to microorganisms such as *Salmonella* spp., *Toxoplasma gondii*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* spp., and *Staphylococcus aureus*. In order to develop an effective prophylaxis of pathogen-free pork consumption, it is important to find appropriate methods to eliminate pathogens from meat [2]. Healthy food with appropriate dietary qualities is a priority among consumers. Therefore, in order to meet these expectations, producers use feed additives—probiotics—containing effective microorganisms (EMs), which combat pathogenic microflora and improve the microbiological balance of the digestive system and meat quality [3,4]. Many authors have shown a beneficial effect of probiotic preparations on meat quality, including succulence, elasticity, tenderness, and color [3–5]. On the other hand, intensive breeding work, aimed at achieving the highest possible production—and, thus, the highest meat content of fattening pigs—has led to histopathological changes in the muscles, such as changes in the size and shape of fibers (atrophy or hypertrophy), splitting, and fiber necrosis. The individuals in which we most frequently encounter these changes are fattening pigs of the pietrain breed and its hybrids [6]. According to the existing research, intensive selection, in addition to genetic conditions, nutrition, body weight, and breed, may also affect the number of muscle fibers [7]. The histological and biochemical properties of the muscle, e.g., the area and type of fibers or the glycolytic and oxidative properties, are the elements that determine the quality of meat [8,9].

In January 2006, after a ban on antibiotics was introduced in the European Union, all dietary supplements (e.g., probiotics, prebiotics, synbiotics, and herbs) have become an object of interest for scientists and the subject of many studies in order to find an effective alternative. The term ‘probiotic’ refers to live microorganisms (with proven probiotic properties and origin) that, when administered in sufficient quantities, have a beneficial effect on animal health and productivity [10]. Currently, the majority of the produced probiotics use lactic acid bacteria (*Lactobacillus acidophilus*), which prevent the development of *Salmonella*, *Escherichia coli*, and *Candida albicans* and stimulate immunity. Other strains of the genus *Lactobacillus* synthesize vitamins D and K (*L. brevis*), produce the antibiotic lactolin (*L. plantrum*), or increase tolerance to lactose (*L. rhamnosus*). Other bacteria used in probiotic production, such as *Bifidobacterium bifidum*, inhibit the development of pathogens; *Enterococcus faecium* destroys rotaviruses [11]. The probiotic preparation used in this experiment contains strains of microorganisms, including *Lactobacillus plantrum*, *Enterococcus faecium*, *Bacillus licheniformis*, and *Clostridium butyricum*, which do not undergo any technological treatment [12].

In Poland, where 80% of animal nutrition is based on imported soya bean meal, it is important to find an alternative source of protein for reasons of the food safety of both humans and animals. The solution to this problem may be to use native legumes—peas and lupine [13]. Therefore, this paper presents three nutritional variants, with proteins of different origin, combined with the addition of a probiotic.

The aim of the study was to determine how effective microorganisms (EM) influence meat quality, the microstructure of the longissimus lumborum (*LL*) muscle (the enzymatic profile of the muscle fibers, intramuscular fat content, and the occurrence of pathological changes), and the electrophoretic distribution of selected proteins in pigs fed on diets with proteins of different origin.

2. Materials and Methods

2.1. Maintenance and Feeding of Animals

The tests were carried out at the Fatstock Pig Utility Control Station in Mełno, Poland. The study covered 150 piglets ♀F1 (Polish Landrace PL × Polish Large White PLW) with ♂F1 (Pietrain × Duroc), 50% gilts and 50% hogs), at an initial body weight of about 30 kg. The animals were placed into two separate, identically constructed and equipped rooms—the control room (groups C, E1, and E2) and the experimental room (groups C + EM, E1 + EM, and E2 + EM). Each animal was marked and placed in an individual 2 m² pen with straw bedding equipped with automatic feeder and nipple drinker, allowing constant access to water (Directive No. 2010/63/EU). Wheat straw was replaced three times a week and animals' pens were augmented by metal chains.

The fattening pigs were divided into three groups: the control group (C) and the experimental groups (E1 and E2), depending on the nutrition they were receiving. Group C was fed a standard diet based on post-extraction soya bean meal (100%). In fattening phase I, groups E1 and E2 were given a feed mixture with 50% soya bean and 50% pea and lupine. In fattening phase II, group E1 were fed a compound feed of 25% soya bean and 75% pea and lupine, while in group E2 soya bean protein was completely replaced with 100% pea and lupine. The composition of the feeds is shown in Table 1.

Table 1. The composition of feeds.

Dietary Value	Control		E1		E2	
	Phase I (30–70 kg)	Phase II (70–115 kg)	Phase I (30–70 kg)	Phase II (70–115 kg)	Phase I (30–70 kg)	Phase II (70–115 kg)
Dry matter, g	877	875	877	875	877	875
Metabolic energy, MJ	13.39	13.11	13.32	13.09	13.32	13.12
Total protein, g	170	159	171	157	171	160
Fat, g	27	20	29	20	29	20
Lysine, g	10.6	9.7	10.6	9.7	10.6	9.7
Calcium, g	5.9	5.8	5.9	5.8	5.9	5.8
Phosphorus, g	5.3	5.2	5.3	5.2	5.3	5.2
Sodium, g	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7
Vitamin A, IU	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000
Vitamin D, IU	2.200	2.200	2.200	2.200	2.200	2.200
Vitamin E, IU	80	80	80	80	80	80
Composition of the fodder, %:						
Soy meal 46% BO	16	12	10	4	10	-
Wheat 12%	20	20	20	20	20	20
Barley 12%	35	45	30	41	30	35
Triticale 10%	25.3	20	26	20	26	20
Soybean oil	1	0.3	1.3	0.3	1.3	0.3
Lupine 37%	-	-	7	9	7	12
Pea 21%	-	-	3	3	3	10
PORKOVITAL T PEA 2.5%	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
SELACID GG DRY 25 BR	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Total	100	100	100	100	100	100

In order to assess the effect of the probiotic used, animals were divided into control subgroups (without the probiotic)—C, E1, and E2—and experimental subgroups (with the probiotic)—C + EM, E1 + EM, and E2 + EM (Table 2).

The laboratory assessment covered meat samples taken from 60 animals (10 randomly pigs from each group: five gilts and five hogs) which were pooled into a single study group within each feeding system because there were no significant sex-related differences in the values of the analyzed parameters (Table 2).

Table 2. Experiment arrangements.

Control Group (C)		Experimental Group (E1)				Experimental Group (E2)					
C		C + EM		E1		E1 + EM		E2		E2 + EM	
n = 25 ♂13 ♀12		n = 25 ♂12 ♀13		n = 25 ♂12 ♀13		n = 25 ♂13 ♀12		n = 25 ♂13 ♀12		n = 25 ♂12 ♀13	
Body Weight at Slaughter, kg											
♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
111.27	107.70	113.42	112.04	115.63	109.00	115.86	112.50	113.82	111.55	115.86	115.56
± 5.70	± 8.45	± 4.94	± 3.07	± 4.67	± 7.29	± 4.43	± 4.21	± 4.88	± 4.57	± 4.64	± 4.30

Group C—standard diet based on post-extraction soya bean meal (100%); groups E1 and E2—in phase I of fattening, a feed mix with 50% soya bean and 50% pea and lupine was administered; group E1—in phase II of fattening a feed mix with 25% soya bean and 75% pea and lupine was administered; group E2—100% of soya bean protein was replaced with pea and lupine; experimental groups, with the addition of a probiotic to the diets (C + EM, E1 + EM, E2 + EM) [14].

The applied probiotic EM Carbon Bokashi [14] was administered in the amount of 5 kg per tonne of feed (in phase I of fattening) and 3 kg per tonne of feed (in phase II of fattening). Animals weighing approximately 115 kg were slaughtered in accordance with the applicable standards and regulations (Ordinance of the Minister of Agriculture and Rural Development of 9 September 2004). An electric stunning method was applied to the pigs.

2.2. Quality of Meat

The acidification of muscle tissue 48 h after slaughter (pH_{48}) was determined using an Elmetron CP-401 pH meter with a firing electrode. The equipment was calibrated using Elmetron's pH 7.0 and pH 4.0 buffers. Meat quality was assessed 48 h after slaughter (without repetitions) on the *LL* muscle, which was stored at 4–6 °C. The water-holding capacity (WHC) was determined according to Grau and Hamm [15], as modified by Pohji and Ninnivaara [16]. A 300-mg sample of minced meat was weighed and placed on Whatman filter paper between two glass plates under a constant load of 2 kg for 5 min. The juice infiltration area was used to calculate the percentage of loose water in the meat, assuming that 1 cm² of infiltration corresponds to 10 mg of water. The infiltration surface of meat juice was measured with a planimeter. WHC was reported as the mean of three trials.

The thermal leakage was determined according to the method developed by Walczak [17], without repetitions. A 20-mg meat sample was placed on a hygroscopic gauze and heated at 85 °C for 10 min in a water bath. After heating and removing the gauze, the sample was cooled to 4 °C and weighed. On the basis of the weight difference before and after heat treatment, the percentage of weight loss was calculated.

The color of the meat was measured on a slice of raw meat using a Minolta CR 310 photocolormeter (Konica Minolta, Tokyo, Japan) with a measuring hole diameter of 50 mm. The instrument was standardised using the white calibration plate CR310 with coordinates $Y = 92.80$, $x = 0.3175$ and $y = 0.3333$. The color parameters of individual samples were determined in the CIE $L^*a^*b^*$ system (L^* —brightness; a^* —proportion of red; b^* —proportion of yellow) [18] using Illuminant D65 and a standard 2° observer, without repetitions.

Marbling was determined using a slice of raw meat weighing 120 g. The visual assessment was carried out by a team of five specialists and the results was presented as the mean of these five assessments. Marbling was assessed on the basis of Canadian and American models on a 10-degree scale [19,20], where 1 = no intramuscular fat content and 10 = very high marbling.

The tenderness of the meat was determined using an Instron 3342 strength tester equipped with a Warner-Bratzler cap, according to the method by Szalata et al. [21]. Meat samples weighing 120 g were heated in a water bath to an internal temperature of 70 °C. Heat treatment was conducted in a 0.85% NaCl solution. Five 10 mm × 10 mm rods were cut out along the muscle fibers, then cut perpendicularly to the muscle fibers. The result, which is the mean of five trials, was recorded as maximum shear force expressed in N.

The outline of the surface area of the *LL* muscle (sirloin eye area) was drawn on a slice of raw meat (120 g) and the surface area (cm²) was determined using the planimetric method.

2.3. Histochemical Analysis

To assess the microstructure of the muscle, a 5 × 15 mm sample was taken from the longissimus lumborum (*LL*) muscle between the 4th and 5th ribs. Next, the samples were frozen in liquid nitrogen at −196 °C. The frozen muscle samples were transferred to cryostat (Thermo Shandon, London, UK) and cut into 10-µm thick histological fragments at about −25 °C. The fragments were then placed on a slide and subjected to the following histochemical reactions:

In order to determine the muscle fiber types, a combined reaction was carried out to the activity of two enzymes [22]: tetrazoline reductase NADH-TR (incubation of preparations in the incubation fluid: NADH, NBT, and 0.1M phosphate buffer at pH 7.4 and 37 °C for 1 h) and myofibrillar ATP (pre-incubation of the preparations in an acidic solution at pH 4.0 for 3 min, followed by incubation in an incubation fluid: ATP, CaCl₂, and sodium barbiturate at pH 9.6 and 37 °C for 30 min). The effect of the reaction is the transformation of colorless tetrazolium salts into visible formazan granules, which allows for an unambiguous determination of the metabolic/structural type of fibers: STO (slow twitch oxidative fiber, dark brown or black), FTO (fast twitch oxidative fiber, blue), and FTG (fast twitch glycolytic fiber, light, straw-colored).

In order to determine the percentage of intramuscular fat (IMF; intramuscular fat is red), the samples were dyed oil red according to Dubovitz et al. [23]. First, the slides were taken from the freezer and left to dry at room temperature for two minutes. Then, immersing the slides in various reagents with specific periods of time: formaldehyde 4% (5 min), distilled water (5 min), oil red solution (Sigma-Aldrich, Poznan, PL, 15 min), distilled water (15 min).

In order to determine pathological changes in the muscle, topographic staining with hematoxylin and eosin was performed. Pathological changes, such as giant fibers, necrotic fibers, and splitting, were determined.

Then, microscopic images were recorded on a computer disk using a Nikon Ci-L microscope equipped with a Nikon DS-Fi3 camera with a resolution of 5.9 MPix and NIS ELEMENTS software, enabling linear and planimetric measurements and digital analysis of the microscopic images. The percentage of individual muscle fiber types was calculated for an area of 1.5 mm². The diameters of muscle fibers were measured according to the method given by Brooke [24]: measuring the shortest diameters. The density of muscle fibers was calculated based on the average number of fibers per 1.5 mm². The total number of fibers (TNF) was calculated by multiplying the fiber density and the sirloin eye area. Intramuscular fat (IMF) was determined over an area of 3 mm² using the function of filtering out the indicated color, which calculates the percentage of red. The software also calculated the number of normal and pathological fibers over the area of 1.5 mm² and the percentage content of these fibers.

2.4. Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

2.4.1. Sample Preparation

Samples of 2 mg of raw frozen meat were mixed with a 98-µL buffer (pH 6.8; 8 M urea, 2 M thiourea, 0.05 M Tris-HCl, 0.075 M DTT, 3% [w/v] SDS, 0.05% [w/v] bromophenol blue). Each sample was heated for 3 min at 98 °C. The protein concentration in 10-µL samples was determined using a 2-D Quant Kit (GE Healthcare Bio-Sciences, Marlborough, MA, USA). Protein from each sample (20 µg) was subjected to electrophoresis.

2.4.2. Gel Electrophoresis

The proteins were separated using SDS-PAGE in 15% polyacrylamide two-phase gels [25]. The resolving gel contained 30% (w/v) acrylamide, 75% (v/v) glycerol, 3 M Tris [pH 8.8], 10% (w/v) SDS,

1% (*w/v*) ammonium persulfate, and 16 μ L of TEMED. The stacking gel (10% (*w/v*) acrylamide, 5% (*v/v*) glycerol, 0.125 M Tris (pH 6.8), distilled water, 10% (*w/v*) SDS, 1% (*w/v*) ammonium persulfate, staining buffer, and 25 μ L of TEMED) was poured on the layer of resolving gel. The separation was performed with buffer (0.25 M Tris base, 1.92 M glycine, 0.5% SDS (*w/v*), and 10 mM of 2-mercaptoethanol). A PageRuler Plus Protein Ladder 10–250 kDa (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) was used as a standard for protein molecular weight (m.w.) calibration. The gels were prepared in triplicate on 80 \times 100 mm plates with 0.75-mm spacers. The separation was conducted using an SE 250 type apparatus (Hoefer Scientific Instruments Company, Holliston, MA, USA). Electrophoresis was run with a constant current of 40 mA per two gels. Proteins were visualized by staining with 0.05% (*w/v*) Coomassie Brilliant Blue R-250, 50% (*v/v*) methanol, and 10% (*v/v*) acetic acid for 0.5 h and then destained overnight (10% (*v/v*) methanol and 4.5% (*v/v*) acetic acid).

2.4.3. Image Analysis

All images of the polyacrylamide gels were acquired using an Image Master[®] VDS imaging system (Pharmacia Biotech, Vienna, Austria) and analyzed using Image Master[®] 1D Elite v. 4.0 software. Computations were based on the assumption that the area of a single protein band accounts for a percentage ratio in relation to the area of all separated protein bands, which constitutes 100%.

2.5. Statistical Analysis

Since some results did not meet the assumptions of a normal distribution (which was verified using the Shapiro–Wilk test) or the assumptions of homoscedasticity—required for implementing parametric tests—the non-parametric Mann–Whitney U test was used in order to examine the statistically significant differences between two experimental groups within one feeding system (C vs. C + EM; E1 vs. E1 + EM and E2 vs. E2 + EM) for percentage of muscle fibers FTO and FTG, total number of muscle fibers (TNF), normal fibers (%), giant fibers (%), fiber necrosis (%), fiber splitting (%), intramuscular fat content (%), pH₄₈, WHC (%) and for marbling score. For the remaining parameters which met the assumptions of a normal distribution and homogeneity of variance, the parametric analysis of variance (ANOVA) was applied, followed by a test for multiple comparisons, i.e., post hoc Tukey test (HSD). For the purpose of analyzing the relationships between selected parameters, Spearman's rank correlation coefficient was applied. Additionally, the Kruskal–Wallis test and the comparison of mean ranks were used to test the differences between the feeding systems (C vs. E1 vs. E2 and C + EM vs. E1 + EM vs. E2 + EM). The obtained results were processed statistically using Statistica 13.1 software.

3. Results and Discussion

3.1. Quality of Meat

Table 3 presents the results of the meat quality assessment.

In control group C and experimental groups E1 and E2, no influence was demonstrated of feeding pigs effective microorganisms on the degree of the acidification of muscle tissue evaluated 48 h after slaughter. Previous research [3,26] also did not report an effect on pH₄₈ from feeding fattening pigs effective microorganisms. Additionally, the studies conducted by Yang et al. [26] on broilers did not show the effect of *Clostridium butyricum* on the ultimate pH. In contrast, studies by Zhang et al. [9] showed an increase in pH₂₄ meat of pigs after dietary supplementation with resveratrol—a flavonoid with antioxidant and anti-inflammatory effects—in the amount of 300 mg/L per kg of feed, compared to the control group ($p < 0.05$). Ultimate pH has a significant effect on WHC of meat. The higher ultimate pH might lead to the stronger WHC and the lower moisture losses [27]. In addition, the pH value has a significant impact on meat color and tenderness [28].

In the present study, meat from the experimental group C + EM—fed a standard diet with post-extraction soya bean meal with the addition of effective microorganisms—had lower WHC (18.16%) than the control group (15.57%) ($p < 0.05$). A study by Dowarah et al. [29] reported improvement

of WHC after supplementation with *Pediococcus acidilactis* FT28 ($p < 0.05$). Chang et al. [28] did not demonstrate an effect of the probiotic on WHC. High WHC values may indicate a slow and steady rate of pH drop during the initial hours after slaughter [30]. WHC is an important criterion for classifying meat quality, mainly from the producer's point of view, as it indicates the meat's suitability for further processing, while, from the consumer's point of view, it impacts on the culinary use of the meat [31]. The beneficial effect of effective microorganisms on thermal leakage was demonstrated in experimental group E2 + EM: it was statistically significantly lower compared to the control group ($p < 0.05$). Jukna et al. [3] found that after the addition of the probiotics Yeasture and Microbond to pig feed, an improvement in the culinary properties of the meat was found. Also, the influence of diet on thermal leakage was demonstrated. In the experimental group E1+EM thermal leakage was significantly higher, compared to group E2 + EM ($p \leq 0.05$). Bocian et al. [32] showed no effect of feeding pigs with legumes on thermal leakage. Zmudzińska et al. [33] demonstrated that feeding pigs with diets containing legume plants and extracted rapeseed meal does not affect the pork meat quality. Other authors [34] showed that the experimental diet with an addition of 5% of raw soybean seeds affected ($p < 0.05$) meat color and also meat composition.

Table 3. Effects of effective microorganisms (EM) on meat quality in pigs fed on diets with proteins of different origin.

Traits	C		E1		E2	
	C	C + EM	E1	E1 + EM	E2	E2 + EM
pH ₄₈	5.14 ± 0.12	5.09 ± 0.09	5.13 ± 0.06	5.19 ± 0.10	5.11 ± 0.05	5.13 ± 0.07
WHC, loose water %	15.57 ^a ± 2.49 $p = 0.016$	18.16 ^b ± 2.50 $p = 0.016$	17.77 ± 2.13	17.01 ± 1.70	18.89 ± 3.72	16.28 ± 1.88
Thermal leakage, %	24.39 ± 1.50	24.25 ± 2.54	24.44 ± 0.63	24.80* ± 1.96	24.80 ^a ± 2.50 $p = 0.024$	22.38 ^{b*} ± 1.25 $p = 0.024$
L*—Lightness	56.30 ± 1.92	57.59 ± 3.48	56.49 ± 2.36	55.65 ± 2.55	56.13 ± 1.15	56.39 ± 2.52
a*—Redness	13.91 ± 0.66	14.13 ± 0.86	13.99 ± 1.04	14.41 ± 0.56	14.21 ± 0.78	14.00 ± 0.98
b*—Yellowness	4.50 ± 0.64	4.25 ± 0.77	4.27 ± 0.96	4.51 ± 0.80	4.89 ± 0.55	4.56 ± 0.91
Marbling, score	1.87 ± 0.79	1.47 ± 0.50	1.59 ± 0.49	1.70 ± 0.60	1.39 ± 0.48	1.55 ± 0.51
Tenderness, N	47.94 ± 2.80	46.83* ± 5.74	47.27 ^a ± 7.62 $p = 0.030$	56.27 ^{b*} ± 7.28 $p = 0.030$	53.57 ± 5.78	51.34* ± 5.03
Loin eye area, cm ²	53.10 ± 5.67	55.76 ± 6.15	53.41 ± 4.45	52.62* ± 2.21	57.59 ± 4.96	57.93* ± 3.31

Group C—standard diet based on post-extraction soya bean meal (100%); groups E1 and E2—in phase I of fattening, a feed mix with 50% soya bean and 50% pea and lupine was administered; group E1—in phase II of fattening a feed mix with 25% soya bean and 75% pea and lupine was administered; group E2—100% of soya bean protein was replaced with pea and lupine; experimental groups with the addition of a probiotic to diets (C + EM, E1 + EM, and E2 + EM); ^{a, b} statistically significant differences between two experimental groups within specific nutritional systems at $p \leq 0.05$; * statistically significant differences between the feeding systems (C vs. E1 vs. E2 and C + EM vs. E1 + EM vs. E2 + EM) at $p \leq 0.05$; p -value for groups that differ statistically significantly within one feeding system.

The application of the Bokashi preparation did not have a significant statistical effect on the change of meat color (L*a*b*) in the study groups. A study by Balasubramanian et al. [35] also showed no effect of the addition of the probiotic on meat color (L*: 58.42; a*: 17.47; b*: 6.10 at a supplementation of 0.1 MSP g/kg). Other authors, on the other hand, noted a much higher proportion of yellow among the group of pigs fed the probiotic (8.98 vs. 9.48; $p < 0.05$) [18]. Meng et al. [5] demonstrated the beneficial effect of supplementing the diet of fattening pigs with *Bacillus subtilis* and *Clostridium butyricum* on the proportion of yellow ($p < 0.01$) and brightness ($p < 0.05$).

The use of the Bokashi preparation did not have a significant statistical effect on meat marbling. This is consistent with the results from Balasubramanian et al. [35], but different from Meng et al. [5]. Marbling is defined as the amount and spatial distribution of visible, white fat spots present in meat. The proper degree of marbling has a beneficial effect on the succulence, tenderness, and palatability of the meat [19].

Another feature analyzed was tenderness, which depends on the age and species of the pig, as well as on the procedures before and after slaughter, among other things. The degree of tenderness is influenced by the time and conditions in which the meat matures and the proteolytic activity during

storage [36]. In the experimental group E1 + EM (50% soya bean and 50% pea and lupine in phase I of fattening, 25% soya bean and 75% pea and lupine in phase II of fattening), the differences in terms of tenderness were statistically significant. The meat from pigs fed effective microorganisms was significantly harder (56.27 N) than the meat from the E1 control group (47.47 N; $p < 0.05$). On the other hand, an experiment by Yang et al. [27] found reduced cutting force in poultry, which indicates improved tenderness. However, Chang et al. [28] and Liu et al. [37] did not demonstrate a significant effect of probiotic use on meat tenderness. The influence of diet on meat tenderness was also demonstrated, which differed statistically significantly between the experimental groups (C + EM, E1 + EM and E2 + EM) ($p \leq 0.05$). The most desirable, tender meat was obtained from pigs from the C + EM group, while the hardest was obtained from pigs from the E1 + EM group. In the studies by Bocian et al. [32] showed no effect of feeding pigs with legumes on meat tenderness. No effect of pig feeding with Bokashi preparation on the sirloin eye area was demonstrated in this study. Study by Balasubramanian et al. [38] also reported no effect of supplementation of the probiotic preparation *Bacillus* spp. at the levels of 0.01% and 0.02% on the sirloin eye area (68.67 and 69.47 cm², respectively). However, the influence of the feeding system on this feature was noted. Significantly larger sirloin eye area was demonstrated in pigs in the E2 + EM group, compared to E1 + EM ($p \leq 0.05$). The effect of probiotics may vary, as it depends on the type of bacteria used, the level and time of supplementation, the composition of the diet, and interactions with other dietary supplements [5].

3.2. Microstructure of the Longissimus Lumborum Muscle

This is one of the few studies that deals with the influence of effective microorganisms on the microstructure of the LL muscle in pigs. The microstructure of the LL muscle and the proportion of pathological lesions is presented in Table 4.

Table 4. Effects of effective microorganisms (EM) on the microstructure of *longissimus lumborum* muscle in pigs fed on diets with proteins of different origin.

Traits		C		E1		E2	
		C	C + EM	E1	E1 + EM	E2	E2 + EM
Percentage of muscle fibers, %	STO	13.60 ± 2.50	16.33 ± 6.60	14.36 ± 4.68	14.51 ± 3.60	16.10 ± 4.41	15.41 ± 4.77
	FTO	13.69 ± 2.82	13.52 ± 3.57	13.80 ± 2.40	14.05 ± 3.27	14.70 ± 3.76	15.13 ± 2.20
	FTG	72.71 ± 3.21	70.15 ± 9.25	71.84 ± 6.35	71.44 ± 3.49	69.20 ± 16.14	69.46 ± 20.62
Fiber diameter, µm	STO	35.03 ± 4.34	35.86 ± 4.69	38.86 ± 5.61	40.82 ± 5.21	37.11 ± 3.38	39.53 ± 2.65
	FTO	35.44 ± 6.52	40.66 ± 6.63	35.78 ^a ± 3.88 $p = 0.003$	43.17 ^b ± 3.51 $p = 0.003$	37.24 ^a ± 5.46 $p = 0.028$	39.42 ^b ± 2.26 $p = 0.028$
	FTG	47.14 ± 4.50	52.30 ± 8.71	44.68 ^{aa} ± 5.16 $p = 0.012$	50.57 ^b ± 3.46 $p = 0.012$	51.26 [*] ± 2.63	52.27 ± 3.26
Muscle fiber density (fiber number/1,5 mm ²)	Sum	244 ± 48	228 ± 67	243 ± 60	205 ± 22	222 ± 20	232 ± 23
	STO	35 ± 10	34 ± 9	33 ± 7	30 ± 8	34 ± 10	28 ± 10
	FTO	34 ± 10	31 ± 11	33 ± 7	29 ± 7	27 ± 8	31 ± 7
Total number of muscle fibers (×1000) (TNF)	FTG	175 ± 34	163 ± 65	177 ± 52	146 ± 16	161 ± 13	173 ± 21
		744 ^a ± 368 $p = 0.044$	694 ^b ± 488 $p = 0.044$	743 ± 371	617 ± 254	660 ± 406	652 ± 439
	Intramuscular fat content, (histochemically) %	1.66 ± 1.55	2.27 ± 1.13	1.84 ± 1.21	1.67 ± 0.96	1.66 ± 2.05	2.45 ± 1.79
Normal fibers, %	97.22 ± 2.02	97.36 ± 1.97	95.95 ± 2.72	98.27 ± 1.02	96.72 ± 1.71	96.60 ± 1.86	
Giant fibers, %	1.99 ± 1.84	1.29 ± 1.29	1.76 ± 1.80	1.10 ± 1.17	1.87 ± 1.16	1.95 ± 1.50	
Fiber necrosis, %	0.11 ± 0.18	0.34 ± 0.53	0.84 ± 3.03	0.80 ± 0.77	0.60 ± 0.82	0.30 ± 0.46	
Fiber splitting, %	0.68 ^{aa} ± 0.25 $p = 0.041$	1.01 ^b ± 0.92 $p = 0.041$	1.45 ^{aa} ± 1.1 $p = 0.024$	0.83 ^b ± 0.81 $p = 0.024$	0.81 ^{aa} ± 0.77 $p = 0.040$	1.15 ^b ± 0.82 $p = 0.040$	

Group C—standard diet based on post-extraction soya bean meal (100%); groups E1 and E2—in phase I of fattening, a feed mix with 50% soya bean and 50% pea and lupine was administered; group E1—in phase II of fattening a feed mix with 25% soya bean and 75% pea and lupine was administered; group E2—100% of soy bean protein was replaced with pea and lupine; experimental groups with the addition of a probiotic to diets (C + EM, E1 + EM, E2 + EM); STO—slow twitch oxidative fibers; FTO—fast twitch oxidative fibers, FTG—fast twitch glycolytic fibers; TNF—total number fibers; ^{a, b} statistically significant differences between two experimental groups within specific nutritional systems at $p \leq 0.05$; * statistically significant differences between the feeding systems (C vs. E1 vs. E2 and C + EM vs. E1 + EM vs. E2 + EM) at $p \leq 0.05$; p-value for groups that differ statistically significantly within one feeding system

The proportions of different types of muscle fibers are one of the most important factors that influence the quality of meat and depend on the nutrition, breed, sex, age, and physical activity of the animal [7,39]. The study did not find any influence of effective microorganisms on the proportions of particular muscle fiber types (Figure 1A) and their density. Such an influence was demonstrated, however, by Lebedová et al. [40], who divided the animals into three groups: AL—ad libitum nutrition, R1—feed limitation, and R2—strong feed limitation. The mix from the AL group had a significantly lower proportion of FTG fibers (81.38%) compared to pigs from Groups R1 and R2 (84.03 and 84.18%, respectively; $p < 0.05$). Research by Brzobohaty et al. [41] carried out on hybrids of the D × genotype ($LW_D \times L$) also found a significant effect of nutrition on the proportions of muscle fibers ($p < 0.001$). Pigs fed the highest level of rapeseed meal recorded the highest percentage of STO fibers (16%) and fiber density per mm^2 (31). The group of animals receiving the lowest level of crude protein (142,82 g vs. 146,93 vs. 153,69 g) was characterised by the highest percentage of FTG fibers (86%), while the density of fibers was $22/\text{mm}^2$ [41]. The addition of resveratrol to the diet of fattening pigs at 300 and 600 mg/kg resulted in a change to more oxidative muscle fibers [9]. In this study a tendency towards fewer fibers per unit of muscle area and significant difference in TNF ($p < 0.05$) was observed in experimental groups C + EM, which affects the tender/fine structure of meat. In experiment was found a significantly larger diameter of FTO and FTG fibers in only the experimental group E1 with addition of effective microorganisms ($p < 0.05$). Of the muscle fiber types studied, the largest diameters were recorded for FTG fibers. Research by Zhou et al. [42] showed that the dietary supplementation of fattening pigs with 0.08% polyphenolic extract of *Eucommia ulmoides* Oliver (PEE) leaves resulted in a decrease in fiber diameter with increased fiber density ($p < 0.05$). A study by Muqader [43] reported larger diameters of muscle fibers in broiler chickens whose diet was supplemented with zinc. Similarly, a study by Zhou et al. [44] carried out on the thoracic and femoral muscles showed that the addition of 200 mg/kg and 400 mg/kg of probiotics (*Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, and *Bacillus natto*) to the diet of broilers had a significant effect on the growth of muscle mass and the diameter of muscle fibers at a late stage of growth. Jin et al. [45], in their study on the thoracic and femoral muscles, found a reduction in the diameter of muscle fibers ($p < 0.05$) after the addition of 0.3 mg/kg of selenium yeast and 5 mg/kg of boron to the diet of chickens. After adding the a synbiotic consisting of 0.8% RFO prebiotic and 1% Lavipan[®] probiotic for Ross 308 chicken feed, Bogucka et al. [46] also observed a tendency of reduced-diameter muscle fibers. This resulted in an increase in fiber density—the fineness of the meat—which had a beneficial effect on meat quality. Moreover, the influence of different diet on the diameter of FTG fibers was also demonstrated. They were significantly larger in the E2 group, in which the diet was based only on pea and lupine (100% in the II phase of fattening), compared to E1 group (respectively: 51.26 vs. 44,68 μm) ($p < 0.05$). Bogucka et al. [47] demonstrated the impact of different nutritional strategies on the histochemical characteristics of pig muscles. The authors was found that pigs receiving less protein and energy in their diet were characterized by a higher proportion and increased diameter of FTG fibers. A higher percentage of FTG fibers with limited nutrition was confirmed by Skiba et al. [48] and Brzobohaty et al. [49].

None of the pig feeding groups studied displayed an effect from the EMs on intramuscular fat content, which was at a balanced, relatively low level: from 1.66% in the C and E2 groups to 2.45% in the E2 + EM group (Figure 1B). The reason for this may be the selection of pigs towards high meatiness at the expense of lower fat content, and thus, poorer meat quality—including succulence, palatability, and tenderness [8]. Replacing the genetically modified soya bean meal with Albatros peas had a significant impact on reducing the IMF content (from 2.18% and 2.19% to 2.04%) in the *longissimus dorsi* muscle of pigs ($p < 0.05$) [50]. A study by Madera et al. [51] did not demonstrate that diet can have a significant effect on IMF content for either the protein-reduced diet or the control group. Although the authors showed a slight increase in IMF content (from 1.78% to 2.06%) in Alentejana purebred pigs, this is still a small amount. This was clearly confirmed by studies by Lopez et al. [52], who reported a significantly higher intramuscular fat content with a 5% reduction in protein levels in

the diet ($p < 0.003$). According to research by Olivares et al. [53], the addition of high levels of vitamin A (dVitA; 100,000 IU) to the diet of Duroc boars resulted in a 20% increase in the IMF of their offspring.

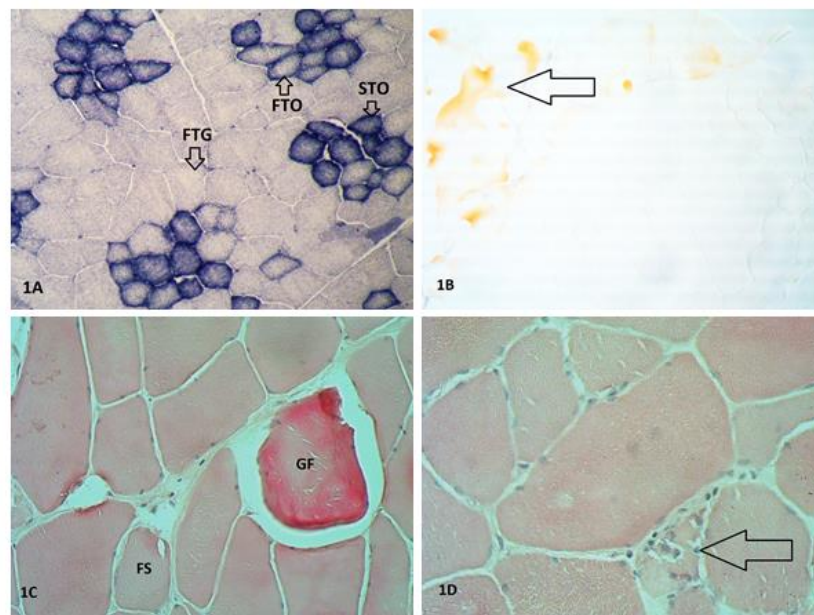


Figure 1. (A) muscle fiber types (group E1 + EM), NADH-TR tetrazolium reductase activity and myofibrillar ATP-ase activity stain, magnification $\times 125$; (B) intramuscular fat (arrow) (group E2), red oil stain, magnification 125 \times ; (C) giant fiber (GF) and fiber splitting (FS) (E1), haematoxylin and eosin (H&E) stain, magnification 250 \times ; (D) fiber necrosis (group C + EM) (arrow) (C + EM), H&E stain, magnification 400 \times .

This study did not find any influence of an EM Bokashi preparation on the proportion of properly built muscle cells or the occurrence of giant fibers and necrosis. Normal fibers were found in 95.95% of cases in the E1 group and in 98.27% in the E1 + EM group, which is consistent with the results from other researchers [47]. The most frequently observed pathological changes included giant fibers (Figure 1C) (from 1.10% in the E1 + EM group to 1.99% in the C group), which can be formed from any type of muscle fiber (STO, FTO, or FTG). According to Wojtysiak [54], their occurrence is dependent on nutrition, the handling of animals before slaughter, genetic conditions, and the breed—especially those with a high susceptibility to stress. The presence of giant fibers has a significant impact on the acidity and texture parameters of meat [54]. According to Górska and Wojtysiak [55], PSE turkey meat contributes to a significant increase in the occurrence of giant fibers in muscle tissue.

Degenerative changes causing the breakdown of muscle fibers (necrosis) are indicated by the appearance of histiocytes, lymphocytes, and macrophages (Figure 1D) [56]. In terms of fiber splitting, the results were inconclusive. Fiber splitting is one of the pathological changes caused by excessive cell overload. It is usually related to coarse fibers and results from hypoxia and low metabolite uptake [57]. The adverse effects of using effective microorganisms were observed in the C + EM control and E2 + EM experimental groups, where splitting was significantly higher (0.68% vs. 1.01% and 0.81% vs. 1.15%, respectively; $p < 0.05$) than in the control groups (Figure 1C). Differing, favourable results were reported in the experimental E1 group. Pigs from this group, fed with the addition of effective microorganisms, were characterized by a significantly lower percentage of fiber splitting (1.45% vs. 0.83%; $p < 0.05$). This is confirmed by previous research by Bogucka et al. [47], who also showed a significant beneficial effect adding a synbiotic to chickens' diet had on the percentage of split fibers. Despite the inconclusive results of Semenova et al. [58], they recommend the use of feed additives (selenium, vitamin E, flavonoids, etc.) in order to reduce the occurrence of pathological changes, which appears to be decisively linked with the quality of meat.

3.3. Percentage of Selected Muscle Fiber Proteins in Longissimus Lumborum Muscle

Table 5 shows the percentage of selected proteins in the *LL* muscle of pigs depending on the nutritional variant used.

Table 5. Percentage of muscle proteins in longissimus lumborum obtained through electrophoretic separation on polyacrylamide gels with SDS (SDS-PAGE).

Proteins Molecular Weight (kDa)	C		E1		E2	
	C	C + EM	E1	E1 + EM	E2	E2 + EM
3000–3700 titin	7.407 ± 0.428	7.385 ± 0.431	6.152* ± 0.836	5.785 ± 1.051	6.708 ± 1.173	6.832 ± 0.760
205 myosin and titin degradation products	18.118 ^a ± 0.385 <i>p</i> = 0.027	17.102 ^b ± 0.883 <i>p</i> = 0.027	17.118 ± 1.171	15.807 ± 1.789	18.060 ± 0.892	17.912 ± 2.195
105 alpha actinin	5.402 ± 1.75	6.022 ± 0.406	5.732 ± 1.654	5.365 ± 1.496	6.627 ± 0.624	6.382 ± 1.017
100–43(kDa)	6.070 ± 0.492	6.305 ± 0.896	6.112 ± 0.552	7.047 ± 0.905	6.588 ± 0.796	6.920 ± 0.578
42 actin	32.207 ± 3.048	31.270 ± 1.596	33.010 ± 2.380	33.885* ± 3.045	30.063 ± 2.294	30.002* ± 2.476
36 troponin-T	10.057 ± 0.790	10.783 ± 0.646	10.568 ^b ± 0.389 <i>p</i> = 0.015	11.172 ^a ± 1.296 <i>p</i> = 0.015	9.700 ± 1.196	9.918 ± 1.142
35- 18 including troponin-T degradation products	9.092 ± 0.877	9.287 ± 0.776	9.563 ± 0.727	9.525 ± 1.599	9.492 ± 2.204	9.392 ± 1.215
17 myoglobin	5.478 ± 2.378	5.282 ± 0.823	5.365 ± 0.936	5.4383 ± 1.189	6.110 ± 0.834	6.347 ± 1.513

Group C—standard diet based on post-extraction soya bean meal (100%); groups E1 and E2—in phase I of fattening, a feed mix with 50% soya bean and 50% pea and lupine was administered; group E1—in phase II of fattening a feed mix with 25% soya bean and 75% pea and lupine was administered; group E2—100% of soya bean protein was replaced with pea and lupine; experimental groups fed an additional probiotic in the diets (C + EM, E1 + EM, E2 + EM); ^{a, b} statistically significant differences between two experimental groups within specific nutritional systems at *p* ≤ 0.05; * statistically significant differences between the feeding systems (C vs. E1 vs. E2 and C + EM vs. E1 + EM vs. E2 + EM) at *p* ≤ 0.05; *p*-value for groups that differ statistically significantly within one feeding system.

Additionally, the electrophoreogram (Figure 2) shows six analyzed protein bands and two ranges in relation to the molecular weight of the standard used. The highest percentage, i.e., from 30% to 33.88%, was characteristic of proteins with a molecular weight of 42 kDa, while the lowest was for proteins with molecular weights of 17 and 105 kDa. Only in the case of proteins in the 3000–3700 kDa range and for the 42 kDa protein, a different feeding system turned out to be a factor determining their quantity. For most proteins, no statistically significant influence of EMs on the percentage of them in the muscle was noted (Table 5). The exceptions were proteins weighing 205 kDa (*p* < 0.05), which showed a significantly higher proportion in the C group compared to C + EM, and proteins with a weight of 36 kDa (*p* < 0.05) between the E1 control group and the E1 + EM experimental group. Results similar to those presented in the study, indicating an influence of supplementation on *LL* muscle protein changes in a lamb diet, were obtained by Malva et al. [59]: based on the protein profile, a decrease in myosin (MHC) after supplementation with quinoa and linseed was observed in their study, as well as a decrease in Tn-T with linseed supplementation. However, Adeyemi et al. [60] did not find any significant changes in the electrophoretic sections of goat meat using rapeseed and palm oil. The changes in the 205 kDa band suggest that supplementation may affect post-mortem degradation processes and may change the integrity of the actomyosin complex. On the other hand, a decrease in this protein type may indicate oxidation processes that may induce conformational and functional modifications of muscle proteins, including the activity of the calpain system, which are enzymes particularly susceptible to oxidation [61,62].

Due to the nature of the experiment conducted, the description of electrophoretic tests also includes statistically significant correlations between the percentage of proteins and the properties of meat quality and microstructure. The most statistically significant relationships (both positive and negative) were recorded between proteins and percentage fat content and percentage of FTO fibers (IIA), as well as some meat quality properties, such as color, pH₄₈, tenderness, and sirloin eye area. Such an interaction between characteristics results from intensive/multiplane chemical processes occurring in muscle tissue, which are often a consequence of these relationships. In relation to the proportion of FTO fibers, positive, statistically significant correlations (*p* < 0.05) were observed for proteins with molecular weights in the range of 100–43 kDa (*r* = 0.557), 36 kDa (*r* = 0.803), and 35–17 kDa

($r = 0.574$), which could be closely related to the aerobic and glycolytic properties of these fibers and their structure [63]. However, for the band with a weight of 17 kDa—indicated as myoglobin—the analysis of linear correlation showed a highly significant negative correlation with the percentage of FTO fibers ($r = -0.73$; $p < 0.05$). FTO fibers contain less myoglobin than STO fibers, which may explain this correlation. Even less of this protein is contained in FTG fibers, but in this case, despite an inversely proportional relationship between the characteristics under consideration, it was statistically insignificant. Muscles composed mainly of type II fast fibers are more susceptible to early post-mortem proteolytic degradation than muscles composed mainly of type I slow fibers [63]. A higher proportion of muscle fibers with a predominant glycolytic metabolism, as obtained in own research, certainly leads to higher levels of glycolytic enzymes. The increased release of myofibrillar proteins in meat into the soluble fraction may indicate more intense proteolysis [64]. The above information is very useful for explaining the relationship between the various parameters obtained in our own research. It is the tenderness, color, taste, and water absorption of the meat that are determined by the proteolytic processes taking place in the muscle tissue after slaughter (*post mortem*) and during meat storage. The proteolytic degradation of myofibrillar and cytoskeletal proteins plays an important role in determining meat tenderness, indicating structural changes in skeletal muscles [65]. In our own research, it is worth noting a negative, statistically significant correlation ($r = -0.634$; $p < 0.05$) between meat tenderness expressed in cutting force (N/cm^2) and proteins with a molecular mass between 35 and 18 kDa—corresponding to troponin-T degradation products, among others. Moreover, it is worth noting obtained in own research the relationship between the number and percentage of FTO fibers and proteins with a molecular mass of 105 kDa, whose weight corresponds to alpha-actinin ($r = -0.620$ and $r = -0.789$, respectively; $p < 0.05$). A higher percentage of type II fibers with a simultaneously lower concentration of proteins with a weight of 105 kDa which has been demonstrated in own research and less of the other important degradation products of myofibrillar and cytoskeletal proteins may indicate a less intense meat tenderization process [64,65]. As shown by Grześ et al. [65] the meat tenderization process of the longissimus muscle in pigs involves the degradation or release of muscle tissue proteins, in particular those with masses of 3700, 105, and 38 kDa, and a change in the proportion of centrifugal leakage fraction proteins in the 3700–2400 kDa and 38–36 kDa ranges. Troponin T and its degradation products appearing during storage are an indicator of the meat maturation and tenderization process. As a result of the degradation, the structure of the sarcomere is weakened, which may lead to better tenderness [66]. The relationship observed in our own research confirms the increase in tenderness (decrease in cutting force) of meat as the amount of these products increases.

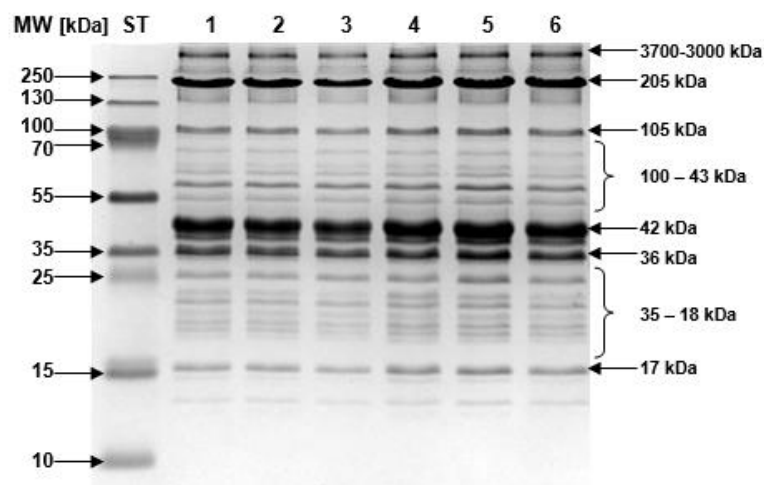


Figure 2. Comparison of distributions of muscle fiber protein types in longissimus lumborum: 1, 3, 5—control groups (C, E1, and E2, respectively); 2, 4, 6 experimental groups (C + EM, E1 + EM, and E2 + EM, respectively).

This study also revealed a positive correlation ($r = 0.629$; $p < 0.05$) between the 205 kDa band, which contained heavy MHC myosin chains, and the percentage of fat content. It should be emphasised that the composition of lipids is one of the main characteristics related to the quality of meat, and that it is influenced by the type of muscle fibers. However, unlike in our own research, these relationships between IMF intramuscular fat content and fatty acid composition and the presence of myosin isoforms in Cinta Senese pigs [67] were not demonstrated.

In addition, for fast twitch fibers in chickens, the proteins that make up the Z-line are more susceptible to early post-mortem proteolytic degradation than in slow twitch fibers [63,68].

4. Conclusions

In conclusion, the quality of meat was satisfactory in all groups of pigs examined. The beneficial effect of adding effective microorganisms (EMs) was found in nutritional variant II, where less thermal leakage from meat was found. Additionally, a beneficial effect of the different diet on less thermal leakage and larger loin eye area in the E2 experimental group was demonstrated. The addition of a probiotic to pigs' diet resulted in thicker muscle fibers, which was particularly evident in the case of the E1 + EM group, where a significant increase in the diameter of fast twitch fibers was noted. In the same group of pigs, EMs led to less fiber fission, which is a common lesion in fast-growing animals. Additionally, in terms of proteins, the above nutritional variant appears to be the most appropriate because it resulted in the most favorable percentage of the individual proteins after EM supplementation in the LL muscle.

Author Contributions: Conceptualization: P.R., and J.B.; methodology: P.R., H.J., D.C.-S., A.C., B.M., and J.B.; formal analysis: H.J., D.C.-S., and J.B.; investigation: P.R., D.C.-S., B.M., A.C., and J.B.; resources: A.C., D.C.-S., B.M., and J.B.; data curation: P.R., H.J., D.C.-S., and J.B.; writing—original draft preparation: P.R. and J.B.; writing—review and editing: P.R., H.J., D.C.-S., and J.B.; visualization: H.J., D.C.-S., and J.B.; supervision: J.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Ethics Approval: The use of animals was reviewed and approved by the local ethics committee for the animal experiments in Bydgoszcz (decision no. 24/2017).

References

1. Pisula, A.; Pospiech, E. *Meat—The Basics of Science and Technology*, 1st ed.; SGGW: Warsaw, Poland, 2011; pp. 15–21.
2. Baer, A.A.; Miller, M.J.; Dilger, A.C. Pathogens of Interest to the Pork Industry: A Review of Research on Interventions to Assure Food Safety. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2013**, *12*, 183–217. [[CrossRef](#)]
3. Jukna, Č.; Jukna, V.; Šimkus, A. The effect of probiotics and phytobiotics on meat properties and quality in pigs. *Vet. Med. Zoot.* **2005**, *29*, 80–84.
4. Suo, C.; Yin, Y.; Wang, X.; Lou, X.; Song, D.; Wang, X.; Gu, Q. Effects of *Lactobacillus plantarum* ZJ316 on pig growth and pork quality. *BMC Vet. Res.* **2012**, *8*, 89. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Meng, Q.W.; Yan, L.; Ao, X.; Zhou, T.X.; Wang, J.P.; Lee, J.H.; Kim, I.H. Influence of probiotics in different energy and nutrient density diets on growth performance, nutrient digestibility, meat quality, and blood characteristics in growing-finishing pigs. *J. Anim. Sci.* **2010**, *88*, 3320–3326. [[CrossRef](#)]
6. Migdał, W.; Wojtysiak, D.; Paściak, P. The Histochemical Profile of Fatteners' Muscles Depending on the Type of Muscles, Gender and Breed of Fatteners, Their Body Weight, and Feeding. *ZYWN Nauk. Technol. J. A* **2005**, *3*, 157–168. (In Polish)
7. Bogucka, J.; Kapelański, W. Microstructure of longissimus lumborum muscle and meat quality of native Polish pig breeds: Złotnicka Spotted and Puławska. *Ann. Anim. Sci.* **2016**, *16*, 1199–1210. [[CrossRef](#)]
8. Liu, Y.; Kong, X.; Jiang, G.; Tan, B.; Deng, J.; Yang, X.; Li, F.; Xiong, X.; Yin, Y. Effects of dietary protein/energy ratio on growth performance, carcass trait, meat quality, and plasma metabolites in pigs of different genotypes. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* **2015**, *6*, 36. [[CrossRef](#)]

9. Zhang, C.; Luo, J.; Yu, B.; Zheng, P.; Huang, Z.; Mao, X.; He, J.; Yu, J.; Chen, J.; Chen, D. Dietary resveratrol supplementation improves meat quality of finishing pigs through changing muscle fiber characteristics and antioxidative status. *Meat Sci.* **2015**, *102*, 15–21. [[CrossRef](#)]
10. Liao, F.S.; Nyachoti, M. Using probiotics to improve swine gut health and nutrient utilization. *Anim. Nutr.* **2017**, *3*, 331–343. [[CrossRef](#)]
11. Giliński, Z.; Grzegorzczak, K. Probiotics as immunostimulators in veterinary and human medicine. *Życie Wet.* **2017**, *92*, 871–875. (In Polish)
12. Laskowski, E.; Jarosz, Ł.; Grądzki, Z. Effect of Multi-Microbial Probiotic Formulation Bokashi on Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines Profile in the Serum, Colostrum and Milk of Sows, and in a Culture of Polymorphonuclear Cells Isolated from Colostrum. *Probiotics Antimicrob. Proteins* **2019**, *11*, 220–232.
13. Jerzak, M.A.; Czerwińska-Kayzer, D.; Florek, J.; Śmiglak-Krajewska, M. Determinants for the Production of Legumes as an Alternative Source of Protein in the New Area of Agricultural Policy within Poland. *Rocz. Nauk Rol.* **2012**, *99*, 113–120. (In Polish)
14. Reszka, P.; Dunisławska, A.; Sławinska, A.; Siwek, M.; Kapelanski, W.; Bogucka, J. Influence of the effective microorganisms (em) on performance, intestinal morphology, and gene expression in the jejunal mucosa of pigs fed different diets. *J. Anim Physiol An.* **2020**, *104*, 1–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Grau, R.; Hamm, R. Eine einfache Methode zur Bestimmung der Wasserbindung im Fleisch. *Fleischwirtschaft* **1952**, *4*, 295–297.
16. Pohja, M.S.; Niinivaara, F.P. Die Bestimmung der Wasserbindung des Fleisches mittels der Konstantdruckmethode. *Fleischwirtschaft* **1957**, *9*, 193–195.
17. Walczak, Z. Laboratory method for determining the content of jelly in canned meat. *Rocz. Nauk Rol.* **1959**, *74*, 619–626.
18. CIE. *Colorimetry, Publication CIE 15.2*, 2nd ed.; CIE: Vienna, Austria, 1986.
19. Cheng, W.; Cheng, J.H.; Sun, D.W.; Pu, H. Marbling Analysis for Evaluating Meat Quality: Methods and Techniques. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2015**, *14*, 523–535.
20. NPPC (National Pork Producers Council). *NPPC Marbling Standards*; NPPC: Des Moines, IA, USA, 1999.
21. Szalata, M.; Pospiech, E.; Łyczyński, A.; Urbaniak, M.; Frankiewicz, A.; Mikołajczak, B.; Medyński, A.; Rzosnińska, E.; Bartkowiak, Z.; Danyluk, B. Tenderness of meat from pigs of various quality. *Rocz. Inst. Przem. Mięsnego Thuszcz.* **1999**, *36*, 61–76.
22. Ziegan, J. Kombinationen enzymhistochemischer Methoden zur Fasertypendifferenzierung und Beurteilung der Skelettmuskulatur. *Acta Histochem.* **1979**, *65*, 34–40.
23. Dubovitz, W.; Brooke, M.; Neville, H.E. *Muscle Biopsy: A Modern Approach*; W. B. Saunders Company LTD London: Toronto, ON, Canada, 1973.
24. Brooke, M.H. Some comments on neural influence on the two histochemical types of muscle fibres. In *Physiology and Biochemistry on Muscle as a Food*; Briskey, E.J., Cassens, R.G., Marsh, B.B., Eds.; University of Wisconsin: Madison, WI, USA, 1970; p. 131.
25. Fritz, J.D.; Greaser, M.L. Changes in titin and nebulin in postmortem bovine muscle revealed by gel-electrophoresis, western blotting and immunofluorescence microscopy. *J. Food Sci.* **1991**, *56*, 607–610. [[CrossRef](#)]
26. Rybarczyk, A.; Romanowski, M.; Karamucki, T.; Ligocki, M. The effect of Bokashi probiotic on pig carcass characteristics and meat quality. *Fleischwirtsch. Int.* **2016**, *31*, 74–77.
27. Yang, X.; Zhang, B.; Guo, Y.; Jiao, P.; Long, F. Effects of dietary lipids and *Clostridium butyricum* on fat deposition and meat quality of broiler chickens. *Poult Sci.* **2010**, *89*, 254–260. [[PubMed](#)]
28. Chang, S.Y.; Belal, A.A.; Kang, A.R.; Choi, Y.I.; Kim, Y.H.; Choe, H.S.; Heo, J.Y.; Shim, K.S. Influence of Probiotics-Friendly Pig Production on Meat Quality and Physicochemical Characteristics. *Korean J. Food Sci. Anim. Resour.* **2018**, *38*, 403–416. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Dowarah, R.; Verma, A.K.; Agarwal, N.; Singh, P. Efficacy of species-specific probiotic *Pediococcus acidilactici* FT28 on blood biochemical profile, carcass traits and physicochemical properties of meat in fattening pigs. *Res. Vet. Sci.* **2018**, *117*, 60–64. [[CrossRef](#)]
30. Cebulska, A.; Václavková, E.; Bocian, M.; Dybała, J.; Wiśniewska, A.; Kapelański, W. Quality and dietary value of pork meat of the Puławska and Złotnicka Spotted breeds, and commercial fattening pigs. *Ann. Anim. Sci.* **2018**, *18*, 281–291. [[CrossRef](#)]

31. Bogucka, J.; Kapelański, W. Microstructure of longissimus lumborum Muscle in Pigs of several Breeds and Its Relation to Meat Quality Traits. *Folia Biol.* **2005**, *53*, 85–90. [[CrossRef](#)]
32. Bocian, M.; Kapelański, W.; Adamowicz, M.; Jankowiak, H.; Cebulska, A.; Gimińska, A.; Mońko, A. Influence of nutrition of pigs with legume-enriched mixtures on the quality of pork. *Nauka Przyr. Technol.* **2016**, *10*, 46. [[CrossRef](#)]
33. Zmudzińska, A.; Bigorowski, B.; Banaszak, M.; Roślewska, A.; Adamski, M.; Hejdysz, M. The Effect of diet based on legume seeds and rapeseed meal on pig performance and meat quality. *Animals* **2020**, *10*, 1084.
34. Zaworska-Zakrzewska, A.; Kasprowicz-Potocka, M.; Wiśniewska, Z.; Rutkowski, A.; Hejdysz, M.; Kaczmarek, S.; Nowak, P.; Zmudzińska, A.; Banaszak, M. The chemical composition of domestic soybean seeds and the effects of partial substitution of soybean meal by raw soybean seeds in the diet on pigs' growth performance and pork quality (m. longissimus lumborum)*. *Ann. Anim. Sci.* **2020**, *20*, 521–533. [[CrossRef](#)]
35. Balasubramanian, B.; Lee, S.I.; Kim, I.H. Inclusion of dietary multi-species probiotic on growth performance, nutrient digestibility, meat quality traits, faecal microbiota and diarrhoea score in growing–finishing pigs. *Ital. J. Anim. Sci.* **2017**, *17*, 100–106. [[CrossRef](#)]
36. Bocian, M.; Jankowiak, H.; Kapelański, W.; Reszka, P.; Szafrńska, M. Results of pork meat quality assessment in relation to its tenderness. *Post. Nauk. Technol. Przem. Rol. Spoż.* **2017**, *72*, 5–14. (In Polish)
37. Liu, T.Y.; Su, B.C.; Wang, J.L.; Zhang, C.; Shan, A.S. Effects of probiotics on growth, pork quality and serum metabolites in growing–finishing pigs. *J. Northeast Agric. Univ.* **2013**, *20*, 57–63. [[CrossRef](#)]
38. Balasubramanian, B.; Li, T.; Kim, W.H. Effects of supplementing growing–finishing pig diets with *Bacillus* spp. probiotic on growth performance and meat-carcass grade quality traits. *R. Bras. Zootec.* **2016**, *45*, 93–100. [[CrossRef](#)]
39. Listrat, A.; Lebret, B.; Louveau, I.; Astruc, T.; Bonnet, M.; Lefaucheur, I.; Picard, B.; Bugeon, J. How Muscle Structure and Composition Influence Meat and Flesh Quality. *Sci. World J.* **2016**, *16*, 14. [[CrossRef](#)]
40. Lebedová, N.; Okrouhlá, M.; Zadinová, K.; Čítek, Z.; Stupka, R. Muscle fibre composition and meat quality in pigs with different nutrition level. In Proceedings of the IOP Conference Series: Materials Science and Engineering, 2nd Nommensen International Conference on Technology and Engineering, Medan, Indonesia, 19–20 July 2018.
41. Brzobohatý, L.; Stupka, R.; Čítek, J.; Šprysl, M.; Okrouhlá, M.; Vehovský, K.; Kluzáková, E. The effects of different nutrient composition in the feed on the muscle fibers typology in pigs. *Res. Pig Breed.* **2013**, *7*, 7–11.
42. Zhou, Y.; Ruan, Z.; Li, X.L.; Mi, S.M.; Jiang, M.; Liu, W.H.; Yang, H.S.; Wu, X.; Jiang, G.L.; Yin, Y.L. *Eucommia ulmoides* Oliver leaf polyphenol supplementation improves meat quality and regulates myofiber type in finishing pigs. *J. Anim. Sci.* **2016**, *94*, 164–168. [[CrossRef](#)]
43. Muqader, S. Single or Combined Effect of Zinc and Probiotics on Gut Morphology, Muscle and Hematological Parameters of Healthy and Heat Stressed Broiler Chicken. Ph.D. Thesis, University of Veterinary and Animal Sciences, Lahore, Pakistan, 2018.
44. Zhou, X.; Jin, E.; Li, S.; Wang, C.; Qiao, E.; Wu, G. Effects of dietary supplementation of probiotics (*Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, and *Bacillus natto*) on broiler muscle development and meat quality. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* **2015**, *39*, 203–210. [[CrossRef](#)]
45. Jin, E.; Hu, Q.; Ren, M.; Jin, G.; Liang, L.; Li, S. Effects of Selenium Yeast in Combination with Boron on Muscle Growth and Muscle Quality in Broilers. *Biol. Trace Elem. Res.* **2019**, *190*, 472–483. [[CrossRef](#)]
46. Bogucka, J.; Poławska, E.; Elminowska-Wenda, G.; Raj, S.; Sobolewska, A.; Walasik, K.; Skiba, G.; Weremko, D.; Fandrejowski, H. Effect of nutritional regulation of growth on histochemical characteristics of muscles in pigs. *Acta Agric. Scand. Sec. A* **2013**, *63*, 10–17. [[CrossRef](#)]
47. Bogucka, J.; Ribeiro, D.M.; Costa, R.P.R.; Bednarczyk, M. Effect of synbiotic dietary supplementation on histological and histopathological parameters of *Pectoralis major* muscle of broiler chickens. *Czech J. Anim. Sci.* **2018**, *63*, 263–271. [[CrossRef](#)]
48. Skiba, G.; Raj, S.; Poławska, E.; Pastuszewska, B.; Elminowska-Wenda, G.; Bogucka, J.; Knecht, D. Profile of fatty acids, muscle structure and shear force of musculus *longissimus dorsi* (MLD) in growing pigs as affected by energy and protein or protein restriction followed by realimentation. *Meat Sci.* **2012**, *91*, 339–346. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Brzobohatý, L.; Stupka, R.; Čítek, J.; Šprysl, M.; Okrouhlá, M.; Vehovský, K. The influence of controlled nutrition intensity on the muscle fiber characteristics in fattening pigs. *J. Cent. Eur. Agric.* **2015**, *16*, 92–99. [[CrossRef](#)]

50. Fiedorowicz-Szatkowska, E.; Sobotka, W.; Stanek, M. Fattening performance and the nutritional value of meat from finishing pigs fed diets containing different sources of vegetable protein. *J. Elem.* **2017**, *22*, 1235–1242.
51. Madera, M.S.; Lopes, P.; Costa, P.J.; Coelho, D.R.; Alfaia, C.M.; Prates, J.A.M. Reduced protein diets increase intramuscular fat of psoas major, a red muscle, in lean and fatty pig genotypes. *Animals* **2017**, *11*, 2094–2102. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Lopez, P.A.; Costa, A.S.H.; Costa, P.; Pires, V.M.R.; Madeira, M.S.; Achega, F.; Pinto, R.M.A.; Prates, J.A.M. Contrasting cellularity on fat deposition in the subcutaneous adipose tissue and *longissimus lumborum* muscle from lean and fat pigs under dietary protein reduction. *Animals* **2014**, *8*, 629–637. [[CrossRef](#)]
53. Olivares, A.; Daza, A.; Rey, A.I.; Lopez-Bote, C.J. Interactions between genotype, dietary fat saturation and vitamin A concentration on intramuscular fat content and fatty acid composition in pigs. *Meat Sci.* **2009**, *82*, 6–12. [[CrossRef](#)]
54. Wojtysiak, D. Pathological Changes in the Microstructure of longissimus lumborum Muscle from Five Breeds of Pigs. *Folia Biol.* **2012**, *60*, 55–60. [[CrossRef](#)]
55. Górska, M.; Wojtysiak, D. Pathological Changes in the Microstructure of Pale, Soft, Exudative (PSE) and Normal Turkey Breast Muscle. *Folia Biol.* **2017**, *65*, 148–153. [[CrossRef](#)]
56. Bogucka, J.; Elminowska-Wenda, G.; Walasik, K.; Kapelański, W. Incidence of histopathological changes in longissimus lumborum muscle of wild boar-domestic pig hybrids. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* **2007**, *57*, 49–52.
57. Makovický, P.; Makovický, P. Histological Aspects of Skeletal Muscle Fibers Splitting of C57BL/6NCrl Mice. *Physiol. Res.* **2020**, *69*, 291–296. [[CrossRef](#)]
58. Semenova, A.A.; Kuznetsova, T.G.; Nasonova, V.V.; Nekrasov, R.V.; Bogolyubova, N.V. Myopathy as a destabilizing factor of meat quality formation. *Theory Pr. Meat Proc.* **2019**, *4*, 24–31. [[CrossRef](#)]
59. Malva, A.; Marino, R.; Santillo, A.; Annicchiarico, G.; Caroprese, M.; Sevi, A.; Albenzio, M. Proteomic approach to investigate the impact of different dietary supplementation on lamb meat tenderness. *Meat Sci.* **2017**, *131*, 74–81. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Adeyemi, K.D.; Sabow, A.B.; Shittu, R.M.; Karim, R.; Sazili, A. Influence of dietary canola oil and palm oil blend and refrigerated storage on fatty acids, myofibrillar proteins, chemical composition, antioxidant profile and quality attributes of semimembranosus muscle in goats. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* **2015**, *6*, 51. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Huff-Lonergan, E.; Zhang, W.G.; Lonergan, S.M. Biochemistry of postmortem muscle- lessons on mechanisms of meat tenderization. *Meat Sci.* **2010**, *86*, 184–195. [[CrossRef](#)]
62. Zhang, W.G.; Xiao, S.; Ahn, D.U. Protein oxidation: Basic principles and implications for meat quality. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2013**, *53*, 1191–1201. [[CrossRef](#)]
63. Lee, S.H.; Joo, S.T.; Ryu, Y.C. Skeletal muscle fiber type and myofibrillar proteins in relation to meat quality. *Meat Sci.* **2010**, *86*, 166–170. [[CrossRef](#)]
64. Marino, R.; Albenzio, M.; della Malva, A.; Caroprese, M.; Santillo, A. Changes in meat quality traits and sarcoplasmic proteins during aging in three different cattle breeds. *Meat Sci.* **2014**, *54*, 187–196.
65. Grześ, B.; Pospiech, E.; Iwańska, E.; Mikołajczak, B.; Łyczyński, A.; Koćwin-Podsiadła, M.; Krzęcio-Niczyporuk, E. The relationship between protein changes in porcine longissimus muscle at different courses of meat tenderisation. *Eur. Food Res. Technol.* **2017**, *243*, 2025–2034. [[CrossRef](#)]
66. Iwańska, E.; Mikołajczak, B.; Grześ, B.; Pospiech, E. Impact of post mortem aging of pork on changes in the isoelectric point of the proteins and tenderness. *Med. Weter* **2016**, *72*, 458–462. (In Polish)
67. Velotto, S.; Ashkezary, M.R.; de Camillis, D.; Todaro, A. Myosin heavy chain isoforms, fatty acid composition, sensory evaluation and quality of cinta senese pig meat. *Ital. J. Food Sci.* **2018**, *30*, 650–661.
68. Choi, Y.M.; Kim, B.C. Muscle fiber characteristics, myofibrillar protein isoforms, and meat quality. *Livest. Sci.* **2009**, *122*, 105–118. [[CrossRef](#)]



6.2. OŚWIADCZENIE AUTORA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Z.41.2020.2021

Załącznik nr 2a do
Instrukcji drukowania, gromadzenia, rejestrowania i
udostępniania rozpraw doktorskich przez rady naukowe
dyscyplin (dyscyplin artystycznych) prowadzących postępowanie
w sprawie nadania stopnia doktora

Oświadczenie Autora rozprawy doktorskiej

mgr inż. Patrycja Reszka

.....
(tytuł zawodowy, imiona i nazwisko autora rozprawy doktorskiej)

Politechnika Bydgoska

im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich

Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt,

Katedra Fizjologii Zwierząt i Zoofizjoterapii

ul. Mazowiecka 28, 85-084 Bydgoszcz

.....
(miejsce pracy/afiliacja)

OŚWIADCZENIE

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

1. Reszka, P.; Dunisławska, A.; Sławińska, A.; Siwek, M.; Kapelański, W.; Bogucka, J. Influence of the effective microorganisms (em) on performance, intestinal morphology, and gene expression in the jejunal mucosa of pigs fed different diets. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 2020, 104, 5, 1444-1453, DOI: 10.1111/jpn.13404, 100 pkt. MNiSW, IF 1,597.

Współdział w opracowaniu koncepcji publikacji, analizie statystycznej uzyskanych danych oraz korekcie manuskryptu; analiza histologiczna preparatów mikroskopowych, przygotowanie manuskryptu, tabel i rycin, co stanowi 55% indywidualnego udziału w przygotowaniu wyżej wymienionej publikacji.

2. Reszka, P.; Cygan-Szczegielniak, D.; Jankowiak, H.; Cebulska, A.; Mikołajczak, B.; Bogucka, J. Effects of Effective Microorganisms on Meat Quality, Microstructure of the Longissimus Lumborum Muscle, and Electrophoretic Protein Separation in Pigs Fed on Different Diets. *Animals* 2020, 10, 10, 1755, DOI: 10.3390/ani10101755, 100 pkt. MNiSW, IF 2,323.

* W przypadku prac dwu- lub wieloautorskich wymagane są oświadczenia kandydata do stopnia doktora oraz współautorów, wskazujące na ich merytoryczny wkład w powstanie każdej pracy (np. twórca hipotezy badawczej, pomysłodawca badań, wykonanie specyficznych badań – np. przeprowadzenie konkretnych doświadczeń, opracowanie i zebranie ankiet itp., wykonanie analizy wyników, przygotowanie manuskryptu artykułu i inne). Określenie wkładu danego autora, w tym kandydata do stopnia doktora, powinno być na tyle precyzyjne, aby umożliwić dokładną ocenę jego udziału i roli w powstaniu każdej pracy.

Z.41.2020.2021

Załącznik nr 2a do
Instrukcji drukowania, gromadzenia, rejestrowania i
udostępniania rozpraw doktorskich przez rady naukowe
dyscyplin (dyscyplin artystycznych) prowadzących postępowanie
w sprawie nadania stopnia doktora

Współudział w opracowaniu koncepcji publikacji, analizie laboratoryjnej w zakresie jakości mięsa, analizie statystycznej uzyskanych danych oraz korekcie manuskryptu; analiza mikrostruktury mięśnia, przygotowanie manuskryptu, tabel i rycin oraz pełnienie funkcji autora korespondencyjnego w trakcie przetwarzania manuskryptu, co stanowi 60% indywidualnego udziału w przygotowaniu wyżej wymienionej publikacji.

Bydgoszcz, 17-09-2021r.
.....
miejsowość, data

Patrycja Reszka
.....
Podpis Autora rozprawy doktorskiej

Popuche
.....
Podpis promotora

6.3. OŚWIADCZENIA WSPÓLAUTORÓW ARTYKUŁÓW NAUKOWYCH

Z.41.2020.2021

Załącznik nr 2a do
Instrukcji drukowania, gromadzenia, rejestrowania i
udostępniania rozpraw doktorskich przez rady naukowe
dyscyplin (dyscyplin artystycznych) prowadzących postępowanie
w sprawie nadania stopnia doktora

Oświadczenie Współautora

dr inż. Aleksandra Dunisławska

.....
(tytuł zawodowy, imiona i nazwisko współautora)

Politechnika Bydgoska
im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich
Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt,
Katedra Biotechnologii i Genetyki Zwierząt
ul. Mazowiecka 28, 85-084 Bydgoszcz

.....
(miejsce pracy/afiliacja)

OŚWIADCZENIE

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

1. Reszka, P.; Dunisławska, A.; Sławińska, A.; Siwek, M.; Kapelański, W.; Bogucka, J. Influence of the effective microorganisms (em) on performance, intestinal morphology, and gene expression in the jejunal mucosa of pigs fed different diets. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition 2020, 104, 5, 1444-1453, DOI: 10.1111/jpn.13404, 100 pkt. MNiSW, IF 1,597.

Współdział w opracowaniu metodologii w zakresie analizy ekspresji genów, analizie laboratoryjnej ekspresji genów oraz analizie statystycznej uzyskanych danych, co stanowi 10% indywidualnego udziału w przygotowaniu wyżej wymienionej publikacji.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie wyżej wymienionej/wymienionych pracy/prac przez mgr inż. Patrycję Reszka jako część rozprawy doktorskiej opartej na zbiorze opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych.

Bydgoszcz, 15.09.21
.....
miejsce, data

Dunisławska
.....
Podpis współautora artykułu naukowego

* W przypadku prac dwu- lub wieloautorskich wymagane są oświadczenia kandydata do stopnia doktora oraz współautorów, wskazujące na ich merytoryczny wkład w powstanie każdej pracy (np. twórca hipotezy badawczej, pomysłodawca badań, wykonanie specyficznych badań – np. przeprowadzenie konkretnych doświadczeń, opracowanie i zebranie ankiet itp., wykonanie analizy wyników, przygotowanie manuskryptu artykułu i inne). Określenie wkładu danego autora, w tym kandydata do stopnia doktora, powinno być na tyle precyzyjne, aby umożliwić dokładną ocenę jego udziału i roli w powstaniu każdej pracy.

Oświadczenie Współautora

dr hab. inż. Anna Sławińska, prof. PBS

.....
(tytuł zawodowy, imiona i nazwisko współautora)

Politechnika Bydgoska
im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich
Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt,
Katedra Biotechnologii i Genetyki Zwierząt
ul. Mazowiecka 28, 85-084 Bydgoszcz

.....
(miejsce pracy/afiliacja)

OŚWIADCZENIE

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

1. Reszka, P.; Dunisławska, A.; Sławińska, A.; Siwek, M.; Kapelański, W.; Bogucka, J. Influence of the effective microorganisms (em) on performance, intestinal morphology, and gene expression in the jejunal mucosa of pigs fed different diets. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition 2020, 104, 5, 1444-1453, DOI: 10.1111/jpn.13404, 100 pkt. MNiSW, IF 1,597.

Współudział w opracowaniu metodologii w zakresie analizy ekspresji genów, analizie laboratoryjnej ekspresji genów, analizie statystycznej uzyskanych danych oraz korekcie manuskryptu, co stanowi 10% indywidualnego udziału w przygotowaniu wyżej wymienionej publikacji.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie wyżej wymienionej/wymienionych pracy/prac przez mgr inż. Patrycję Reszka jako część rozprawy doktorskiej opartej na zbiorze opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych.

Bydgoszcz, 13.09.2021.
.....
miejsceowość, data


.....
Podpis współautora artykułu naukowego

* W przypadku prac dwu- lub wieloautorskich wymagane są oświadczenia kandydata do stopnia doktora oraz współautorów, wskazujące na ich merytoryczny wkład w powstanie każdej pracy (np. twórca hipotezy badawczej, pomysłodawca badań, wykonanie specyficznych badań – np. przeprowadzenie konkretnych doświadczeń, opracowanie i zebranie ankiet itp., wykonanie analizy wyników, przygotowanie manuskryptu artykułu i inne). Określenie wkładu danego autora, w tym kandydata do stopnia doktora, powinno być na tyle precyzyjne, aby umożliwić dokładną ocenę jego udziału i roli w powstaniu każdej pracy.

Oświadczenie Współautora

prof. dr hab. inż. Maria Siwek

.....
(tytuł zawodowy, imiona i nazwisko współautora)

Politechnika Bydgoska
im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich
Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt,
Katedra Biotechnologii i Genetyki Zwierząt
ul. Mazowiecka 28, 85-084 Bydgoszcz

.....
(miejsce pracy/afiliacja)

OŚWIADCZENIE

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

1. Reszka, P.; Dunisławska, A.; Sławińska, A.; Siwek, M.; Kapelański, W.; Bogucka, J. Influence of the effective microorganisms (em) on performance, intestinal morphology, and gene expression in the jejunal mucosa of pigs fed different diets. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition 2020, 104, 5, 1444-1453, DOI: 10.1111/jpn.13404, 100 pkt. MNiSW, IF 1,597.

Współdział w opracowaniu koncepcji publikacji, metodologii w zakresie analizy ekspresji genów, analizie statystycznej uzyskanych danych oraz korekcie manuskryptu, co stanowi 10% indywidualnego udziału w przygotowaniu wyżej wymienionej publikacji.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie wyżej wymienionej/wymienionych pracy/prac przez mgr inż. Patrycję Reszka jako część rozprawy doktorskiej opartej na zbiorze opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych.

Bydgoszcz, 21.08.21
.....
miejsowość, data

.....
Podpis współautora artykułu naukowego

* W przypadku prac dwu- lub wieloautorskich wymagane są oświadczenia kandydata do stopnia doktora oraz współautorów, wskazujące na ich merytoryczny wkład w powstanie każdej pracy (np. twórca hipotezy badawczej, pomysłodawca badań, wykonanie specyficznych badań – np. przeprowadzenie konkretnych doświadczeń, opracowanie i zebranie ankiet itp., wykonanie analizy wyników, przygotowanie manuskryptu artykułu i inne). Określenie wkładu danego autora, w tym kandydata do stopnia doktora, powinno być na tyle precyzyjne, aby umożliwić dokładną ocenę jego udziału i roli w powstaniu każdej pracy.

Oświadczenie Współautora

prof. dr hab. inż. Wojciech Kapelański

.....
(tytuł zawodowy, imiona i nazwisko współautora)

Politechnika Bydgoska
im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich
Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt,
Katedra Hodowli i Żywienia Zwierząt
ul. Mazowiecka 28, 85-084 Bydgoszcz

.....
(miejsce pracy/afiliacja)

OŚWIADCZENIE

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

1. Reszka, P.; Dunisławska, A.; Sławińska, A.; Siwek, M.; Kapelański, W.; Bogucka, J. Influence of the effective microorganisms (em) on performance, intestinal morphology, and gene expression in the jejunal mucosa of pigs fed different diets. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition 2020, 104, 5, 1444-1453, DOI: 10.1111/jpn.13404, 100 pkt. MNiSW, IF 1,597.

Współdział w opracowaniu koncepcji publikacji; opracowanie metodologii w zakresie utrzymania i żywienia zwierząt oraz pozyskanie materiału do badań, co stanowi 5% indywidualnego udziału w przygotowaniu wyżej wymienionej publikacji.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie wyżej wymienionej/wymienionych pracy/prac przez mgr inż. Patrycję Reszka jako część rozprawy doktorskiej opartej na zbiorze opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych.

Bydgoszcz, 14.09.2021
.....
miejscowość, data

Wojciech Kapelański
.....
Podpis współautora artykułu naukowego

* W przypadku prac dwu- lub wieloautorskich wymagane są oświadczenia kandydata do stopnia doktora oraz współautorów, wskazujące na ich merytoryczny wkład w powstanie każdej pracy (np. twórca hipotezy badawczej, pomysłodawca badań, wykonanie specyficznych badań – np. przeprowadzenie konkretnych doświadczeń, opracowanie i zebranie ankiet itp., wykonanie analizy wyników, przygotowanie manuskryptu artykułu i inne). Określenie wkładu danego autora, w tym kandydata do stopnia doktora, powinno być na tyle precyzyjne, aby umożliwić dokładną ocenę jego udziału i roli w powstaniu każdej pracy.

Oświadczenie Współautora

dr hab. inż. Joanna Bogucka, prof. PBŚ

.....
(tytuł zawodowy, imiona i nazwisko współautora)

Politechnika Bydgoska
im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich
Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt,
Katedra Fizjologii Zwierząt i Zoofizjoterapii
ul. Mazowiecka 28, 85-084 Bydgoszcz

.....
(miejsce pracy/afiliacja)

OŚWIADCZENIE

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

1. Reszka, P.; Dunisławska, A.; Sławińska, A.; Siwek, M.; Kapelański, W.; Bogucka, J. Influence of the effective microorganisms (em) on performance, intestinal morphology, and gene expression in the jejunal mucosa of pigs fed different diets. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 2020, 104, 5, 1444-1453, DOI: 10.1111/jpn.13404, 100 pkt. MNiSW, IF 1,597.

Współdział w opracowaniu koncepcji publikacji, metodologii w zakresie analizy histologicznej jelita czczego, analizie statystycznej uzyskanych danych i korekcie manuskryptu oraz opieka naukowa, co stanowi 10% indywidualnego udziału w przygotowaniu wyżej wymienionej publikacji.

2. Reszka, P.; Cygan-Szczegieliński, D.; Jankowiak, H.; Cebulska, A.; Mikołajczak, B.; Bogucka, J. Effects of Effective Microorganisms on Meat Quality, Microstructure of the Longissimus Lumborum Muscle, and Electrophoretic Protein Separation in Pigs Fed on Different Diets. *Animals* 2020, 10, 10, 1755, DOI: 10.3390/ani10101755, 100 pkt. MNiSW, IF 2,323

Współdział w opracowaniu koncepcji publikacji i metodologii w zakresie analizy mikrostruktury mięśnia, analizie statystycznej uzyskanych danych i korekcie manuskryptu oraz opieka naukowa, co stanowi 10% indywidualnego udziału w przygotowaniu wyżej wymienionej publikacji.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie wyżej wymienionej/wymienionych pracy/prac przez mgr inż. Patrycję Reszka jako część rozprawy doktorskiej opartej na zbiorze opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych.

Bydgoszcz, 17.09.2021r.
.....
miejscowość, data

Bogucka
.....
Podpis współautora artykułu naukowego

* W przypadku prac dwu- lub wieloautorskich wymagane są oświadczenia kandydata do stopnia doktora oraz współautorów, wskazujące na ich merytoryczny wkład w powstanie każdej pracy (np. twórca hipotezy badawczej, pomysłodawca badań, wykonanie specyficznych badań – np. przeprowadzenie konkretnych doświadczeń, opracowanie i zebranie ankiet itp., wykonanie analizy wyników, przygotowanie manuskryptu artykułu i inne). Określenie wkładu danego autora, w tym kandydata do stopnia doktora, powinno być na tyle precyzyjne, aby umożliwić dokładną ocenę jego udziału i roli w powstaniu każdej pracy.

Oświadczenie Współautora

dr inż. Dorota Cygan-Szczegieliński

.....
(tytuł zawodowy, imiona i nazwisko współautora)

Politechnika Bydgoska
im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich
Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt,
Katedra Fizjologii Zwierząt i Zoofizjoterapii
ul. Mazowiecka 28, 85-084 Bydgoszcz

.....
(miejsce pracy/afiliacja)

OŚWIADCZENIE

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

1. Reszka, P.; Cygan-Szczegieliński, D.; Jankowiak, H.; Cebulska, A.; Mikołajczak, B.; Bogucka, J. Effects of Effective Microorganisms on Meat Quality, Microstructure of the Longissimus Lumborum Muscle, and Electrophoretic Protein Separation in Pigs Fed on Different Diets. *Animals* 2020, 10, 10, 1755, DOI: 10.3390/ani10101755, 100 pkt. MNiSW, IF 2,323

Współdział w opracowaniu metodologii i analizie laboratoryjnej w zakresie elektroforetycznego rozdzielania białek, analizie statystycznej uzyskanych danych oraz korekcie manuskryptu, co stanowi 10% indywidualnego udziału w przygotowaniu wyżej wymienionej publikacji.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie wyżej wymienionej/wymienionych pracy/prac przez mgr inż. Patrycję Reszka jako część rozprawy doktorskiej opartej na zbiorze opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych.

Bydgoszcz, dnia 26.09.2021
.....
miejsce, data

Cygan-Szczegieliński D.
.....
Podpis współautora artykułu naukowego

* W przypadku prac dwu- lub wieloautorskich wymagane są oświadczenia kandydata do stopnia doktora oraz współautorów, wskazujące na ich merytoryczny wkład w powstanie każdej pracy (np. twórca hipotezy badawczej, pomysłodawca badań, wykonanie specyficznych badań – np. przeprowadzenie konkretnych doświadczeń, opracowanie i zebranie ankiet itp., wykonanie analizy wyników, przygotowanie manuskryptu artykułu i inne). Określenie wkładu danego autora, w tym kandydata do stopnia doktora, powinno być na tyle precyzyjne, aby umożliwić dokładną ocenę jego udziału i roli w powstaniu każdej pracy.

Oświadczenie Współautora

dr hab. inż. Hanna Jankowiak, prof. PBŚ

.....
(tytuł zawodowy, imiona i nazwisko współautora)

Politechnika Bydgoska
im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich
Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt,
Katedra Hodowli i Żywienia Zwierząt
ul. Mazowiecka 28, 85-084 Bydgoszcz

.....
(miejsce pracy/afiliacja)

OŚWIADCZENIE

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

1. Reszka, P.; Cygan-Szczegielniak, D.; Jankowiak, H.; Cebulska, A.; Mikołajczak, B.; Bogucka, J. Effects of Effective Microorganisms on Meat Quality, Microstructure of the Longissimus Lumborum Muscle, and Electrophoretic Protein Separation in Pigs Fed on Different Diets. *Animals* 2020, 10, 10, 1755, DOI: 10.3390/ani10101755, 100 pkt. MNiSW, IF 2,323

Współudział w opracowaniu koncepcji publikacji, opracowaniu metodologii w zakresie jakości mięsa oraz korekcie manuskryptu, co stanowi 10% indywidualnego udziału w przygotowaniu wyżej wymienionej publikacji.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie wyżej wymienionej/wymienionych pracy/prac przez mgr inż. Patrycję Reszka jako część rozprawy doktorskiej opartej na zbiorze opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych.

Bydgoszcz, 13.09.2021r.
.....
miejsce, data

Hanna Jankowiak
.....
Podpis współautora artykułu naukowego

* W przypadku prac dwu- lub wieloautorskich wymagane są oświadczenia kandydata do stopnia doktora oraz współautorów, wskazujące na ich merytoryczny wkład w powstanie każdej pracy (np. twórca hipotezy badawczej, pomysłodawca badań, wykonanie specyficznych badań – np. przeprowadzenie konkretnych doświadczeń, opracowanie i zebranie ankiet itp., wykonanie analizy wyników, przygotowanie manuskryptu artykułu i inne). Określenie wkładu danego autora, w tym kandydata do stopnia doktora, powinno być na tyle precyzyjne, aby umożliwić dokładną ocenę jego udziału i roli w powstaniu każdej pracy.

Oświadczenie Współautora

dr inż. Aleksandra Cebulska

.....
(tytuł zawodowy, imiona i nazwisko współautora)

Politechnika Bydgoska
im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich
Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt,
Katedra Hodowli i Żywienia Zwierząt
ul. Mazowiecka 28, 85-084 Bydgoszcz

.....
(miejsce pracy/afiliacja)

OŚWIADCZENIE

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

1. Reszka, P.; Cygan-Szczegieliński, D.; Jankowiak, H.; Cebulska, A.; Mikołajczak, B.; Bogucka, J. Effects of Effective Microorganisms on Meat Quality, Microstructure of the Longissimus Lumborum Muscle, and Electrophoretic Protein Separation in Pigs Fed on Different Diets. *Animals* 2020, 10, 10, 1755, DOI: 10.3390/ani10101755, 100 pkt. MNiSW, IF 2,323

Pobieranie materiału do badań, współdziałanie w opracowaniu metodologii i analizie laboratoryjnej w zakresie jakości mięsa (wyciek termiczny, marmurkowość, powierzchnia oka polędwicy), co stanowi 5% indywidualnego udziału w przygotowaniu wyżej wymienionej publikacji.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie wyżej wymienionej/wymienionych pracy/prac przez mgr inż. Patrycję Reszka jako część rozprawy doktorskiej opartej na zbiorze opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych.

Bydgoszcz, 13.09.2021r.
.....
miejsce, data

Aleksandra Cebulska
.....
Podpis współautora artykułu naukowego

* W przypadku prac dwu- lub wieloautorskich wymagane są oświadczenia kandydata do stopnia doktora oraz współautorów, wskazujące na ich merytoryczny wkład w powstanie każdej pracy (np. twórca hipotezy badawczej, pomysłodawca badań, wykonanie specyficznych badań – np. przeprowadzenie konkretnych doświadczeń, opracowanie i zebranie ankiet itp., wykonanie analizy wyników, przygotowanie manuskryptu artykułu i inne). Określenie wkładu danego autora, w tym kandydata do stopnia doktora, powinno być na tyle precyzyjne, aby umożliwić dokładną ocenę jego udziału i roli w powstaniu każdej pracy.

Oświadczenie Współautora

dr inż. Beata Mikołajczak

.....
(tytuł zawodowy, imiona i nazwisko współautora)

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu,
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu,
Katedra Technologii Mięsa,
ul. Wojska Polskiego 31, 60-624 Poznań

.....
(miejsce pracy/afiliacja)

OŚWIADCZENIE

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

1. Reszka, P.; Cygan-Szczegieliński, D.; Jankowiak, H.; Cebulska, A.; Mikołajczak, B.; Bogucka, J. Effects of Effective Microorganisms on Meat Quality, Microstructure of the Longissimus Lumborum Muscle, and Electrophoretic Protein Separation in Pigs Fed on Different Diets. *Animals* 2020, 10, 1755, DOI: 10.3390/ani10101755, 100 pkt. MNiSW, IF 2,323

Współudział w opracowaniu metodologii i analizie laboratoryjnej w zakresie elektroforetycznego rozdzielania białek, co stanowi 5% indywidualnego udziału w przygotowaniu wyżej wymienionej publikacji.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie wyżej wymienionej/wymienionych pracy/prac przez mgr inż. Patrycję Reszka jako część rozprawy doktorskiej opartej na zbiorze opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych.

Poznań, 10.06.2021r.
.....
miejsce, data

Beata Mikołajczak
.....
Podpis współautora artykułu naukowego

* W przypadku prac dwu- lub wieloautorskich wymagane są oświadczenia kandydata do stopnia doktora oraz współautorów, wskazujące na ich merytoryczny wkład w powstanie każdej pracy (np. twórca hipotezy badawczej, pomysłodawca badań, wykonanie specyficznych badań – np. przeprowadzenie konkretnych doświadczeń, opracowanie i zebranie ankiet itp., wykonanie analizy wyników, przygotowanie manuskryptu artykułu i inne). Określenie wkładu danego autora, w tym kandydata do stopnia doktora, powinno być na tyle precyzyjne, aby umożliwić dokładną ocenę jego udziału i roli w powstaniu każdej pracy.