

ROZPRAWA DOKTORSKA

mgr inż. Agata Dankowiakowska

**WPŁYW PREBIOTYKU I SYNBIOTYKU
PODANEGO *IN OVO*
NA CECHY UŻYTKOWE I JAKOŚĆ MIĘSA
KURCZĄT BROJLERÓW**

PROMOTOR

PROF. DR HAB. MAREK BEDNARCZYK

PROMOTOR POMOCNICZY

DR INŻ. JOANNA BOGUCKA

BYDGOSZCZ 2015

*Praca powstała w ramach projektu Nr 2011/01/B/NZ9/00642
pt.: „Stymulacja in ovo mikrobiomu kury – charakterystyka działania
prebiotyków i synbiotyków”.*

*Pragnę złożyć serdeczne podziękowania Panu Profesorowi dr. hab.
Markowi Bednarczykowi za nieocenioną pomoc udzieloną w trakcie
przygotowania pracy doktorskiej, cierpliwość i wyrozumiałość.*

Wyrażam głęboką wdzięczność Pani dr inż. Joannie Boguckiej, osobie, bez której moja praca doktorska nie powstałaby. Dziękuję za cenne rady i wskazówki. Pragnę również podziękować za czas poświęcony na konsultacje oraz za pomoc w redagowaniu pracy.

*Szczególne podziękowania kieruję w stronę Pana Profesora Giuseppe
Maiorano oraz całego zespołu z Uniwersytetu Molise w Campobasso,
za możliwość wykonania badań oraz pomoc w analizowaniu wyników.*

Pragnę również wyrazić swoją wdzięczność Pracownikom Katedry Biochemii i Biotechnologii Zwierząt, którzy służyli pomocą, dobrą radą oraz wsparciem.

SPIS TREŚCI

1. WPROWADZENIE	14
2. PRZEGLĄD PIŚMIENNICTWA.....	15
2.1. SUBSTANCJE BIOAKTYWNE	15
2.1.1. Probiotyki	15
2.1.2. Prebiotyki	19
2.1.3. Synbiotyki	21
3. TECHNOLOGIA IN OVO	23
4. JAKOŚĆ MIĘSA DROBIOWEGO.....	27
5. MATERIAŁ I METODY.....	29
5.1. OCENA CECH UŻYTKOWYCH KURCZĄT BROJLERÓW	32
5.1.1. Ocena wylęgowości piskląt poddanych iniekcji <i>in ovo</i>	33
5.1.2. Wskaźnik konwersji paszy (FCR), Europejski Wskaźnik Wydajności (EWW).....	33
5.2. OCENA CECH JAKOŚCI MIĘSA DROBIOWEGO.....	34
5.2.1. Ocena wartości pH ₄₅ i pH ₂₄	34
5.2.2. Ocena jasności i nasycenia barwy.....	34
5.2.3. Ocena wodochłonności mięsa (WHC)	34
5.2.4. Ocena zawartości kolagenu ogólnego	34
5.2.5. Ocena zawartości hydroksylizylopirydynoliny (HLP).....	36
5.2.6. Ocena zawartości cholesterolu.....	36
5.3. OCENA MIKROSTRUKTURY MIĘŚNI PIERSIOWYCH.....	37
5.3.1. Barwienie hematoksyliną i eozyną (H+E).....	38
5.3.2. Barwienie czerwienią oleistą (Oil Red).....	39
5.3.3. Reakcja na aktywność reduktazy terazolinowej NADH - TR	39
5.3.4. Barwienie PAS (Periodic Acid - Schiff)	39
5.3.5. Barwienie kapilar	40
5.4. ANALIZA OBRAZU MIKROSKOPOWEGO	40
5.5. ANALIZA STATYSTYCZNA.....	41
6. WYNIKI.....	42

6.1.	WYLĘGOWOŚĆ ORAZ CECHY UŻYTKOWE KURCZĄT BROJLERÓW.....	42
6.2.	CECHY JAKOŚCI MIĘSA DROBIOWEGO	43
6.3.	CECHY MIKROSTRUKTURY MIĘŚNI PIERSIOWYCH.....	46
7.	DYSKUSJA	51
7.1.	WYLĘGOWOŚĆ ORAZ CECHY UŻYTKOWE KURCZĄT BROJLERÓW.....	51
7.2.	CECHY JAKOŚCI MIĘSA DROBIOWEGO	54
7.3.	CECHY MIKROSTRUKTURY MIĘŚNI PIERSIOWYCH.....	59
8.	WNIOSKI.....	64
9.	SPIS PIŚMIENNICTWA.....	65
10.	FOTOGRAFIE MIKROSKOPOWE	82
11.	STRESZCZENIE	87

WYKAZ SKRÓTÓW

ASW – Antybiotykowe Stymulatory Wzrostu
C/F – Capillary/ Fibre Ratio (liczba kapilar przypadająca na włókno)
CD – Capillary Density (gęstość kapilarna)
CE – Competitive exclusion (wykluczenie konkurencyjne)
CFU – Colony Forming Unit (jednostka tworząca kolonię)
CSA – Cross Sectional Area (powierzchnia przekroju poprzecznego)
DFD – Dark – Firm – Dry (ciemne, twarde, suche)
DFM – Direct Feed Microbial
FAO – Food and Agriculture Organization (Organizacja Narodów Zjednoczonych do spraw Wyżywienia i Rolnictwa)
FCR – Feed Conversion Ratio (wskaźnik spożycia paszy)
FOS – Fruktooligosacharydy
GALT – Gut Associated Lymphoid Tissue (tkanka limfatyczna związana z układem pokarmowym)
GF – Gigant Fibre (włókno olbrzymie)
GOS – Galaktooligosacharydy
HLP – Hydroksylizylopirydynolina
HMB – β – hydroksy – β – metylomaślan
HPLC – Hight Preformance Liquid Chromatography (wysokosprawna chromatografia cieczowa)
IOF – *In Ovo* Feeding (dożywianie *in ovo*)
LAB – Bakterie fermentacji mlekowej
MOS – Mannanooligosacharydy
ORR lub RFO – Raffinose Family Oligosaccharides (Oligosacharydy Rodziny Rafinozy)
PSE – Pale – Soft – Exudative (jasne, miękkie, wodniste)
RNA – kwas rybonukleinowy
SCFA – Short Chain Fatty Acid (krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe)
WHC – Water Holding Capacity (zdolność wiązania wody)
WHO – World Health Organization (Światowa Organizacja Zdrowia)
WKT – Wolne Kwasy Tłuszczowe

1. WPROWADZENIE

Mięso drobiowe ze względu na wysokie walory dietetyczne i odżywcze należy do najczęściej oraz najchętniej spożywanych. Wśród producentów i eksporterów mięsa drobiowego Polska zajmuje znaczące miejsce. Według danych Krajowej Rady Drobiarstwa produkcja mięsa drobiowego w Polsce w 2014 roku wyniosła 2,1 mln ton. Ze względu na szybkie tempo wzrostu brojlerów ich produkcja stała się opłacalna. Skrócenie okresu odchovu wiąże się jednak z intensyfikacją produkcji, co bardzo często prowadzi do obniżenia odporności ptaków, pojawiania się schorzeń produkcyjnych oraz pomimo zwiększonej mięsności, pogorszenia jakości mięsa [Pietrzak i wsp., 2013].

Żywnienie jest ważnym czynnikiem, który wpływa na zdrowotność i wydajność zwierząt. Kształtuje również jakość produktów pozyskiwanych od zwierząt. Racjonalne żywienie pozwala poprzez pozytywny wpływ na układ odpornościowy, pokarmowy oraz przemianę materii utrzymać odpowiedni status zdrowotny ptaków, a tym samym otrzymać maksymalny wynik produkcyjny [Lipiński i wsp., 2009].

Według raportów European Food Safety Authority [Scientific Raport of EFSA, 2010] produkcja drobiarska oraz produkty drobiowe mogą stanowić potencjalne źródło zakażeń ludzi kampylobakteriozami oraz salmonellozami. Do niedawna skutecznym rozwiązaniem w kontrolowaniu zoonoz były antybiotyki. Jednakże wprowadzony 1 stycznia 2006 roku zakaz stosowania antybiotykowych stymulatorów wzrostu (ASW) w charakterze dodatków paszowych skłonił do poszukiwania nowych rozwiązań żywieniowych. Dlatego coraz więcej uwagi poświęca się substancjom pochodzenia naturalnego, które są bezpieczne zarówno dla zwierząt, człowieka, jak i środowiska. Alternatywą dla środków farmakologicznych stały się naturalne dodatki paszowe podawane w postaci probiotyków, prebiotyków i synbiotyków. Wzbogacenie diety zwierząt w substancje pochodzenia naturalnego korzystnie wpływa na ich organizm oraz zdrowie.

W dostępnej literaturze zarówno polskiej, jak i zagranicznej można znaleźć niewiele badań, które wykorzystują technologię *in ovo* w kształtowaniu cech jakościowych oraz histologicznych mięsa. Dlatego zasadne wydawało się przeprowadzenie tego typu analiz w oparciu o technologię *in ovo*. Celem niniejszej pracy było porównanie wpływu substancji prebiotycznych oraz synbiotycznych podanych *in ovo* w 12. dobie rozwoju zarodkowego, na cechy użytkowe oraz cechy jakości i mikrostruktury mięśnia piersiowego powierzchownego (*musculus pectoralis superficialis*) 35. dniowych kurcząt brojlerów.

2. PRZEGLĄD PIŚMIENICTWA

2.1. SUBSTANCJE BIOAKTYWNE

W ostatnich latach coraz więcej uwagi poświęcono poszukiwaniom nowych dodatków paszowych, które będą alternatywą dla antybiotyków [Yegani i Korver, 2008]. Powszechne stało się stosowanie naturalnych substancji w postaci różnego rodzaju roślin, ziół, kwasów organicznych, probiotyków, prebiotyków czy synbiotyków [Yang i wsp., 2009; Mateos i wsp., 2006; Fallah i wsp., 2013; Przeniosło – Siwczyńska i Kwiatek, 2013].

Spośród dodatków paszowych szerokie spektrum działania w układzie pokarmowym wykazują zakwaszacze. Należą do nich kwasy organiczne i nieorganiczne oraz sole tych kwasów. W produkcji zwierzęcej najczęściej stosowane są kwasy: mlekowy, mrówkowy, propionowy, fumarowy, cytrynowy, fosforowy i solny. Ich działanie polega głównie na poprawie przyswajalności paszy, hamowaniu rozwoju patogenów oraz kontroli rozwoju mikroorganizmów żołądkowo – jelitowych [Kowalczyk i wsp., 2013]. Podobne działanie wykazują substancje bioaktywne. Jak podaje Amerykańskie Stowarzyszenie Dietetyczne [J. Am. Diet. Assoc., 2004] źródłem tych substancji mogą być żywe organizmy oraz mikroorganizmy. Ponadto do substancji bioaktywnych zalicza się m. in. prebiotyki i synbiotyki.

Substancje bioaktywne określane są jako fizjologicznie aktywne składniki żywności lub suplementów diety, pozwalające zaspokoić podstawowe zapotrzebowanie pokarmowe człowieka, niezbędne dla utrzymania zdrowia oraz bezpieczne w spożyciu. Zawierają niewielkie ilości składników chemicznych, które naturalnie występują w roślinach oraz w owocach, warzywach, orzechach, olejach i w ziarnach zbóż [Guaadaoui i wsp., 2014]. Nie wymagają one okresu karencji, wykazują działanie immunostymulacyjne oraz pozwalają kontrolować liczbę patogenów w układzie pokarmowym zwierząt [Chaveerach i wsp., 2004; Świątkiewicz i Koreleski, 2007]. Ponadto stymulują organizm do wydajniejszej produkcji, pozytywnie wpływają na zdrowie zwierząt, redukują schorzenia jelit oraz ryzyko zakażenia produktów drobiowych [Apata, 2009; 2012]. Istnieje wiele mechanizmów działania probiotyków, prebiotyków i synbiotyków. Są one bardzo różnorodne i nie do końca poznane, mechanizmy te stanowią źródło wielu dyskusji [Nowak i wsp., 2010; Dankowiakowska i wsp., 2013; Khan i Naz, 2013]. Ze względu na zróżnicowanie i złożoność tych procesów, w celu określenia efektywności tych substancji konieczne jest prowadzenie dalszych badań.

2.1.1. Probiotyki

Probiotyki nazywane są *stymulatorami wzrostu* i *promotorami życia*, są to naturalne składniki stymulujące wzrost organizmu oraz prawidłowe

funkcjonowanie układu pokarmowego [Miziak i wsp., 2012]. Ich nazwa wywodzi się z języka greckiego *pro bios* i oznacza *dla życia*. Przez wiele lat badań powstało bardzo dużo definicji probiotyków. W 1965 roku po raz pierwszy termin ten zdefiniowali Lilly i Stillwell, jako substancje wytwarzane przez mikroorganizm lub mikroorganizmy, które stymulują mikroflorę jelitową. W 1974 roku Parker określił probiotyki jako suplement diety korzystnie wpływający na organizm gospodarza [Miziak i wsp., 2012]. Według Fuller'a [1989] probiotyki to żywe mikroorganizmy, które pozytywnie oddziałują na organizm poprzez polepszenie równowagi jelitowej. Inną definicję probiotyków podaje Salminen [1996], określając je jako żywe kultury mikroorganizmów lub zawierające je produkty żywnościowe, które korzystnie wpływają na zdrowie i stan odżywienia gospodarza. W publikacjach Oyarzabal'a i Conner'a [1996] oraz Griggs'a i Jacobs'a [2005], a także Chichlowskiego i wsp. [2007a;b] oraz Awad'a i Ghareeb'a [2014] probiotyki z angielskiego określane są mianem *direct – fed microbial* (DFM). Naidu i wsp. [1999] definiują mikroorganizmy, jako dodatki do diety, które poprzez stymulację odporności śluzówkowej i ogólnej, wspomagają przemiany fizjologiczne gospodarza oraz wpływają na równowagę żywieniową i mikrobiologiczną przewodu pokarmowego. Organizacja ds. Wyżywienia i Rolnictwa (FAO) i Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) w 2002 r. sformułowały uniwersalną definicję probiotyków, określając je jako „żywe szczepy, określonych drobnoustrojów, które podawane w odpowiednich ilościach modulują równowagę bakteryjną flory jelitowej i wywierają korzystny wpływ na zdrowie konsumenta” [Corcionivoschi i wsp. 2010; Mizak i wsp., 2012].

W żywieniu zwierząt mogą być stosowane tylko wybrane szczepy bakterii z danego gatunku, starannie wyselekcjonowane, o potwierdzonym w badaniach klinicznych działaniu prozdrowotnym. Do drobnoustrojów o działaniu probiotycznym, stosowanych w produkcji zwierzęcej należą [Patterson i Burkholder, 2003; Miziak i wsp., 2012; Rai i wsp., 2013] :

- Bakterie produkujące kwas mlekowy (LAB) z rodzaju *Lactobacillus* – *L. acidophilus*, *L. amylovorus*, *L. brevis*, *L. casei*, *L. crispatus*, *L. farmicins*, *L. fermentum*, *L. murinus*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. ramnosus*, *L. salivarius*;
- Bakterie z rodzaju *Bifidobacterium* – *B. animals*, *B. lactis*, *B. longum*, *B. pseudolongorum*, *B. termophilum*;
- Gram – dodatnie ziarniaki z rodzaju *Streptococcus* – *S. infantarius*, *S. salivarius*, *S. termophilus*;
- Bakterie z rodzaju *Enterococcus* – *E. faecium*, *E. faecalis*;
- Bakterie z rodzaju *Pediococcus* – *P. acidilactici*, *P. pentosaceus*;
- Bakterie z rodzaju *Lactococcus* – *L. lactis subs. cremoris*, *L. lactis subs. Lactis*;

- Bakterie z rodzaju *Leuconostoc* – *L. citreum*, *L. lactis*, *L. mesenteroides*;
- Bakterie z rodzaju *Propionibacterium freundenreichii*;
- Gram – dodatnie laseczki z rodzaju *Bacillus* – *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*;
- Drożdżaki z rodzaju *Saccharomyces* – *S. cerevisiae*, *S. pastorianus*, z rodzaju *Kluyveromyces* – *K. fragilis*, *K. marxianus*;
- Grzyby z rodzaju *Aspergillus* – *A. orizae*, *A. niger*.

Znajomość czynników, które sprzyjają kolonizacji bakterii patogennych w przewodzie pokarmowym jest podstawą ulepszenia środków kontroli ich rozprzestrzeniania się [Revolledo i wsp., 2006]. Manipulacja składem mikroflory jelitowej pozwala monitorować zakażenia i zapobiegać im. Najmniej szkodliwą i najbardziej efektywną metodą pozwalającą kontrolować schorzenia jelitowe u drobiu jest *competitive exclusion* (CE) – wykluczenie konkurencyjne [Schneitz, 2005]. Termin ten po raz pierwszy został zastosowany w 1969 roku przez Greenberg’a i odnosił się do zjawiska, w którym bakterie jednego szczepu współzawodniczą z innymi bakteriami o zasiedlenie nabłonka jelit [Edenes i wsp., 1997]. W roku 1973 Nurmi i Rantala użyli koncepcji CE w celu kontroli namnażania pałeczek *Salmonella infantis* w stadzie brojlerów. Wykazali, że ustabilizowana mikroflora chroni ptaki przed zakażeniem salmonellami. W tym samym roku Loyd i wsp., jako pierwsi wprowadzili termin CE do produkcji drobiarskiej [Edens i Pierce, 2010]. Produktami CE określane są również probiotyki, DFM oraz kultury CE [Jeffrey, 1999]. Pojawienie się tej technologii umożliwiło w pewien sposób kontrolowanie chorób wśród drobiu oraz zapobieganie im już we wczesnych etapach życia ptaków. Metoda ta pozwala utrzymać równowagę mikrobiologiczną przewodu pokarmowego drobiu i chronić gospodarza przed patogenami, takimi jak *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter perfringers* [Schneitz, 2005]. Mechanizm działania CE polega na:

- tworzeniu niekorzystnych warunków dla kolonizacji nabłonka jelitowego przez bakterie chorobotwórcze;
- hamowaniu aktywności toksyn bakteryjnych;
- produkcji i sekrecji antybakteryjnych metabolitów;
- stymulowaniu miejscowej aktywności układu immunologicznego;
- odżywianiu komórek nabłonka jelitowego [Jeffrey, 1999; Edens i wsp., 1997].

Mikroorganizmy jelitowe, ze względu na funkcję jakie pełnią można podzielić na trzy grupy: troficzne, metaboliczne i immunologiczne [Mroczyńska i wsp., 2011]. Jak podaje Ezema [2013] bakterie jelitowe odgrywają ważną rolę w mechanizmach trawienia oraz ogólnym zdrowiu zwierząt i ludzi. Korzystny wpływ probiotyków zależy od wielu czynników, m. in: od rodzaju wybranego

szczepu, ilości spożycia tego składnika oraz czasu stosowania substancji, a także fizjologicznej kondycji osobnika [Koop – Hoolihan, 2001].

Mechanizmy działania probiotyków są bardzo zróżnicowane. Badania *in vitro* i *in vivo* nad probiotykami pozwalają poznać sposób działania bakterii probiotycznych i skupiają się głównie na identyfikacji bakterii, ocenie ich liczebności, przeżywalności, zdolności adhezyjnych oraz wpływie prebiotyków na ich aktywność i metabolizm. W literaturze można znaleźć stosunkowo niewiele prac na temat badań *in vitro* probiotyków. Oceny te jednak najczęściej dotyczą bakterii *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*. Konieczne wydaje się zatem, aby zarówno testy *in vitro* jak i *in vivo* zostały wzbogacone o nowe gatunki bakterii, dzięki którym będzie można w pełni określić skuteczność i sposób działania innych substancji bioaktywnych.

Mikroflora jelitowa pełni bardzo ważną w kształtowaniu odporności zwierząt i utrzymaniu homeostazy przewodu pokarmowego. Układ pokarmowy jest ściśle powiązany z układem immunologicznym organizmu. Jelita stanowią miejsce interakcji pomiędzy mikroorganizmami, antygenami pokarmu, a układem odpornościowym [Heczko i wsp., 2006]. Istotną rolę w procesach odpornościowych pełni tkanka limfatyczna związana z błoną śluzową jelit (GALT – *Gut – Associated Lymphoid Tissue*). Bakterie probiotyczne są naturalnym promotorem dla rozwoju GALT, wzmacniają system immunologiczny i przygotowują go do odpowiedzi adaptacyjnej [Lillehoj i Lee, 2012]. Mikroflora jelitowa wpływa na czynność wydzielniczą układu immunologicznego, bierze udział w zwiększaniu liczebności komórek odpornościowych oraz produkowanych przez nie substancji zwalczających patogeny [Górska i wsp., 2009; Janardhana i wsp., 2009]. Jak podają Higgins i wsp. [2007] bakterie z rodzaju *Lactobacillus* biorą udział w kształtowaniu wrodzonej odporności u brojlerów, wpływają na proliferację makrofagów w jelitach ślepych, a także zwiększają ich fagocytarną aktywność przeciwko *S. enteritidis*. Probiotyki stymulują odporność zarówno na poziomie humoralnym jaki i komórkowym, co objawia się wzrostem liczby leukocytów, limfocytów T i B, CD+, zwiększeniem wydzielania immunoglobuliny IgA [Amerah i wsp., 2013], IgG [Mroczyńska i wsp., 2011], IgM, interleukiny, IFN – gamma, naturalnych komórek bójących NK, wzrostem ekspresji pro- oraz przeciwzapalnych cytokin [Ohashi i Ushida, 2009]. Oprócz stymulacji odpowiedzi immunologicznej, substancje probiotyczne wpływają na rozwój organów immunologicznych oraz na ekspresję niektórych genów odpowiedzialnych za funkcjonowanie układu odpornościowego [Younis i wsp., 2013; Sławińska i wsp., 2014a;b].

Wiadome jest również, że probiotyki wpływają na wydajność zwierząt poprzez wspomaganie procesów metabolicznych organizmu oraz poprawę trawienia i wchłaniania składników odżywczych [Bozkurt i wsp., 2011; Younis i wsp., 2013]. Dzięki nim polepszeniu ulega również przyswajalność niezbędnych składników mineralnych i elektrolitów, takich jak: sód, wapń, magnez i potas [Mroczyńska i wsp., 2011]. Probiotyki zwiększają stopień

mineralizacji oraz rozwoju kości. Wyniki badań otrzymane przez Mutus'a i wsp. [2006] potwierdziły, że dodatek probiotyku w postaci *Bacillus subtilis* i *Bacillus licheniformis* wpływa na wzrost grubości kości piszczelowej, procentowy udział fosforu oraz popiołu surowego. Probiotyki biorą udział w syntezie witamin, głównie z grupy B, witaminy K, obniżają poziom enzymów bakteryjnych takich jak: β – glukozydaza i β – glukuronidaza, które biorą udział w syntezie związków toksycznych i kancerogennych [Jin i wsp., 1996; 2000; Mroczyńska i wsp., 2011]. Badania nad wpływem probiotyków na wydajność zwierząt wykazują, że substancje te działają w pozytywny sposób na dzienne przyrosty masy ciała [Kabir, 2009a;b; Shabani i wsp., 2012], wykorzystanie paszy oraz redukują śmiertelność wśród ptaków [Pietras i Skraba, 2000; Yörük i wsp., 2004].

2.1.2. Prebiotyki

Drugą grupą dodatków należącą do substancji bioaktywnych są prebiotyki. Prebiotyki to niepoddające się trawieniu w żołądku i jelitach zwierząt monogastrycznych cukry, głównie polisacharydy. Stymulują one selektywnie wzrost i/lub aktywność korzystnej mikroflory jelitowej lub ograniczają liczbę bakterii okrężnicy [Gibson i Roberfroid, 1995; Gibson, 1999; Szymańska – Czerwińska i Bednarek, 2008]. Jak podaje Edens i Pierce [2010] prebiotyki stanowią alternatywę dla probiotyków, nazywane są też ich kofaktorami. Prebiotyki określane są również mianem *żywności funkcjonalnej* lub *nutraceutykami* [Callway i wsp., 2012]. Dostarczają substancji odżywczych bakteriom naturalnie bytującym w przewodzie pokarmowym, które przetwarzają niestrawne węglowodany w źródło energii. Za pomocą substancji prebiotycznych można manipulować endogenną florą bakteryjną przewodu pokarmowego, co prowadzi do zwiększenia roli korzystnych mikroorganizmów w jelitach [Hajati i Rezaei, 2010].

Prebiotyki, podobnie jak probiotyki muszą posiadać określone właściwości [Gibson i Reoberfroid, 1995; Hajati i Rezaei, 2010; Śliżewska i wsp., 2013]:

- nie mogą ulegać rozkładowi i wchłanianiu w górnych odcinkach układu pokarmowego;
- powinny wybiórczo stymulować wzrost i aktywność wybranych szczepów bakterii, które pozytywnie wpływają na zdrowie;
- muszą stanowić selektywny substrat dla jednego lub określonej liczby gatunków bakterii naturalnie bytujących w jelitach ślepych lub okrężnicy;
- powinny wykazywać korzystne działanie miejscowe w organizmie gospodarza;
- ich struktura powinna być znana i udokumentowana;
- jako składnik pokarmu prebiotyk powinien mieć dobry smak, a jego produkcja na dużą skalę nie może stwarzać problemów.

Do prebiotyków stosowanych w branży drobiarskiej należą: oligosacharydy i polisacharydy, peptydy, proteiny oraz niektóre tłuszcze (estery i etery), laktoza. Jednak najczęściej jako prebiotyki stosowane są: fruktooligosacharydy (FOS), inulina, oligofruktoza, oligosacharydy z rodziny rafinozy (ORR – sacharoza, rafinoza, stachioza, werbaskoza, ajugoza) mannanooligosacharydy (MOS), glukooligosacharydy, glikooligosacharydy, trans-galactooligosacharydy (GOS), maltooligosacharydy, lactuloza, laktitol [Iji i Tivey, 1998; Collins i Gibson, 1999; Patterson i Burkholder, 2003; Bednarczyk i wsp., 2010].

W przypadku działania prebiotyków zakłada się, że mogą one wpływać zarówno pośrednio, jak i bezpośrednio na strukturę oraz funkcję jelit [Brudnicki, 2012]. Jak podają Seifert i Watzl [2007] bezpośredni wpływ prebiotyków polega na częściowym ich wchłonięciu do jelit oraz interakcji z komórkami nabłonka jelit oraz z komórkami odpornościowymi. Wpływ pośredni prebiotyków polega na modulacji mikrobiomu jelit gospodarza. Mechanizm ten jest możliwy, ponieważ wbrew obowiązującemu do niedawna paradygmatowi, wiadomo, że przewód pokarmowy ptaków nie jest sterylny, a jego kolonizacja zaczyna się w 16. dobie rozwoju embrionalnego [Pedroso, 2009]. Prebiotyki wykorzystywane są przez bifidobakterie i bakterie LAB i w wyniku ich fermentacji powstają krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe – SCFA (masłowy, propionowy, octowy), które poprzez obniżenie pH, zakwaszają środowisko wewnętrzne jelit oraz są głównym źródłem energii dla komórek nabłonka jelitowego [Gibson i Roberfroid, 1995; Cummings i wsp., 2001; Donalson i wsp., 2008; Bosscher, 2009].

Ponadto mechanizm działania prebiotyków polega m. in. na hamowaniu namnażania oraz zapobieganiu kolonizacji jelit przez bakterie patogenne [Bengmark, 2001]. Enteropatogeny posiadają fimbrie typu I, które są receptorami wykazującymi powinowactwo do mannozy, głównego komponentu MOS [Griggs i Jacob, 2005; Kim i wsp., 2011]. Fimbrie umożliwiają patogenom kolonizację przewodu pokarmowego gospodarza poprzez adhezję do nabłonka jelit. Prebiotyki zaś współzawodnicząc z patogenami o wiązanie do miejsc receptorowych, blokują ich adhezję na nabłonku jelit. Łączą się z fimbriami bakterii i wraz z kałem są usuwane z organizmu [Finucane i wsp., 1999; Baurhoo i wsp., 2009].

Jak podają Cummings i Macfarlane [2002] prebiotyki determinują skład flory bakteryjnej powiązanej z błoną śluzową jelita. Bakterie tworzą na jej powierzchni biofilm, który w interakcji z jelitowym układem immunologicznym pełni ważne funkcje związane z odpornością oraz katabolizmem śluzu. Prebiotyki wykazują silne działanie immunostymulacyjne [Świątkiewicz i Koreleski, 2007; Szymańska – Czerwińska i Bednarek, 2008; Ka – Lung i Cheung, 2013]. Poprzez przyłączenie się do specyficznych receptorów mannozy, które znajdują się na powierzchni ścian komórkowych leukocytów, wpływają na ich aktywność oraz uruchomienie mechanizmów odpowiedzi immunologicznej. Następuje

wzrost namnażania limfocytów i makrofagów, produkcji przeciwciał i cytokin [Świątkiewicz i Koreleski, 2007; Szymańska – Czerwińska i Bednarek, 2008; Munyaka i wsp., 2012]. Zastosowanie preparatu prebiotycznego wpływa na wzrost aktywności lizozymu w surowicy krwi kurcząt doświadczalnych [Lipiński i wsp., 2009]. Ponadto substancje te podnoszą poziom IgG [Świątkiewicz i Koreleski, 2007] we krwi oraz zwiększają produkcję śluzu oraz zapobiegają zakażeniom jelitowym [Kim i wsp., 2011; Houshmand i wsp., 2012]. W porównaniu do antybiotyków takich, jak: avilamycyna, bacytracyna, bambermycyna czy wirginiamycyna, prebiotyki wykazują się większą skutecznością i wpływają na obniżenie śmiertelności wśród brojlerów [Hooge, 2004]. Jak podają Koksai i wsp. [2013] prebiotyki poprawiają wskaźnik wzrostu oraz wskaźnik FCR, pozytywnie wpływają na wydajność nieśną oraz całkowitą masę jaj [Świątkiewicz i Świątkiewicz, 2008]. Ponadto obniżają poziom cholesterolu w żółtku [Chen i wsp., 2005a] oraz zwiększają stopień wykorzystania składników mineralnych [Saminathan i wsp., 2011], co wpływa na wyższą zawartość fosforu, wapnia, popiołu surowego w kościach oraz większą wytrzymałość skorup [Chen i wsp., 2005b]. Regulują również metabolizm tłuszczów, redukują ryzyko hipoglikemii, alergii oraz chorób nowotworowych [Szymańska – Czerwińska i Bednarek, 2007].

Prebiotyki wpływają pozytywnie na mikrostrukturę jelit brojlerów, przyczyniają się do wzrostu długości kosmków jelitowych, liczby komórek kubkowych oraz zwiększenia głębokości krypt jelitowych [Rehman i wsp., 2007; Świątkiewicz i Świątkiewicz, 2008; Baurhoo i wsp., 2009; Munyaka i wsp., 2012; Majd i wsp., 2013]. Przywracają równowagę mikrobiologiczną jelit, aktywują enzymy trawienne, poprawiają wydajność zwierząt [Biggs i wsp., 2007] oraz wykorzystanie składników odżywczych, a także przyczyniają się do obniżenia zanieczyszczenia środowiska oraz kosztów produkcji [Szymańska – Czerwińska i Bednarek, 2007].

2.1.3. Synbiotyki

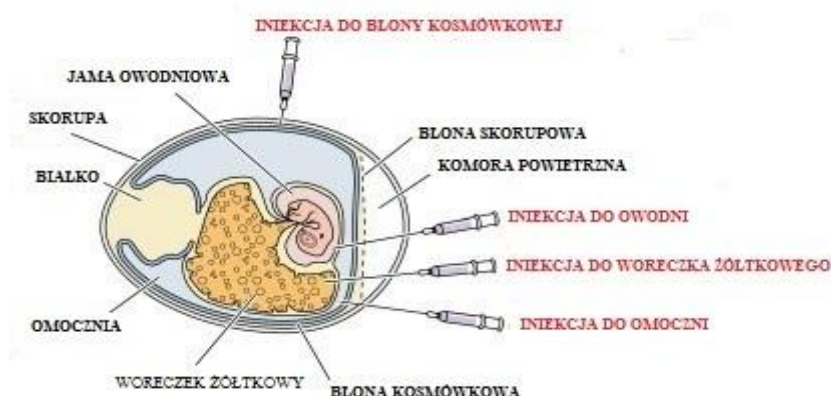
Synbiotyki to produkt zawierający substancje prebiotyczne i probiotyczne [Gibson i Roberfroid, 1995; Schrezenmeier i De Vrese, 2001; Brzóska, 2007]. Kombinacja ta działa na zasadzie synergii [Bednarczyk i wsp., 2010] i stanowi optymalne połączenie odpowiednio wyselekcjonowanych bakterii probiotycznych oraz prebiotyku, który jest źródłem energii i stymulatorem dla korzystnych bakterii [Collins i Gibson, 1999]. Bengmark [2001] definiuje synbiotyki jako produkty fermentacji, która prowadzi do produkcji krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych. Mahadavi i wsp. [2013] określają synbiotyki jako czynniki przeciwbakteryjne, antynowotworowe, antyalergiczne oraz stymulujące układ immunologiczny. Poprzez modyfikację ogólnego profilu bakteryjnego jelit, synbiotyki mają pośredni wpływ na organizm gospodarza. Substancje te poprawiają odporność ptaków [Zhang i wsp., 2006],

wpływają znacząco na nagromadzenie tkanki limfatycznej w jelitach, zwiększenie średnicy i grubości ścian migdałków jelit ślepych [Majd i wsp., 2013] oraz zwiększają absorpcję glukozy [Awad i wsp., 2008]. Ponadto poprawiają wydajność brojlerów w podobny sposób jak antybiotykowy stymulator wzrostu – avilamycyna [Fallah i wsp., 2013]. Jak podają Bailey i wsp. [1991] oraz Awad i wsp. [2009] zastosowanie synbiotyku jest bardziej skuteczne niż podanie samego probiotyku czy prebiotyku.

Dotychczasowe badania *in vitro* i *in vivo* prowadzone nad synbiotykami [Sprawozdanie IBB PAN, 2012] pozwalają odpowiednio dobrać gatunki bakterii oraz prebiotyki, które wspomagają ich wzrost i rozwój. Dzięki nim mechanizm działania synbiotyków jest w pewnym stopniu znany i przewidywalny w badaniach.

3. TECHNOLOGIA *IN OVO*

Substancje bioaktywne przez wiele lat podawane były zwierzętom jako dodatki paszowe, stosowane były również w formie rozpuszczonej w wodzie [Śliżewska i wsp., 2006; Świątkiewicz i Koreleski, 2007; Janocha i wsp., 2010]. Sposoby te jednak nie gwarantowały odpowiedniego poziomu pobrania tych składników, przez co nie były wystarczająco wydajne. Dlatego narzędziem coraz powszechniej używanym w wylęgarniach stała się technologia *in ovo*. Technologia ta stosowana jest w wielu krajach od ponad 30 lat. Polega ona na wstrzyknięciu, za pomocą odpowiedniej igły, niewielkiej ilości substancji bezpośrednio do jaja rozwijającego się zarodka ptaka (Ryc. 1) [Bednarczyk i wsp., 2010]. Metoda została opracowana w latach 90. XX w Stanach Zjednoczonych, w celu szczepienia piskląt brojlerów, początkowo przeciwko wirusowej chorobie Mareka – MD (Marek's Disease) oraz chorobie Gumboro – IBD (Infectious Bursal Disease). Szczepienie *in ovo* stosowane jest również przeciwko rzekomemu pomorowi drobiu, zwanemu chorobą Newcastle [Johnston i wsp., 1997; Okwor i wsp., 2014]. Obecnie około 95% kurcząt brojlerów jest szczepionych za pomocą technologii *in ovo*. Metoda ta ma również szersze zastosowanie i jest przydatna w stymulacji korzystnej mikroflory jelitowej u piskląt, stymulacji rozwoju zarodków oraz polepszaniu wydajności zwierząt, testowaniu efektów teratogennych, określenia płci zarodków, iniekcji komórek zmodyfikowanych genetycznie [Ohta i wsp., 2001b; Villaluenga i wsp., 2004; Bednarczyk i wsp., 2010; Zhai i wsp., 2011a;b].



Ryc. 1. Schemat iniekcji *in ovo*

[<http://www.virology.ws/2009/12/10/influenza-virus-growth-in-eggs/>]

Jak podaje Williams [2007] zaletami stosowania technologii *in ovo* są:

- wczesny rozwój odporności u ptaków – traktowane na poziomie embrionalnym, różnego rodzaju substancjami, ptaki charakteryzują się wyższą odpornością oraz lepszym zdrowiem;
- jednolity sposób podania szczepionki - automatyczna iniekcja umożliwia podanie do każdego jaja substancji o takiej samej koncentracji i objętości;
- redukcja stresu – iniekcja *in ovo* pozwala uniknąć stresu na jaki są narażone kurczęta w czasie szczepień stosowanych po wylęgu;
- dzięki wyeliminowaniu zabiegu szczepienia po wylęgu kurczęta szybciej trafiają z wylęgarni na fermę;
- zmniejszenie kosztów produkcji;
- możliwość testowania i wykorzystania nowych substancji w kontrolowaniu i ograniczaniu chorób drobiu.

Znajomość i zrozumienie poszczególnych etapów rozwoju zarodkowego ptaków pozwala określić optymalny czas iniekcji. Iniekcja wykonana za wcześnie jest mniej precyzyjna, ponadto obniża wylęgowość, może prowadzić do śmierci ptaków w późniejszym okresie oraz wycofania ich z produkcji. Podanie *in ovo* substancji zbyt późno jest przyczyną pojawienia się pęknięć skorupy oraz problemów związanych z ich transportem wewnątrz jaja [Williams, 2007; 2011]. W przypadku probiotyku LAB, iniekcja wykonywana jest w okresie późnej embriogenezy, pomiędzy 17. a 18. dobą rozwoju embrionalnego [Yamawaki i wsp., 2013]. W tym stadium zarodek pobiera płyn owodniowy, który otacza embrion. Substancje podane *in ovo* docierają do jelit, przez co wpływają na rozwój układu pokarmowego jeszcze przed wykluciem. Wykorzystanie technologii *in ovo* pozwala na stymulację układu immunologicznego ptaków jeszcze na poziomie embrionalnym. U kury prekursorzy limfocytów T i B powstają między 8. a 14. dniem embriogenezy. Od 12. dnia rozwoju embrionalnego do kilku tygodni po wylęgu komórki te różnicują się i proliferują w pęcherzykach bursy Fabrycjusza, a następnie migrują do grasicy i wtórnych narządów limfatycznych [Johnston i wsp., 1997; Bednarczyk i wsp., 2010]. Badania Villaluengi i wsp. [2004] wskazują, że optymalnym czasem iniekcji probiotyku jest 12. doba rozwoju embrionalnego. W porównaniu z iniekcją w 1., 8. i 17. dobie stwierdzono znacznie wyższą liczbę bifidobakterii w jelicie. Ponadto w 12. dobie błona kosmówkowo – omoczniowa jest już w pełni rozwinięta i unaczyniona. Zarodek zaś otoczony jest płynem owodniowym, który pozostaje w kontakcie z układem pokarmowym embrionu, co gwarantuje transport substancji z komory powietrznej do jelit. Według Johnston i wsp. [1997] o efektywności iniekcji decyduje etap rozwoju zarodka. Optymalnym czasem iniekcji *in ovo*, jak podaje Williams [2007; 2011] jest etap, w którym rozpoczyna się resorpcja woreczka żółtkowego, a głowa zarodka znajduje się pod skrzydłem, aż do momentu rozpoczęcia klucia.

Podanie szczepionki w odpowiednie miejsce decyduje o efektywności szczepienia oraz osiągnięciu założonych korzyści. Iniekcja może być wykonana do kilku miejsc: komory powietrznej, omocznia, owodnia, do zarodka lub woreczka żółtkowego. W przypadku podania substancji do organizmu zarodka iniekcja może być wykonana domięśniowo, podskórnie, do oczodołu, czaszki, bądź do jamy brzucha [Williams, 2011; Williams i Hopkins, 2011]. Badania przeprowadzone na Uniwersytecie w Kalifornii [Williams, 2007] wykazały, że największą efektywność przeciwko chorobie Mareka miały szczepionki podane do płynu owodniowego oraz do zarodka. Jak podają Ohta i Kidd [2001a] optymalnym miejscem iniekcji, w przypadku aminokwasów (AA), jest woreczek żółtkowy oraz pozazarodkowa jama ciała.

Na przestrzeni wielu lat szukano substancji, które mogą być podawane do jaja. Składniki te muszą pozytywnie wpływać na proces embriogenezy oraz wydajność ptaków po wylęgu. Pierwsze badania nad zastosowaniem IOF przeprowadzili w 1971 roku Balaban i Hill [Cianciullo, 2011/2012], którzy badali wpływ L – tyroksyny i tiomocznika podanego *in ovo* bezpośrednio do organizmu rozwijającego się zarodka. Po raz pierwszy iniekcji substancji bioaktywnej w postaci probiotycznego szczepu *Lactobacillus* do komory powietrznej dokonano w 1997 roku [Edens i wsp., 1997]. Testowano również inne substancje, takie jak: hormony wzrostu, antybiotyki, węglowodany, białko jaja kurzego, glukozę, pestycydy, aminokwasy, insulinę, fungicydy oraz inhibitory pleśni. Substancje te iniekowano nie tylko do komory powietrznej, ale również domięśniowo, do rozwijającego się embrionu, białka jaja, woreczka żółtkowego, worka omoczninowego lub omocznia [Kocamis i wsp., 1999, 2000; McReynolds i wsp., 2000; Williams i wsp., 2000; Ohta i Kidd, 2001a; Foye, 2006; Matsushita i wsp., 2006; Smirnov i wsp., 2006].

Okres rozwoju embrionalnego oraz neonatanlego ma bardzo istotny wpływ na jakość i wydajność ptaków. Podczas ostatniego etapu inkubacji w jaju zachodzą ważne fizjologiczne i metaboliczne procesy [Noy i Uni, 2010; Kornasio i wsp., 2011; Zhai i wsp., 2011a]. Ze względu na zwiększone tempo metabolizmu szybko rosnących embrionów rezerwa składników odżywczych może być niewystarczająca i niektóre substancje zostają wyczerpane jeszcze w okresie prenatalnym [Uni i wsp., 2005]. Jaja kurze zawierają dużo białka i lipidów, ale są ubogie w węglowodany (0,3 – 0,4%). Ich ilość może nie pokrywać zapotrzebowania metabolicznego embrionu [Zhai i wsp., 2011b]. Zapasy glikogenu zgromadzone w wątrobie wystarczają do 19. doby inkubacji. Pod koniec okresu inkubacji, a zwłaszcza przed kluciem zapotrzebowanie embrionu na węglowodany gwałtownie wzrasta. Mięśnie, które są najbardziej aktywne podczas wylęgu również zużywają duże ilości glikogenu [Moran, 2007]. Dlatego różnego rodzaju węglowodany wprowadzone *in ovo* stanowią gotowe źródło energii i redukują zużycie endogennych substancji [Uni i wsp., 2005, Foye i wsp., 2006; Zhai i wsp., 2011a;b].

Ze względu na opóźniony dostęp do wody i paszy po wylęgu masa ciała ptaków ulega obniżeniu, a rozwój mięśni i jelit jest zahamowany. Podanie

egzogennych składników *in ovo* pozwala poprawić status energetyczny, poziom odżywienia oraz wpływa na dojrzewanie i funkcjonowanie jelit. Metoda odżywiania *in ovo* (In Ovo Feeding – IOF), polegająca na podaniu substancji do płynu owodniowego została stworzona i opatentowana przez Uni i Ferketa [2003]. Przed wykluciem embriion zaczyna połykać i resorbować płyn owodniowy zawierający zainiekowane substancje [Uni i wsp., 2005]. IOF przyczynia się do redukcji śmiertelności i zachorowalności wśród kurcząt, wzrostu wykorzystania składników paszy, stymulacji odpowiedzi immunologicznej. Ponadto zmniejsza częstotliwość występowania zaburzeń rozwoju kości, niweluje negatywne skutki wzrostu temperatury podczas ostatniego etapu inkubacji, poprawia wylęgowość, rozwój mięśni, wydajność mięśni piersiowych oraz pozwala osiągnąć pożądaną masę w krótszym czasie [Noy i Uni, 2010; Shafey i wsp., 2012; Hamadani i wsp., 2013].

Technologia *in ovo* stała się popularną na całym świecie metodą podawania różnego rodzaju substancji podczas embriogenezy. Warunki inkubacji jaj muszą być odpowiednio dostosowane do czasu iniekcji, dzięki temu uzyskujemy bardzo dobrą wylęgowość. Na efektywność szczepień wpływa termin, w którym wykonywana jest iniekcja w relacji do poziomu rozwoju embrionalnego zarodka, sterylność iniekowanej substancji oraz odpowiedni dobór miejsca iniekcji i precyzyjność jej wykonania. Jednak, aby uzyskać kurczęta o wysokiej jakości szczepienia *in ovo* muszą być wykonywane w ściśle określonych, sterylnych warunkach, pod stałą kontrolą. Gwarancja wysokiej jakości produktów pozyskiwanych od ptaków jest jednym z głównych celów produkcji drobiarskiej.

4. JAKOŚĆ MIĘSA DROBIOWEGO

Jakość mięsa jest pojęciem bardzo złożonym, kształtowanym przez cechy fizyczne, chemiczne, morfologiczne, biochemiczne, mikrobiologiczne, sensoryczne, technologiczne, a także właściwości odżywcze oraz kulinarne [Ingr, 1989; Jassim i wsp., 2011; Tougan i wsp., 2013]. Jakość tuszek i mięsa drobiowego formowana jest przez cały okres życia ptaków. Odpowiednie żywienie oraz właściwe warunki odchowu pozwalają wykorzystać potencjał genetyczny zwierząt i wpłynąć pozytywnie na cechy jakościowe mięsa. Większość konsumentów przy wyborze mięsa drobiowego zwraca głównie uwagę na jego świeżość i odpowiedni wygląd.

Wzrastający popyt na mięso drobiowe oraz względy ekonomiczne związane z krótkim cyklem produkcyjnym stały się przyczyną intensyfikacji produkcji zwierzęcej [Pomianowski i wsp., 2011]. Wieloletnie prace selekcyjne pozwoliły otrzymać zwierzęta większe, szybciej rosnące, lepiej wykorzystujące paszę oraz bardziej umięśnione. Badania z zakresu genetyki przyczyniły się do poprawienia potencjału produkcyjnego zwierząt, niemniej jednak efektem tych działań jest obniżona jakość mięsa oraz zmiany patologiczne w mięśniach. Coraz częściej pojawiają się wady mięsa, które obniżają jego wartość technologiczną [Pietrzak i wsp., 2013]. Współczesne technologie produkcyjne, a mianowicie duża obsada zwierząt, warunki utrzymania oraz całokształt czynności związanych z obrotem zwierząt wywołują u nich duży stres [Doktor, 2007]. Przyczynia się to do pojawienia zaburzeń równowagi przewodu pokarmowego, obniżenia odporności i zdrowotności zwierząt, co przekłada się na jakość surowca mięsnego.

Wysokie standardy produkcji, wpływające na polepszenie cech sensorycznych i funkcjonalnych mięsa związane są ze zwiększaniem tempa wzrostu oraz wielkości mięśni piersiowych, a także z redukcją tłuszczu. Zabiegi te bardzo często są czynnikiem stresogennym dla ptaków i powodują biochemiczne i histologiczne modyfikacje w tkance mięśniowej. Najczęściej pojawiającymi się w mięsie drobiu zmianami są: syndrom białych włókien – *white striping*, miopatia mięśnia piersiowego (Deep Pectoral Myopathy – DPM), problemy związane z obniżoną wodochłonnością (syndrom PSE), trwałością i spoistością mięsa – niedojrzała śródmięśniowa tkanka łączna [Petracci i Cavani, 2012].

Wpływ na jakość mięsa ma wiele czynników, należą do nich m. in.: genotyp, wiek, płeć, rodzaj mięśnia, jego struktura, system produkcji, transport [Tougan i wsp., 2013]. Jednym z ważniejszych czynników jest sposób żywienia zwierząt. Wyniki dotyczące wpływu probiotyków na jakość mięsa są niejednoznaczne, a opinie na ten temat podzielone. Jak podają Rai i wsp. [2013] probiotyki zwiększają wydajność oraz wodochłonność (WHC) tuszki, obniżają zaś twardość mięsa, wyciek wody [Zhou i wsp., 2010; Park i Kim, 2014] oraz wartość pH [Pelicano i wsp., 2003; Ali i wsp., 2010; Khalafalla i wsp.,

2011]. Ponadto mają korzystny wpływ na siłę cięcia [Zhou i wsp., 2010]. Z kolei, jak podają Pelicano i wsp. [2003], probiotyki podawane zarówno w wodzie, jak i paszy nie miały wpływu na WHC, siłę cięcia, wyciek swobodny. Pozytywnie zaś wpływały na cechy sensoryczne mięsa.

Od kilkunastu lat zespół Profesora Marka Bednarczyka prowadzi badania nad wpływem substancji bioaktywnych, podawanych poprzez iniekcję w 12. dobie rozwoju embrionalnego na cechy produkcyjne, wydajność drobiu, a także na panel cech bakteriologicznych (identyfikacja oraz oszacowanie liczby bakterii obecnych w układzie pokarmowym kurcząt), fizjologicznych (aktywność enzymów trzustkowych, zawartość hormonów oraz glukozy, cholesterolu, albumin, trójglicerydów oraz WKT w surowicy krwi), immunologicznych (określenie masy organów immunologicznych, ocena koncentracji immunoglobulin oraz ocena aktywności limfocytów, ich podział i rozmieszczenie), genetycznych (izolacja RNA ze śledziony, jelit oraz migdałków jelit ślepych) oraz histologicznych (ocena mikrostruktury jelit: wysokość kosmków, powierzchnia chłonna, głębokość krypt jelitowych, liczba komórek kubkowych).

Dotychczasowe badania nad efektywnością probiotyków, prebiotyków i synbiotyków podanych w paszy, bądź w wodzie, skupiały się głównie na ocenie parametrów produkcyjnych zwierząt. W odniesieniu do jakości mięsa, autorzy badali głównie cechy związane z teksturą, smakowitością oraz takie wartości jak: pH, wodochłonność (WHC) oraz barwa. Zarówno w polskim, jak i zagranicznym piśmiennictwie można znaleźć niewiele prac na temat wpływu substancji bioaktywnych, podanych *in ovo*, na cechy jakości mięsa oraz mikrostrukturę mięśni szkieletowych ptaków [Cianciullo 2011/2012; Maiorano i wsp., 2012]. Dlatego też niniejsze opracowanie jest próbą poszerzenia wiedzy z tego zakresu.

5. MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań stanowiły jaja wylęgowe (9 000 szt.), które pochodziły od 32. tygodniowego stada brojlerów Ross 308. Średnia masa jaj wynosiła około 60 gramów. Jaja poddano inkubacji w komercyjnej wylęgarni Drobex, w Solcu Kujawskim, w inkubatorach firmy Petersime. W 12. dobie lęgu jaja zostały prześwietlone, a niezapłodnione jaja oraz martwe embriony zostały odrzucone. Jaja zawierające żywe embriony podzielono losowo na 5 grup doświadczalnych (1 800 jaj w każdej grupie), którym podano do komory powietrznej odpowiednie substancje bioaktywne.

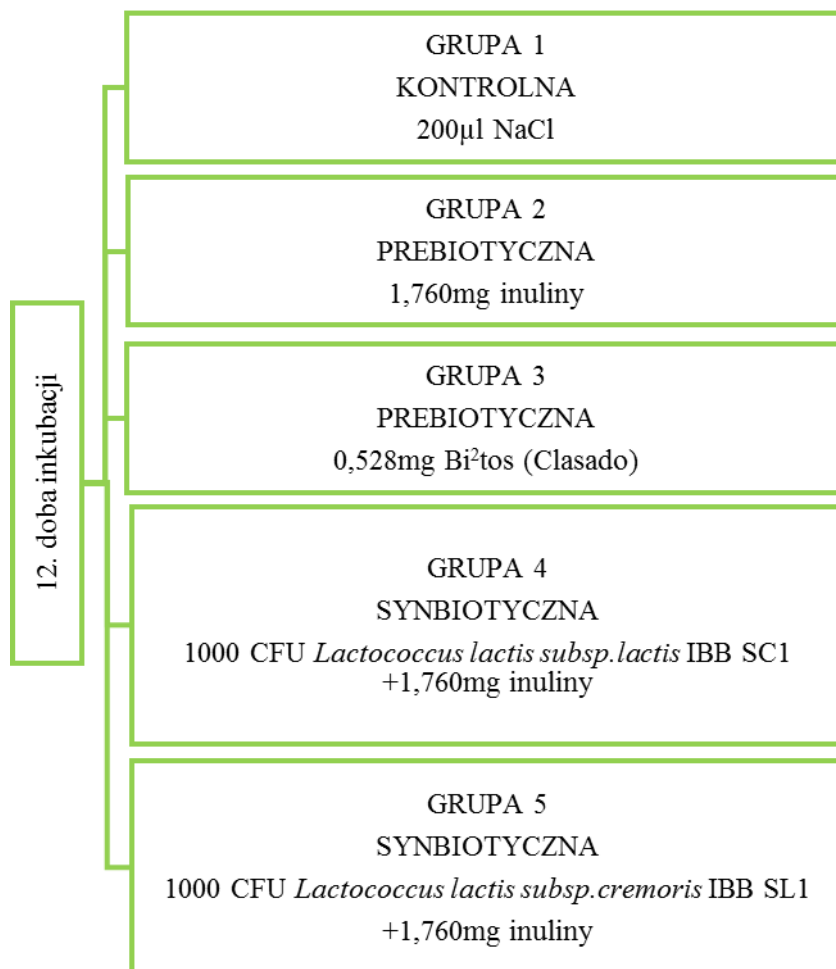
Oceny *in vitro* substancji bioaktywnych dokonano w Instytucie Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk w Warszawie. Pod uwagę wzięto takie cechy jak:

- przeżywalność bakterii w obecności prebiotyków,
- potencjał katabolizmu węglowodanów,
- potencjał enzymatyczny,
- ogólny fenotyp,
- odporność na antybiotyki wykorzystywane w leczeniu zwierząt.

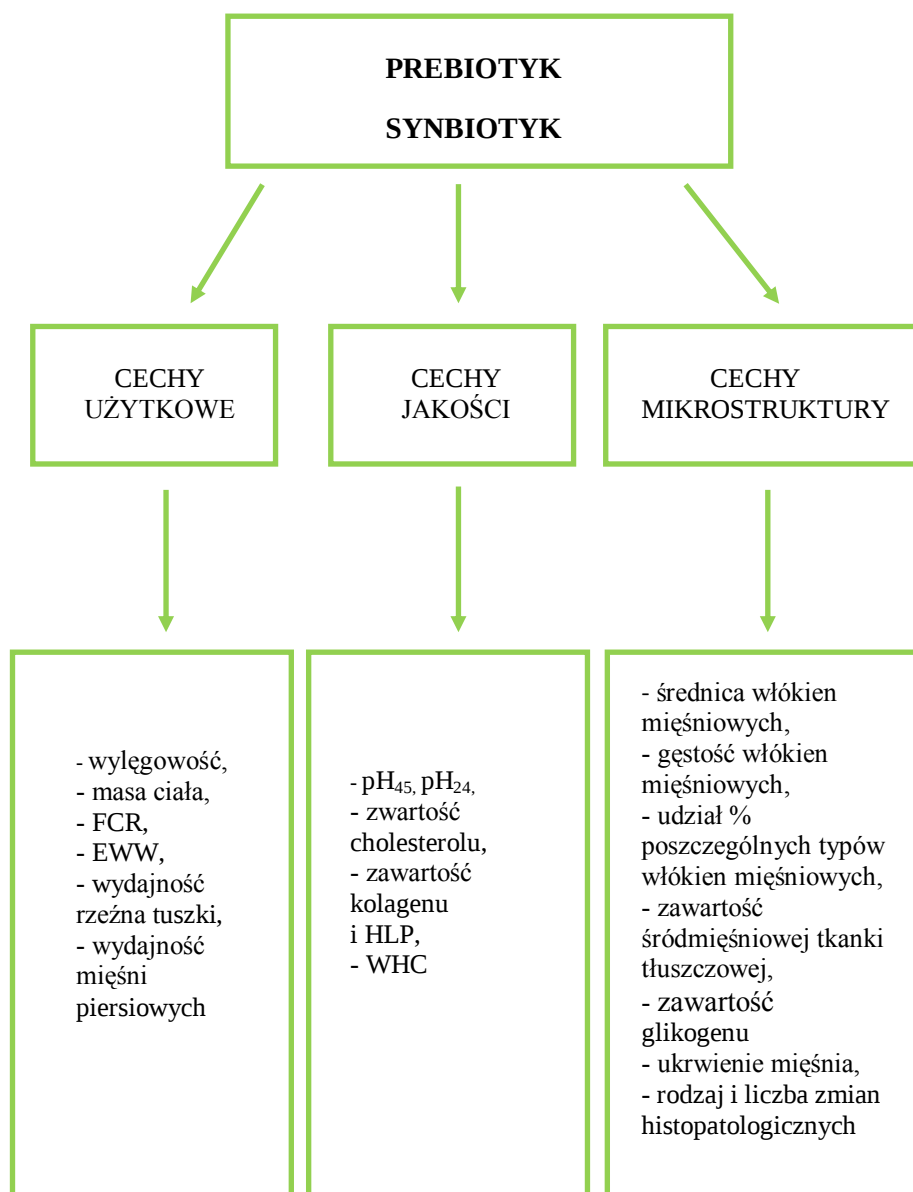
Na podstawie w/w cech do iniekcji spośród 6 prebiotyków (RFO, Inulina Sigma, NF – F097 BioAtlantis, Gutcare start BioAtlantis, Leiber – Beta S (1,3) – (1,6) – B – D Glucan, Leiber Biolex MB40) wytypowano 2 najskuteczniej działające prebiotyki: inulinę i Bi²tos (Clasado Ltd.) oraz 2 probiotyki: bakterie należące do rodzaju *Lactococcus lactis subsp. lactis* – IBB SC1 oraz bakterie z gatunku *Lactococcus lactis subsp. cremoris* – IBB SL1. Umożliwiło to skomponowanie dwóch synbiotyków. Następnie substancje te poddano dalszym testom *in vivo*. Na podstawie wyników wylęgu oraz badań bakteriologicznych dobrano dawki substancji iniekcyjnych [Bednarczyk i wsp., 2013].

W 12. dobie rozwoju embrionalnego, za pomocą automatycznej technologii *in ovo* do komory powietrznej rozwijającego się zarodka podano 200 µl roztworu substancji bioaktywnej. Grupa kontrolna (1) otrzymała roztwór soli fizjologicznej, grupy prebiotyczne zainiektowano roztworem zawierającym (2) 1,760 mg inuliny (Sigma Aldrich) lub (3) roztworem zawierającym 0,528 mg komercyjnego prebiotyku Bi²tos (Clasado Ltd.). Grupy synbiotyczne, zawierały 1,760 mg inuliny (4) i 1000 CFU *Lactococcus lactis subsp. lactis* IBB SC1 oraz 0,528 mg Bi²tos (5) i 1000 CFU *Lactococcus lactis subsp. cremoris* IBB SL1. Roztwór synbiotyku zawierał 20 µl zawiesiny bakteryjnej oraz 180 µl roztworu prebiotyku (Ryc. 2).

Dokonano oceny cech użytkowych, cech jakości oraz mikrostruktury mięśnia piersiowego powierzchownego (*musculus pectoralis superficialis*) 35. dniowych kurcząt brojlerów (Ryc. 3).



Ryc. 2 Schemat iniekcji



FCR – Feed Conversion Ratio (wskaźnik knowersji paszy), EWW – Europejski Wskaźnik Wydajności, HLP – zawartość hydroksylizylopirydynoliny, WHC – Water Holding Capacity (zdolność wiązania wody)

Ryc. 3. Schemat realizowanych badań

5.1. OCENA CECH UŻYTKOWYCH KURCZĄT BROJLERÓW

Wylęzione pisklęta seksowano i losowo do odchowu wybrano 3 325 kogutków Ross 308. Z każdej grupy wybrano po 65 – 70 sztuk kurcząt. Doświadczenie przeprowadzono w dziesięciu powtórzeniach. Oceną wyników odchowu objęto 7 powtórzeń liczących po 65 sztuk z każdej grupy. Kogutki odchowiwano na ściółce, zgodnie z zaleceniami firmy Ross. Zwierzęta miały stały dostęp do wody i paszy. Wszystkie grupy żywiono tymi samymi mieszankami, stosując trzyfazowy program żywienia: 1 – 14 dni starter, 15 – 30 dni grower, 31 – 34 dni finisher. Poniżej w tabeli 1 przedstawiono skład i wartość pokarmową mieszanek podawanych kurczętom doświadczalnym.

W przypadku cech użytkowych, cech jakości oraz oceny mikrostruktury mięśnia piersiowego materiał doświadczalny stanowiło 50 losowo wybranych kogutków Ross 308, podzielonych na 5 grup doświadczalnych. Spośród cech użytkowych oznaczono: wylęgowość, średnią masę ciała kurcząt, wydajność mięśnia piersiowego oraz wydajność tuszki.

Tabela 1. Skład i wartość pokarmowa mieszanek doświadczalnych dla kurcząt brojlerów Ross 308 [Wytwórnia Pasz „Agrocentrum”]

Surowce (%)	Starter	Grower	Finiszer
Pszenica	26,73	29,19	30,66
Kukurydza	30,00	30,00	30,00
Poekstrakcyjna śruta sojowa	32,50	28,20	25,33
Rzepak	5,00	6,00	7,00
Olej sojowy	2,10	1,33	1,80
Smalec	-	2,00	2,50
Sól paszowa	0,30	0,30	0,28
Kreda pastewna	1,09	0,95	0,85
Fosforan 1-wapniowy	1,15	0,94	0,63
DL-Metionina	0,25	0,18	0,13
L-Lizyna	0,32	0,32	0,27
L-Treonina	0,06	0,09	0,05
Premiks wit. -min.¹⁾	0,50	0,50	0,50

Wartość pokarmowa			
EM, kcal/kg	2980	3100	3200
Białko ogólne, %	22	20,5	19,5
Lizyna, %	1,35	1,25	1,15
Metionina, %	0,57	0,49	0,43
Metionina + Cystyna %	0,95	0,85	0,78
Wapń, %	0,9	0,80	0,70
Fosfor przysw., %	0,4	0,35	0,28
Sód, %	0,14	0,14	0,13

¹⁾ 1 kg premiksu zawiera: witamina A – 5 000 000 j. m., witamina D₃ – 1 400 000 j. m., witamina E – 18 200 mg, witamina K₃ – 1200 mg, witamina B₁ – 600 mg, witamina B₂ – 2000 mg, witamina B₆ – 1200 mg, witamina B₁₂ – 8000 mg, biotyna (H) – 80 000 mg, Fe – 20 000 mg, Mn – 40 000 mg, Zn – 36 000 mg, Cu – 6000 mg, J - 400 mg, Se - 140 mg, pantotenian wapnia – 4800 g, kwas nikotynowy – 20 000 mg, kwas foliowy – 400 mg, chlorek choliny – 380 g, fitaza – 500 FTU

5.1.1. Ocena wylęgowości piskląt poddanych iniekcji *in ovo*

W każdej grupie nałożono 12 tac po 150 jaj. Wylęgowość obliczono na podstawie wylęgu kurcząt z 9 000 szt. jaj.

5.1.2. Wskaźnik konwersji paszy (FCR), Europejski Wskaźnik Wydajności (EWW)

Kurczęta zważono w 34. dniu życia. Za cały okres odchowu obliczono zużycie paszy na 1 kg wyprodukowanego żywca. Obliczono także Europejski Wskaźnik Wydajności (EWW) według następującego wzoru:

$$EWW = \frac{\text{Masa ciała (kg)} \times \text{przeżywalność (\%)} \times 100}{\text{Wiek (dni)} \times \text{zużycie paszy na 1 kg masy ciała (kg)}}$$

Wskaźniki FCR oraz EWW zostały oznaczone dla 455 sztuk brojlerów.

5.2. OCENA CECH JAKOŚCI MIĘSA DROBIOWEGO

Ocena jakości mięsa została wykonana na Uniwersytecie Molise w Campobasso, we Włoszech i obejmowała ocenę: pH₄₅, pH₂₄, jasności i nasycenia barwy (L*), wodochłonności (WHC), zawartości kolagenu ogólnego (IMC), w tym hydroksylizylopirydynoliny (HLP) oraz zawartości cholesterolu.

5.2.1. Ocena wartości pH₄₅ i pH₂₄

Wartość pH mięsa oznaczono bezpośrednio w mięśniu po 45 minutach oraz 24 godzinach po uboju za pomocą pH – metru firmy Matthäus wyposażonego w zespoloną szklaną elektrodę sztyletową. Urządzenie skalibrowano wobec buforów o wartościach pH 4.0 i pH 7.0.

5.2.2. Ocena jasności i nasycenia barwy

Oceny dokonano wg metody Škrlep i Čandek – Potokar [2006], w systemie L*a*b*, metodą odbiciową, za pomocą przenośnego kolorymetru Minolta CR 300, gdzie: L* oznacza jasność barwy, *a – wysycenie barwy czerwonej, *b – wysycenie barwy żółtej. Pomiaru parametrów barwy surowych mięśni dokonano 45 minut i 24 godziny po uboju kurcząt.

5.2.3. Ocena wodochłonności mięsa (WHC)

Oceny dokonano według metody Grau'a i Hamma [1952]. 300 mg próbkę mięśnia piersiowego umieszczono na bibule o określonej sile sorpcyjnej (Whatman nr 1) pod stałym naciskiem 50 kg/cm² przez czas 5 minut. Następnie, za pomocą planimetru zmierzono powierzchnię nacieku. WHC obliczono jako stosunek powierzchni mięśnia (cm²) do powierzchni uwolnionej wody (cm²) i wyrażono w procentach.

5.2.4. Ocena zawartości kolagenu ogólnego

Zawartość kolagenu ogólnego dokonano metodą kolorymetryczną według McCormick [1999]. Koncentrację kolagenu wyrażono w µg na miligram liofilizowanej tkanki mięśniowej.

Przygotowano 100 mg naważki zliofilizowanej tkanki mięśniowej. Do każdej z prób dodano kwas solny (HCl – 6N). Następnie próby umieszczono

w piecu i pozostawiono na 15 – 16 h. Po inkubacji próby przefiltrowano i 10 ml roztworu przeniesiono do plastikowych tub. 1 ml roztworu przeznaczono na analizę zawartości kolagenu ogólnego, zaś 9 ml pozostawiono w celu oznaczenia zawartości hydroksylizylopirydynoliny (HLP). 1 ml roztworu przeniesiono na ceramiczne parowniczkę i umieszczono w kąpiel wodnej (60° - 65°C) (Fot. 1, 2). Do prób dwukrotnie dodawano po 1 ml wody destylowanej. Następnie po odparowaniu próby do sucha, parowniczkę przepłukano wodą. Próby przeniesiono do szklanych kuwet i dodano wodę destylowaną i roztwór chloraminy T, każdą z prób zworteksowano. Następnie do prób dodano 3,15 M kwasu nadchlorowego HClO_4 . Na koniec dodano roztwór p – dimetyloaminobenzaldehydu, próby przeniesiono do kąpiel wodnej (60°C) i pozostawiono na 20 minut. Po ochłodzeniu prób przeniesiono po 1 ml każdej z nich do kuwet i umieszczono w spektrofotometrze (Fot. 3, 4).

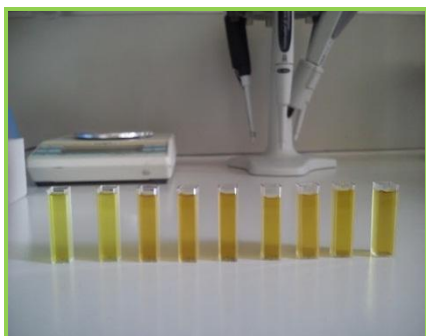


Fot. 1. Kąpiel wodna



Fot. 2. Parowniczkę odparowane do sucha

Pomiar długość fali sepktofotometru ustawiono na 570 nm. Kuwety umieszczono w uchwycie z roztworem odniesienia i zmierzono poziom absorbancji.



Fot. 3. Kuwety spektrofotometryczne



Fot. 4. Spektrofotometr

5.2.5. Ocena zawartości hydroksylizylopirydynoliny (HLP)

Zawartość hydroksylizylopirydynoliny (HLP) określono za pomocą metody Eyre i wsp. [1984]. Hydroksylizylopirydynolinę wyekstrahowano ze 100 mg tkanki mięśniowej poddanej liofilizacji, przez selektywną elucję z kolumny CF1 z celulozą. Przygotowano 100 mg naważki zliofilizowanej tkanki mięśniowej. Do każdej z prób dodano kwas solny (HCl – 6N), następnie próby hydrolizowano przez 15 – 16 h. Po inkubacji próby przefiltrowano i 10 ml roztworu przeniesiono do plastikowych tub. 1 ml roztworu pozostawiono w celu oznaczenia zawartości kolagenu ogólnego, zaś 9 ml próby przeniesiono do balona i odparowano w 65°C za pomocą wyparki obrotowej. Następnie każdą z prób umieszczono w kolumnach, na fazie stacjonarnej i przemyto fazą mobilną oraz wodą destylowaną. Roztwór zebrano w falcony. Za pomocą pipety Pasteura usunięto pozostałości fazy ruchomej, która została zdeponowana na powierzchni cieczy. Do wody, którą przeniesiono do balona dodano pirydoksaminy (standard wewnętrzny) i odparowano na wyparce obrotowej, do momentu, gdy na dnie kolby pozostało 1 ml roztworu. Pozostałość roztworu przeniesiono do próbek eppendorf. Następnie w każdym umieszczono koncentrator i koncentrowano próby do chwili osadzenia stałego depozytu na dnie próbówki. Do każdej próbówki dodano 1% kwasu heptafluoromasłowego. Kwas został usunięty za pomocą pipety, resztę roztworu przeniesiono do filtra strzykawki i przecedzono do kolejnej próbówki eppendorf. Następnie próby naniesiono na kolumny chromatograficzne. Stężenie pozostałości HLP z próbek obliczono w oparciu o stężenie kolagenu, przy założeniu, że masa cząsteczkowa kolagenu wynosi 300,000 i wydajność molowa fluorescencji pirydoksaminy jest 3,1 razy większa od HPL. Jej zawartość wyrażono w molach, jako mol HLP na mol kolagenu oraz w µg HLP na mg liofilizowanej tkanki.

5.2.6. Ocena zawartości cholesterolu

Zawartość cholesterolu określono według metody Maraschiello i wsp. [1996]. Analizę zawartości cholesterolu wykonano w dwóch powtórzeniach. 100 mg naważki zliofilizowanej tkanki mięśniowej umieszczono w 10 ml plastikowych tubach. Następnie do każdej z nich dodano wodorotlenek potasu (KOH), próby umieszczono w kąpeli wodnej (80°C) na czas 1h. Następnie dwukrotnie do każdej próby dodano chlorek sodu (NaCl) i zworteksowano, po czym dodano mieszaninę eteru dietylowego i heksanu. Następnie próby zwirowano. Mieszaninę, która osadziła się w górnej warstwie próby umieszczono w kolbie kulistej. Próby umieszczono w wyparce obrotowej i odparowano do sucha w temperaturze 30°C (Fot. 5, 6). Następnie do kolby dodano mieszaninę acetonitrylu i izopropanolu, w stosunku 1:1. Próby przeniesiono do próbek eppendorf i analizowano przy użyciu wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC (Kontron Instruments,

Mediolan, Włochy), model 535, wyposażony w kolumnę C18 z odwróconymi fazami (250 x 4,6 mm x 5 m, Hamilton Company, Szwajcaria). Fazę ruchomą stanowił acetonitryl / 2 – propanol (55: 45 obj/obj), przy szybkości przepływu 1,2 ml / min. Długość fali detekcji wynosiła 210 nm, czas retencji 12,89 minuty.



Fot. 5. Kolby kuliste



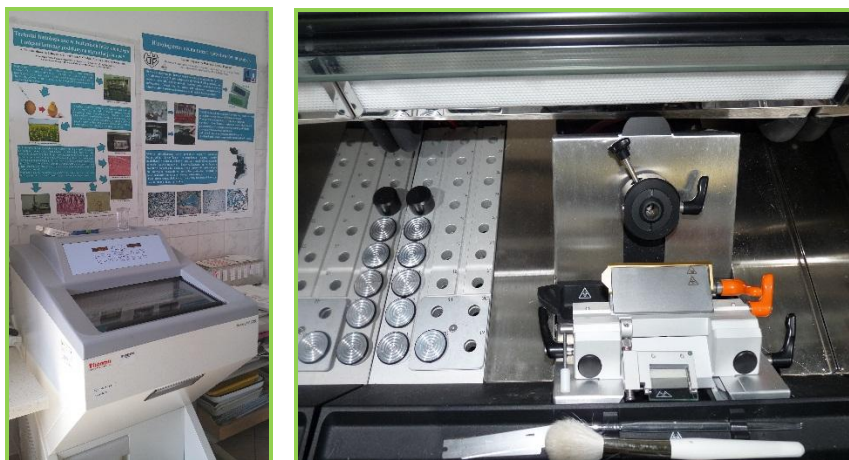
Fot. 6. Wyparka rotacyjna

5.3. OCENA MIKROSTRUKTURY MIĘŚNI PIERSIOWYCH

Preparaty histologiczne do oceny mikrostruktury mięśni piersiowych przygotowano za pomocą techniki kriokatowej (mrożeniowej). Technika ta polega na jednoczesnym utwardzeniu i utrwaleniu materiału biologicznego przez jego zamrożenie w ciekłym azocie (-196°C). Przed zamrożeniem tkankę poddano działaniu oparów ciekłego azotu (-80°C). Następnie zamrożone w ciekłym azocie próbki mięśnia piersiowego powierzchownego (*musculus pectoralis superficialis*) (Ryc. 7, 8) ścinano w kriostacie firmy Leica na skrawki o grubości $10\text{ }\mu\text{m}$ (Fot. 9, 10). Następnie skrawki przenoszono na szkiełka podstawowe i poddawano procesom barwienia stosując odmienne reakcje histochemiczne. Oceny mikrostruktury dokonano na podstawie 6 barwień, w tym celu łącznie sporządzono 300 preparatów mikroskopowych.



Fot. 7, 8. Próbki mięśnia piersiowego powierzchownego (*musculus pectoralis superficialis*)



Fot. 9, 10. Ścinanie próbek w kriostacie

5.3.1. Barwienie hematoksyliną i eozyną (H+E)

Barwienie H + E według Dubowitz i Brooke [1973], stosowane jest najczęściej w histologii i rutynowej histopatologii. Zasadowy barwnik, jakim jest hematoksylina barwi na niebiesko jądra komórkowe i rybosomy. Kwaśny barwnik eozyna barwi białka oraz cytoplazmę na różowo lub różowo – czerwono.

Preparaty osuszone w temperaturze pokojowej utrwalano w roztworze 4% zbuforowanej formaliny. Następnie zanurzono w roztworze hematoksyliny i 0,1% eozyny i przepłukano wodą destylowaną. Preparaty kolejno zanurzano w ciągu alkoholowym: 70%, 96% oraz 100%. Na koniec szkiełka umieszczono w odczynniku Rotihstol, a następnie zaklejono szkiełkiem nakrywkowym, przy użyciu balsamu kanadyjskiego.

Preparaty przygotowane za pomocą tego barwienia wykorzystano do pomiaru średnicy włókien mięśniowych, ich gęstości oraz do określenia zmian histopatologicznych występujących w mięśniu piersiowym kurcząt. Gęstość włókien mięśniowych (liczba włókien/1mm²) obliczono ze średniej liczby włókien w przeliczeniu na 1mm². Analiza histopatologiczna obejmowała oznaczenie ilościowe zmian takich jak: atrofia włókien mięśniowych, włókna olbrzymie, zmiany kształtu włókien (trójkątne, trapezowate, wydłużone), martwica włókien z fagocytozą, rozszczepienie włókien (tzw. *splitting*) oraz subiektywną ocenę przerostu tkanki łącznej [Hausmanowa – Petrusiewicz, 1999]. Zmiany, których nie można było przedstawić w formie liczbowej (nacieki zapalne, przerost tkanki łącznej), zostały rozpatrzone pod kątem ich rozległości, stosując oznaczenia:

- 0 - brak zmian,
- + - zmiana o małej rozległości,
- ++ - zmiana rozległa,
- +++ - zmiana bardzo rozległa.

5.3.2. Barwienie czerwienią oleistą (Oil Red)

Barwienie według metody Dubowitz i Brooke [1973], zastosowano w celu identyfikacji tłuszczu śródmięśniowego. Barwnik rozpuszcza się w tłuszczu, powodując jego zabarwienie na kolor czerwony.

Preparaty osuszone w temperaturze pokojowej utrwalano w roztworze 4% zbuforowanej formaliny, przepłukano wodą. Następnie barwiono w roztworze czerwieni oleistej i przepłukano wodą destylowaną. Na koniec preparaty zamknięto szkiełkiem nakrywkowym, uprzednio zatapiając w glicero – żelatynie.

5.3.3. Reakcja na aktywność reduktazy terazolinowej NADH - TR

Reakcję według metody Ziegana [1979], zastosowano w celu wyróżnienia dwóch typów włókien mięśniowych różniących się aktywnością enzymatyczną:

- włókna o wysokiej i pośredniej aktywności NADH – TR, włókna oksydacyjne wolno i szybko kurczące się i wybarwiające się na kolor niebieski.
- włókna o niskiej aktywności NADH – TR, włókna białe, szybko kurczące się i wybarwiające się na kolor jasny, słomkowy.

Preparaty osuszono w temperaturze pokojowej i umieszczono na tacy. Następnie na skrawki nałożono płyn inkubacyjny. Preparaty inkubowano w cieplarni (37°C) przez 1 h. Po inkubacji preparaty zanurzano w 4% formalinie, przepłukano wodą destylowaną. Na koniec preparaty zatopiono i zamknięto szkiełkiem nakrywkowym używając glicero – żelatyny.

5.3.4. Barwienie PAS (Periodic Acid - Schiff)

Reakcja przeprowadzona została według metody Dubowitz i Brooke [1973], która pozwala wykryć obojętne wielocukry. Metodą PAS dodatnio barwią się wszystkie struktury tkankowe i komórkowe, w tym wewnątrzkomórkowe złogi glikogenu. Na skutek działania kwasu nadjodowego (HIO_4) materiał ulega utlenieniu, grupy glikolowe zostają przekształcone w grupy aldehydowe. Następnie, za pomocą odczynnika Schiffa (odbarwiona forma fuksyny zasadowej) wielocukry wybarwiają się na kolor purpurowoczerwony lub fioletowy.

Preparaty utrwalano w płynie Carnoya. Następnie przepłukano w wodzie destylowanej i zanurzano w kwasie nadjodowym. Przepłukano wodą destylowaną i zanurzano w odczynniku Schiff'a. Następnie szkiełka wprowadzono do roztworu pirosiarczynu sodu i zanurzano w bieżącej wodzie. Przepłukano wodą destylowaną i przeprowadzono przez ciąg alkoholowy: 50%, 70%, 80%, 96% 100%. Następnie preparaty zanurzano w odczynniku Rotihistol i zamknięto szkiełkiem nakrywkowym używając balsamu kanadyjskiego.

5.3.5. Barwienie kapilar

W barwieniu zastosowano reakcję na fosfatazę zasadową obecną w śródbłonku naczyń kapilarnych według metody Browna i wsp. [1976]. Celem było wybarwienie kapilar na kolor brązowo – czarny, co pozwoliło ocenić stopień ukrwienia mięśnia piersiowego.

Preparaty osuszono w temperaturze pokojowej, utrwalano w roztworze 4% zbuforowanej formaliny i przepłukano wodą destylowaną. Następnie zanurzono w płynie inkubacyjnym i inkubowano w cieplarni (37°C). Po inkubacji preparaty przepłukano dokładnie w wodzie destylowanej następnie zanurzono w roztworze H_2S i przepłukano kolejno wodą bieżącą oraz destylowaną. Preparaty zamknięto szkiełkiem nakrywkowym w glicero – żelatynie.

5.4. ANALIZA OBRAZU MIKROSKOPOWEGO

Gotowe preparaty poddano ocenie mikroskopowej przy zastosowaniu programu MuliScan v. 14.02 (Computer Scanning System II, Warszawa) (Fot. 11).



Fot. 11. Program do komputerowej analizy preparatów histologicznych

Na powierzchni 1 mm^2 określono: średnią średnicę włókien mięśniowych, udział procentowy włókien oksydacyjnych i glikolitycznych, procentowy udział glikogenu oraz stopień ukrwienia mięśnia, a także zidentyfikowano zmiany histopatologiczne. Procentowy udział śródmięśniowej tkanki tłuszczowej analizowano na powierzchni 2 mm^2 .

5.5. ANALIZA STATYSTYCZNA

Dla wszystkich badanych cech sporządzono opis statystyczny obliczając dla każdej z nich średnią arytmetyczną ($\bar{x}$) i odchylenie standardowe (SD). Istotność różnic między badanymi grupami badano przy pomocy analizy wariancji jednoczynnikowej ANOVA oraz testu Duncana. Wszystkie obliczenia uzyskano przy użyciu programu komputerowego STATISTICA AXAP, wersja 10.0 MR1 nr licencji AXAP407G93011FA – M.

6. WYNIKI

6.1. WYLĘGOWOŚĆ ORAZ CECHY UŻYTKOWE KURCZĄT BROJLERÓW

Wyniki dotyczące wylęgowości oraz cech użytkowych kurcząt brojlerów zostały zestawione w tabeli 2. Najniższą wylęgowość stwierdzono w grupie 2 i grupa ta różniła się statystycznie istotnie z grupą 1 ($p < 0,05$). Analizując wyniki produkcyjne, zaobserwowano istotny wpływ prebiotyku Bi²tos (grupa 3) na masę ciała kurcząt ($p < 0,05$). Masa ciała kurcząt iniekowanych tym prebiotykiem była najwyższa, natomiast najniższe masy ciała posiadały kurczęta z grupy kontrolnej (grupa 1) oraz z grupy, w której zastosowano inulinę (grupa 2). Nie stwierdzono wpływu iniekowanych substancji na pozostałe badane cechy użytkowe, tj. wydajność tuszki i mięśni piersiowych, FCR oraz EWW.

Tabela 2. Wpływ prebiotyków i synbiotyków podanych *in ovo* w 12. dobie rozwoju na cechy użytkowe kurcząt brojlerów w 35. dobie życia

CECHA	GRUPA					
		1	2	3	4	5
Wylęgowość (%)**	$\bar{X}$	92,72 ^a	89,58 ^b	91,82 ^{ab}	92,42 ^{ab}	91,43 ^{ab}
	SD	0,00	1,44	0,58	1,15	0,87
Masa ciała (g)	$\bar{X}$	2064 ^c	2061 ^c	2140 ^a	2120 ^{ab}	2093 ^{bc}
	SD	0,213	0,229	0,232	0,240	0,248
Wydajność rzeźna tuszki (%)	$\bar{X}$	67,95	66,59	63,76	65,37	65,43
	SD	4,72	6,89	6,36	8,75	9,20

Wydajność mięśnia piersiowego (%)	$\bar{x}$	58,96	57,93	58,36	58,04	59,42
	SD	1,89	3,05	2,62	3,10	3,55
FCR**	$\bar{x}$	1,562	1,541	1,548	1,556	1,549
	SD	0,051	0,045	0,036	0,057	0,031
EWV**	$\bar{x}$	378	379	389	387	380
	SD	35	23	25	36	25

*% wylęgowość kurcząt z 9000 szt. jaj poddanych w 12. dobie rozwoju iniekcji *in ovo* substancjami bioaktywnymi

** wskaźnik obliczony dla 455 sztuk kurcząt brojerów

a, b – różnice statystycznie istotne między grupami przy $p < 0,05$

1 – Grupa kontrolna, 2 – Grupa iniekowana prebiotykiem inuliną, Grupa 3 – Grupa iniekowana prebiotykiem Bit²os, 4 – Grupa iniekowana synbiotykiem (*Lactococcus lactis subsp. lactis* IBB SC1 + inulina); 5 – Grupa iniekowana synbiotykiem (*Lactococcus lactis subsp. cremoris* IBB SL1 + Bit²os)

Liczebność osobników w każdej grupie n=10.

6.2. CECHY JAKOŚCI MIĘSA DROBIOWEGO

W tabelach 3 i 4 przedstawiono parametry odnoszące się do cech jakości mięsa. Stwierdzono istotnie większą zawartość kolagenu ogólnego (IMC – intramuscular collagen) w grupie 3, w porównaniu do grupy 4 i 5. W przypadku zawartości hydroksylizylopirydynoliny (HLP) wyrażonej w mol/mol kolagenu istotnie więcej tego związku zawierały mięśnie kurcząt z grupy 4 w porównaniu do grupy 3. Także najwyższą ilość HLP wyrażoną w $\mu\text{g}/\text{mg}$ liofilizowanej tkanki mięśniowej, stwierdzono w mięśniach kurcząt z grupy 4, i grupa ta różniła się istotnie z grupą 5 ($p < 0,05$). Analiza zawartości cholesterolu w tkance mięśniowej wykazała jego największą zawartość w grupie 1, najniższą zaś w grupie 3. Badane grupy nie różniły się jednak ze sobą istotnie statystycznie.

Tabela 3. Zawartość kolagenu ogólnego (IMC), hydroksylizylopirydynoliny (HLP) oraz cholesterolu w mięśni piersiowym 35. dniowych kurcząt iniekowanych *in ovo* w 12. dobie rozwoju substancjami bioaktywnymi

CECHA	GRUPA					
		1	2	3	4	5
Kolagen ogólny (µg/mg liofilizowanej tkanki mięśniowej)	$\bar{X}$	12,51 ^{ab}	12,80 ^{ab}	13,51 ^a	12,14 ^b	11,97 ^b
	SD	1,62	1,00	1,29	1,16	0,66
HLP (mol/mol kolagenu)	$\bar{X}$	0,078 ^{ab}	0,078 ^{ab}	0,067 ^b	0,092 ^a	0,073 ^{ab}
	SD	0,03	0,02	0,01	0,02	0,02
HLP (µg/mg liofilizowanej tkanki mięśniowej)	$\bar{X}$	1,35 ^{ab}	1,42 ^{ab}	1,29 ^{ab}	1,58 ^a	1,24 ^b
	SD	0,30	0,40	0,24	0,24	0,36
Cholesterol (mg/100gr liofilizowanej tkanki mięśniowej)	$\bar{X}$	73,11	72,97	69,54	70,14	71,31
	SD	4,87	9,72	9,45	7,76	5,76

a, b – różnice statystycznie istotne między grupami przy $p < 0,05$

1 – Grupa kontrolna, 2 – Grupa iniekowana prebiotykiem inuliną, Grupa 3 – Grupa iniekowana prebiotykiem Bit²os, 4 – Grupa iniekowana synbiotykiem (*Lactococcus lactis subsp. lactis* IBB SC1 + inulina); 5 – Grupa iniekowana synbiotykiem (*Lactococcus lactis subsp. cremoris* IBB SL1 + Bit²os)

Liczebność osobników w każdej grupie n=10.

W badanych grupach oznaczono również pH mięśnia piersiowego, a także jego barwę (parametry L*, a*, b*) i wodochłonność (WHC), wyrażoną jako procent wody luźnej w mięsie. Substancje bioaktywne nie wpłynęły istotnie na pH mierzone 45' po uboju kurcząt oraz na parametry składowe barwy analizowane po 24h. Zaobserwowano natomiast różnice istotne statystycznie między grupami ptaków mierząc pH po 24h. Istotnie wyższe pH₂₄ stwierdzono w grupie 2, w porównaniu do grupy 3. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono również, że podanie *in ovo* prebiotyków i synbiotyków wpłynęło

istotnie na jasność barwy mięsa w 45 minut po uboju kurcząt. Parametr ten był istotnie wyższy w grupie 5 w porównaniu z grupą 4. Wśród wartości parametrów a*(barwa czerwona) i b*(barwa żółta) nie odnotowano różnic istotnych statystycznie. Najbardziej korzystną WHC stwierdzono w grupie 1 (kontrolnej) i grupa ta różniła się istotnie z grupą 3, 4 i 5 ($p < 0,01$).

Tabela 4. Wartość pH oraz parametrów L*, a*, b* dla mięśnia piersiowego kurcząt 35. dniowych iniekowanych *in ovo* w 12. dobie rozwoju substancjami bioaktywnymi

CECHA		GRUPA					
			1	2	3	4	5
pH	45'	$\bar{X}$	6,62	6,57	6,61	6,59	6,58
		SD	0,12	0,20	0,12	0,13	0,13
	24h	$\bar{X}$	5,85 ^{ab}	5,91 ^a	5,79 ^b	5,82 ^{ab}	5,86 ^{ab}
		SD	0,09	0,10	0,07	0,10	0,11
45'	L*	$\bar{X}$	47,10 ^{ab}	47,62 ^{ab}	47,10 ^{ab}	45,81 ^b	48,54 ^a
		SD	2,50	1,89	1,83	1,54	2,92
	a*	$\bar{X}$	5,06	5,06	4,87	5,11	4,95
		SD	0,80	1,61	0,82	1,02	1,47
	b*	$\bar{X}$	3,32	2,77	2,75	3,28	2,90
		SD	0,59	1,09	1,02	0,83	1,38

24h	L*	$\bar{X}$	53,16	52,95	54,24	53,90	52,78
		SD	1,68	1,53	1,39	2,62	2,55
	a*	$\bar{X}$	6,45	6,82	6,69	6,17	6,06
		SD	1,75	1,66	1,02	1,55	1,41
	b*	$\bar{X}$	3,78	3,67	3,88	3,88	4,21
		SD	1,43	1,31	1,47	1,26	1,05
WHC (%)		$\bar{X}$	19,94 ^B	21,06 ^{AB}	23,28 ^A	22,56 ^A	22,85 ^A
		SD	2,66	2,38	1,48	1,05	2,15

A, B – różnice statystycznie istotne między grupami przy $p < 0,01$

a, b – różnice statystycznie istotne między grupami przy $p < 0,05$

1 – Grupa kontrolna, 2 – Grupa iniekowana prebiotykiem inuliną, Grupa 3 – Grupa iniekowana prebiotykiem Bit²os, 4 – Grupa iniekowana synbiotykiem (*Lactococcus lactis subsp. lactis* IBB SC1 + inulina); 5 – Grupa iniekowana synbiotykiem (*Lactococcus lactis subsp. cremoris* IBB SL1 + Bit²os)

Liczebność osobników w każdej grupie n=10.

6.3. CECHY MIKROSTRUKTURY MIĘŚNI PIERSIOWYCH

W badanych grupach kurcząt dokonano analizy następujących cech mikrostruktury mięśnia piersiowego: pomiar średnicy włókien mięśniowych (Fot. 12), procentowy udział włókien oksydacyjnych i glikolitycznych (Fot. 13), stopień ukrwienia mięśnia (Fot. 14), procentowy udział glikogenu (Fot. 15) oraz śródmięśniowej tkanki tłuszczowej (Fot. 16) na badanej powierzchni mięśnia. Cechy mikrostruktury zestawiono w tabeli 5. Biorąc pod uwagę profil enzymatyczny włókien mięśniowych należy podkreślić, że w mięśni piersiowym kurcząt przeważały włókna glikolityczne (ok. 80% - 87%). Inulina w połączeniu z probiotykiem (grupa 4) niekorzystnie wpłynęła na liczbę włókien oksydacyjnych, ponieważ w grupie tej odnotowano ich najmniejszy udział. Najwięcej włókien oksydacyjnych stwierdzono w grupie kontrolnej, a co za tym idzie, grupa ta charakteryzowała się najmniejszym udziałem włókien glikolitycznych ($p < 0,05$). Nie odnotowano natomiast istotnych różnic

między grupami kurcząt w odniesieniu do grubości (średnicy) włókien mięśniowych. Ukrwienie mięśnia piersiowego wyrażono jako liczbę kapilar przypadającą na 1mm² powierzchni badanego mięśnia oraz liczbę kapilar, jaka przypadała na 1 włókno mięśniowe. W obu badanych przypadkach nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic między grupami kurcząt. Wpływ czynnika doświadczalnego zaznaczył się w przypadku zawartości glikogenu oraz tłuszczu śródmięśniowego. Istotnie mniej glikogenu w mięśniach posiadały osobniki z grupy 2, w porównaniu do pozostałych grup. Natomiast najmniej śródmięśniowej tkanki tłuszczowej stwierdzono w grupie 1 (3,05%), w porównaniu z grupą 3, gdzie zawartość tłuszczu była najwyższa i wynosiła aż 6,30% (p<0,01).

Tabela 5. Cechy mikrostruktury mięśnia piersiowego powierzchownego kurcząt 35. dniowych iniekowanych *in ovo* w 12. dobie rozwoju substancjami bioaktywnymi

CECHA		GRUPA					
			1	2	3	4	5
Udział procentowy włókien mięśniowych	Oksydatywne (wykazujące wysoką aktywność NADH-TR)	$\bar{X}$	20,05 ^a	14,18 ^{ab}	17,21 ^{ab}	13,14 ^b	14,69 ^{ab}
		SD	6,47	5,19	4,67	4,51	4,43
	Glikolityczne (wykazujące niską aktywność NADH-TR)	$\bar{X}$	79,95 ^b	85,82 ^{ab}	82,79 ^{ab}	86,86 ^a	85,31 ^{ab}
		SD	6,47	5,19	4,67	4,51	4,43
Średnica włókien mięśniowych (μm)	Oksydatywne (wykazujące wysoką aktywność NADH-TR)	$\bar{X}$	32,21	34,39	36,02	30,34	32,40
		SD	6,03	4,27	6,80	4,56	2,07
	Glikolityczne (wykazujące niską aktywność NADH-TR)	$\bar{X}$	49,09	48,67	46,67	44,94	47,67
		SD	3,66	5,18	4,78	3,59	4,15

Średnia średnica włókien mięśniowych (μm)	$\bar{X}$	41,60	40,99	39,43	37,93	38,02
	SD	4,29	5,57	2,30	3,22	4,19
Gęstość włókien mięśniowych (liczba włókien/1mm ²)	$\bar{X}$	147,90	172,13	178,90	188,33	184,75
	SD	21,50	47,73	41,47	34,02	55,14
Liczba kapilar/1 mm ²	$\bar{X}$	151	143	161	185	154
	SD	37	38	37	41	46
Liczba kapilar/włókno mięśniowe	$\bar{X}$	1,34	1,35	1,35	1,22	1,40
	SD	0,22	0,27	0,24	0,30	0,26
Glikogen (% powierzchni)	$\bar{X}$	59,02 ^A	41,90 ^B	56,86 ^A	58,03 ^A	64,69 ^A
	SD	12,92	6,21	13,98	8,83	6,25
Tłuszcz śródmięśniowy (% powierzchni)	$\bar{X}$	3,05 ^B	3,84 ^B	6,30 ^A	5,15 ^{AB}	4,30 ^{AB}
	SD	1,18	2,20	3,17	2,24	1,60

A, B – różnice statystycznie istotne między grupami przy $p < 0,01$

a, b – różnice statystycznie istotne między grupami przy $p < 0,05$

1 – Grupa kontrolna, 2 – Grupa iniekowana prebiotykiem inuliną, Grupa 3 – Grupa iniekowana prebiotykiem Bit²os, 4 – Grupa iniekowana synbiotykiem (*Lactococcus lactis subsp. lactis* IBB SC1 + inulina); 5 – Grupa iniekowana synbiotykiem (*Lactococcus lactis subsp. cremoris* IBB SL1 + Bit²os)

Liczebność osobników w każdej grupie n=10.

W tabeli 6 oraz na wykresie 1 zestawiono wyniki dotyczące detekcji zmian histopatologicznych w mięśni piersiowym kurcząt brojlerów. Procentowy udział prawidłowych włókien mięśniowych w *musculus pectoralis superficialis* wahał się od 82,54 do 91,87%. Najwięcej włókien prawidłowych zaobserwowano w grupie 4, a najmniej w grupie 2 ($p < 0,01$). Na obniżenie poziomu włókien prawidłowych wpłynęło występowanie zmian takich jak:

atrofia (Fot.17), włókna olbrzymie (Fot. 18), zmiany kształtu włókien (Fot. 19), martwica włókien z fagocytozą (Fot. 20) oraz rozszczepienie włókna (Fot. 21).

Tabela 6. Zmiany histopatologiczne (%) występujące w mięśniu piersiowym powierzchniowym kurcząt 35. dniowych, po podaniu *in ovo* w 12. dobie rozwoju substancji bioaktywnych

Grupa		1	2	3	4	5
Prawidłowe włókna	$\bar{X}$	83,29 ^{BC}	82,54 ^C	90,34 ^{AB}	91,87 ^A	90,76 ^{AB}
	SD	9,68	6,14	2,19	3,10	2,12
Atrofia włókna	$\bar{X}$	3,87	4,18	4,04	2,29	2,93
	SD	3,05	2,73	2,20	1,47	1,88
Włókna olbrzymie	$\bar{X}$	0,18	0,26	0,04	0,00	0,00
	SD	0,39	0,38	0,13	0,00	0,00
Zmiany kształtu włókien	$\bar{X}$	5,47 ^A	5,15 ^A	1,24 ^B	1,01 ^B	2,58 ^{AB}
	SD	4,25	4,20	1,13	1,09	1,18
Martwica włókien	$\bar{X}$	5,60	6,03	4,03	3,76	2,34
	SD	4,30	5,94	2,58	1,81	2,05
Rozszczepienie włókna	$\bar{X}$	1,59 ^{ab}	1,84 ^a	0,31 ^b	1,17 ^{ab}	1,33 ^{ab}

A, B – różnice statystycznie istotne między grupami przy $p < 0,01$

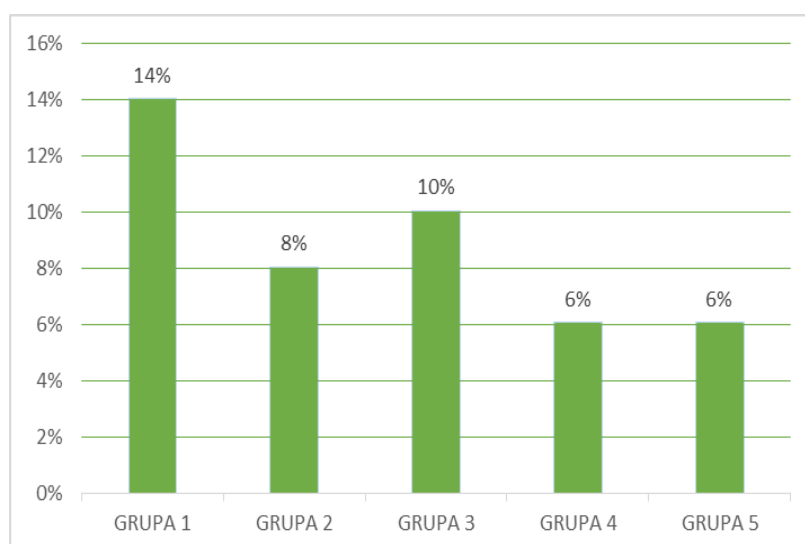
a, b – różnice statystycznie istotne między grupami przy $p < 0,05$

1 – Grupa kontrolna, 2 – Grupa iniekowana prebiotykiem inuliną, Grupa 3 – Grupa iniekowana prebiotykiem Bit²os, 4 – Grupa iniekowana synbiotykiem (*Lactococcus lactis subsp. lactis* IBB SC1 + inulina); 5 – Grupa iniekowana synbiotykiem (*Lactococcus lactis subsp. cremoris* IBB SL1 + Bit²os)

Liczebność osobników w każdej grupie n=10.

W przypadku występowania takich zmian jak atrofia, czy martwica włókien, nie stwierdzono różnic statystycznie istotnych między badanymi grupami. Zaobserwowano natomiast, że w grupach kurcząt iniekowanych synbiotykami nie występowały włókna olbrzymie, tak charakterystyczne w obrazie mikroskopowym mięśnia kurcząt brojlerów. Najwięcej włókien o zmienionym kształcie na przekroju poprzecznym odnotowano w grupie 1 i 2, grupy te różniły się z grupami 3 i 4 ($p < 0,01$). Ponadto, w grupie 3 zaobserwowano mniejszy udział występowania rozszczepienia włókien, w porównaniu do grupy 2 ($p < 0,05$). U osobników, u których stwierdzono przerost tkanki łącznej, zakwalifikowano go jako zmianę o małej rozległości („+”) i wykazywało go 14% kurcząt z grupy 1, 10% kurcząt z grupy 3, 8% kurcząt z grupy 2 oraz po 6% kurcząt z grup 4 i 5 (Wykres 1).

Wykres 1. Udział (%) kurcząt wykazujących przerost tkanki łącznej w mięśniu piersiowym powierzchownym



7. Dyskusja

7.1. Wylęgowość oraz cechy użytkowe kurcząt brojlerów

Wpływ na wylęgowość piskląt ma bardzo wiele czynników. Poza technologią lęgu wylęgowość zależy od: jakości skorupy (grubości, porowatości, odporności na zgniecenie) oraz treści jaja, pośrednio zaś od warunków utrzymania, żywienia oraz zdrowotności stada [Krawczyk i wsp., 2012].

W badaniach własnych najmniejszym procentem wylęzonych piskląt charakteryzowała się grupa iniekowana prebiotykiem inuliną i grupa ta różniła się istotnie z grupą kontrolną (Tabela 2). Pomimo tego, wylęgowość w badaniach własnych była wysoka, bo jak podają Krawczyk i wsp. [2012] w wylęgarniach, w których zapewnione są optymalne warunki, wylęgowość kurcząt mięsnych wynosi 88 – 90% piskląt. Jak wynika z badań Zhai i wsp. [2011a] substancje odżywcze podane *in ovo* nie miały wpływu na wylęgowość kurcząt. W badaniach Cox i wsp. [1992] stwierdzono, że iniekcja do komory powietrznej jaja, w porównaniu z iniekcją do płynu owodniowego jest bardziej wydajna i nie obniża wylęgowości piskląt. Edens i wsp. [1997] donoszą, że miejsce podania substancji iniekcyjnej nie miało istotnego wpływu na wylęgowość kurcząt. W przypadku iniekcji dwóch probiotyków, bardziej skuteczna w porównaniu do *Bacillus subtilis* okazuje się szczepionka zawierająca bakterie *Enterococcus faecium*. Pomimo tego, wylęgowość w grupie kontrolnej była najwyższa i wyniosła 100% [De Oliveira i wsp., 2014]. W badaniach Shashidhara i Devegowda [2003] dodatek MOS do paszy wpłynął pozytywnie na wylęgowość brojlerów Cobb użytkowanych nieśnie. Różnice w otrzymanych wynikach mogą być uzależnione od czynników takich jak: miejsce iniekcji, rodzaj, właściwości i dawka iniekowanej substancji, a także technologia inkubacji jaj [Bednarczyk i wsp., 2011; De Oliveira i wsp., 2014].

Ptaki coraz częściej ubija się wcześniej, w 32 – 33. dniu, co pozwala obniżyć koszty produkcji oraz uniknąć, głównie w przypadku samic, nadmiernego pobierania paszy i odkładania tkanki tłuszczowej w organizmie [Samarakoon i Samarasinghe, 2012]. W badaniach własnych ptaki również ubito wcześniej – w 35. dobie życia. Iniekcja synbiotyków i prebiotyków wpłynęła istotnie na średnią masę ciała ptaków. Najwyższą masę ciała (Tabela 2) stwierdzono w grupie, której podano do jaja prebiotyk Bi²tos (grupa 3). Najniższe masy ciała natomiast posiadały kurczęta z grupy kontrolnej (grupa 1) oraz z grupy, w której zastosowano inulinę (grupa 2). Podobne spostrzeżenia poczynili Awad i wsp. [2008; 2009], którzy stwierdzili, iż synbiotyki dodany do paszy istotnie wpłynął na zwiększenie masy ciała kurcząt w 35. dniu odchovu.

Jednakże masy te były znacznie niższe, niż masy otrzymane w badaniach własnych. W badaniach Swamy i Upendra [2013] pasza wzbogacona w probiotyki wpłynęła istotnie na masę ciała ptaków w 35. dniu odchowu. Jednakże średnie masy ciała również były znacznie niższe, niż masy uzyskane w badaniach własnych. W porównaniu do badań Pilarskiego i wsp. [2005] dodatek RFO i FOS wpłynął na wzrost masy ciała kurcząt brojlerów w 42. dobie życia. Zbliżone wyniki otrzymali Bednarczyk i wsp. [2011], prebiotyki RFO's wpłynął istotnie na wzrost masy ciała ptaków Ross 708 w 42. dniu odchowu. Wyższą średnią masę ciała odnotowali w swoich badaniach także Koransio i wsp. [2011], którzy w 18. dobie rozwoju zarodkowego do owodni podawali roztwór węglowodanów. W badaniach Maiorano i wsp. [2012], w grupach, którym podano *in ovo* prebiotyki i synbiotyki podobnie, jak w badaniach własnych, średnie masy ciała kurcząt były najwyższe.

W produkcji drobiarskiej brojlery stanowią podstawowy surowiec rzeźny. Roczne przyrosty masy ciała brojlerów wynoszą 50 – 55 g, zaś wydajność mięśnia piersiowego wzrasta o 1 % [Grabowski i Kijowski, 2004]. W badaniach własnych substancje bioaktywne nie wpłynęły istotnie na wydajność tuszki oraz mięśni piersiowych (%). Procentowa wydajność tuszki mieściła się w granicach od 63,76% (grupa 3) do 67,95% (grupa 1). Podobne wyniki otrzymali Awad i wsp. [2009]. Na wydajność tuszki wpłynął synbiotyki (prebiotyki Biomin IMBO + *Lactobacillus* sp.), w grupie tej wydajność wyniosła 66,77% i była najwyższa ze wszystkich grup. Z kolei, zarówno w badaniach Maiorano i wsp. [2012], jak i w badaniach Pelicano i wsp. [2003; 2005] po podaniu *in ovo* substancji bioaktywnych oraz zastosowaniu ich w paszy i wodzie, wydajność tuszek kurcząt była znacznie wyższa niż w badaniach własnych i wynosiła ponad 70%. Wydajność mięśni piersiowych kształtowała się na poziomie od 57,93% (grupa 2) do 59,42% (grupa 5). Znacznie niższą wydajność mięśni piersiowych w swoich badaniach otrzymali Pelicano i wsp. [2003, 2005] oraz Nunes i wsp. [2012]. Zarówno w badaniach własnych, jak i w w/w publikacjach zauważa się brak istotnego wpływu probiotyków, prebiotyków i synbiotyków na procentową wydajność mięśni piersiowych.

Koszty żywienia brojlerów stanowią około 70% całkowitej produkcji [Willems i wsp., 2013]. Sprawność przetwarzania i wykorzystania paszy przez ptaki jest ważnym czynnikiem warunkującym opłacalność produkcji. Efektywność żywienia, na poziomie biologicznym można modulować na wiele sposobów, chociażby poprzez skrócenie czasu odchowu ptaków. Każdego roku czas odchowu brojlerów kurzych zostaje skrócony średnio o 0,75 dnia [Gunasear, 2006]. Standardowa wydajność brojlerów w 42. dobie tuczu wynosi 2,5 kg żywej wagi, zaś wielkość wskaźnika FCR (Feed Conversion Ratio – wskaźnik konwersji paszy) 1,72 [Creswell, 2005]. Jednakże wpływ substancji bioaktywnych na wskaźnik konwersji paszy nie jest jednoznaczny [Ahmad, 2006]. Mohan i wsp. [1996] oraz Chiang i Hsieh [1995] donoszą, że korzystny wpływ probiotyków na przyrosty masy oraz końcową masę ciała widoczny jest dopiero między 28. a 42. dniem odchowu, a w przypadku wskaźnika FCR

między 21. a 42. dniem [Fritts i wsp., 2000]. Podobne spostrzeżenia poczynili Jin i wsp. [1996], którzy stosowali w probiotyki takie jak: *Lactobacillus* i *B. subtilis*. Z kolei inni autorzy sugerują, że probiotyki nie wpływają na wskaźnik konwersji paszy [Panda i wsp., 1999; 2000; Ergun i wsp., 2000]. Potwierdzeniem są wyniki badań własnych. Iniekcja substancji bioaktywnych do jaja nie wpłynęła istotnie na wskaźnik FCR. Podobne wyniki otrzymali w swoich badaniach Jung i wsp. [2008]. Wielkość wskaźnika FCR w badaniach własnych, w 34. dniu (Tabela 2) odchowu była porównywalna z wynikami uzyskanymi przez Shabani i wsp. [2012], którzy w żywieniu ptaków stosowali substancje probiotyczne. W obu doświadczeniach wartość wskaźnika FCR była wyższa w grupach kontrolnych. Odmienne wyniki otrzymał Biernasiak i Śliżewska [2009], w których wskaźnik FCR był wyższy w grupie doświadczalnej. W badaniach, gdzie zastosowano 0,1% kwas mlekowy [Jang i wsp., 2004], wskaźnik FCR 35. dniowych kurcząt był znacznie wyższy niż w badaniach własnych, jednakże jego wartość nadal pozostawała najwyższa w grupie kontrolnej. Podobne wyniki otrzymano w badaniach, w których w paszy podano ptakom synbiotyki Biomin IMBO. Wartość FCR wyniosła 1,75 i była najniższa spośród badanych grup [Awad i wsp., 2009]. Jak podaje Nabizadeh [2012] dodatek 0,5% i 1% inuliny wpłynął na obniżenie wskaźnika FCR, którego wartość kształtowała się na poziomie kolejno: 1,76 i 1,67, w grupie kontrolnej FCR wyniósł 1,79. Zbliżone wielkości wskaźnika FCR do badań własnych otrzymali także Maiorano i wsp. [2012], którzy w 12. dobie rozwoju podali *in ovo* prebiotyki RFO's i synbiotyki, który zawierał RFO's oraz takie same szczepy bakterii LAB, które zastosowano w badaniach własnych. Jak podają Koksai i wsp. [2013] dodatek komercyjnego prebiotyku, który zawierał MOS oraz glukany, w połączeniu z opóźnionym dostępem do wody przyczynił się do obniżenia wskaźnika FCR w 42. dniu odchowu kurcząt. W 28. dniu wielkość tego wskaźnika wyniosła 1,53 i była zbliżona do wskaźnika uzyskanego w badanych grupach: 2 i 3. W badaniach Kim i wsp. [2011] wzbogacenie diety 28. dniowych kurcząt w MOS i FOS nie wpłynęło istotnie na FCR. Wskaźnik ten, w porównaniu do wyników własnych był wyższy we wszystkich grupach. Według Pym i Nicholls [1979] za pobranie paszy oraz jej konwersję odpowiadają różne fizjologiczne mechanizmy, jednakże autorzy nie podają jakiego rodzaju. Na wielkość wskaźnika FCR może wpływać wiele czynników, m. in.: dawka, skład substancji bioaktywnych, także skład paszy [Koksai i wsp., 2013].

Efektywność odchowu w produkcji drobiarskiej ocenia się za pomocą Europejskiego Wskaźnika Wydajności (EWW). Wskaźnik ten stosuje się w celu porównania efektów produkcyjnych uzyskiwanych w różnych warunkach chowu kurcząt rzeźnych, przy różnym żywieniu i zagęszczeniu ptaków. W badaniach własnych wielkość wskaźnika EWW była najwyższa w grupach doświadczalnych, gdzie zastosowano prebiotyki Bi²tos (grupa 3) oraz synbiotyki (grupa 4 i 5). Jednakże, w badanych grupach nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie. Wartość wskaźnika EWW znacznie przekraczała wielkość

wskaźnika stwierdzoną w badaniach Biernasiaka i Śliżewskiej [2009], gdzie zastosowano preparat probiotyczny oraz w doświadczeniu Brzóska [2007], gdzie badano wpływ synbiotyku (LAB + MOS). Podobne rezultaty jakie otrzymano w badaniach własnych odnotowano w badaniach Janochy i wsp. [2010]. Inulina zastosowana w badaniach własnych nie wpłynęła na wzrost wskaźnika EWW, w przeciwieństwie do rezultatów jakie uzyskał Nabizadeh [2012], stosując w diecie 42. dniowych kurcząt 0,5% oraz 1% dodatek inuliny. Z kolei, jak wynika z badań Bednarczyka i wsp. [2011] podanie *in ovo* prebiotyku RFO's również nie wpłynęło na wskaźnik wydajności brojlerów Ross 708.

7.2. CECHY JAKOŚCI MIĘSA DROBIEGO

Najbardziej wartościowym składnikiem mięsa są białka. Stanowią około 80% suchej masy substancji oraz 18 – 22% masy tkanki [Kortz, 2001]. Białko zwierzęce zawiera wszystkie aminokwasy egzogenne niezbędne do budowy struktur organizmu. Spośród białek łącznotkankowych największy wpływ na teksturę mięsa ma kolagen. Jest to białko, które ze względu na swoją budowę, obniża wartość biologiczną mięsa. Jest głównym składnikiem śródmięśniowej tkanki łącznej i pełni ważną rolę w kształtowaniu twardości mięsa [Liu i wsp., 1996]. Białko to stanowi 20 – 30% wszystkich białek organizmu [McCormick, 1999]. Mała ilość kolagenu wpływa na lepszą jakość mięsa, dzięki czemu mięso łatwiej poddaje się obróbce termicznej i jest łatwostrawne. Jednakże, jak podają Coró i wsp. [2003] komercyjnie utrzymywane brojlery ubijane są w takim wieku, w którym ilość kolagenu w mięśniach nie jest wysoka i nie wpływa negatywnie na teksturę mięsa. Udział kolagenu w mięśniach drobiu jest stosunkowo niski i wynosi 2,5% w mięśniach piersiowych i 6,5 % w mięśniach uda [Grabowski i Kijowski, 2004]. U drobiu zawartość kolagenu zmienia się wraz z wiekiem, w mięśniach piersiowych obserwuje się spadek jego zawartości, natomiast w mięśniach uda wzrost. Jak podają Das i wsp. [2010] ilość kolagenu zależy od wzrostu mięśni oraz średnicy włókien mięśniowych. Wraz z wiekiem wzrasta również usieciowanie kolagenu, związane z zawartością hydroksylizylopirydynoliny (HLP). Jej ilość decyduje o stopniu dojrzałości kolagenu [Eyre, 1984; Field i wsp., 1996]. Hydroksylizylopirydynolina u młodych zwierząt zwiększa stabilność mechaniczną włókien kolagenowych, jednocześnie zmniejsza jego rozpuszczalność [Field i wsp., 1996]. W badaniach własnych istotnie większą zawartość kolagenu stwierdzono w mięśni piersiowym kurcząt, którym w 12. dobie zainiektowano prebiotyk Bit²tos (Tabela 3). Jednocześnie w grupie tej ilość HLP wyrażona w mol/ mol kolagenu była najniższa, co może świadczyć o jego słabszym usieciowaniu. Jak podają Field i wsp. [1996] niska koncentracja HLP powinna pozytywnie wpływać na kruchość mięsa. Z kolei McCormick [1999] donosi, że zarówno wzrost zawartości kolagenu, jak i HLP skutkuje obniżeniem kruchości mięsa. Istotnie mniejszą zawartość kolagenu odnotowano w grupach, którym podano

synbiotyki (grupa 4 i 5). W przypadku HLP wyrażonej w mol/mol kolagenu, jej zawartość była najwyższa w grupie 4. Podobną tendencję w odniesieniu do komercyjnego synbiotyku Duolac (*L. acidophilus*, + *Streptococcus faecium* + laktoza), w swoich badaniach zauważyli Maiorano i wsp. [2012], którzy badali wpływ substancji bioaktywnych podanych *in ovo* na cechy jakości mięsa 42. dniowych kurcząt brojlerów. W badaniach własnych, w przypadku HLP wyrażonej w µg/mg zliofilizowanej tkanki mięśniowej jej koncentracja była najwyższa w grupie, której podano synbiotyki zawierający inulinę. W badaniach Maiorano i wsp. [2012] ilość HLP wyrażonej w µg/mg zliofilizowanej tkanki mięśniowej była znacznie wyższa niż w badaniach własnych. Pomiędzy grupami nie odnotowano istotnych różnic w jej zawartości, jednakże najwięcej HLP posiadały mięśnie kurcząt z grupy traktowanej komercyjnym synbiotykiem Duolac.

Zawartość lipidów, w tym cholesterolu, zależy przede wszystkim od gatunku zwierzęcia, wieku, płci, systemu odchowu oraz od części tuszki, a także od metod oznaczania cholesterolu w próbie [Marcinkowska – Lesiak i wsp., 2013]. Z kolei, jak podają Dinh i wsp. [2011] wpływ na zawartość cholesterolu mają uwarunkowania genetyczne zwierząt, różnice w poziomie absorpcji i syntezy cholesterolu, masa ciała, rozmieszczenie poszczególnych typów włókien mięśniowych oraz ilość podskórnej i śródmięśniowej tkanki tłuszczowej. W przypadku cholesterolu, jego ilość oznaczona w badaniach własnych była zbliżona do wyników otrzymanych przez Cianciullo [2011/2012] i kształtowała się na poziomie od 69,54 do 73,11 mg/100g liofilizowanej tkanki mięśniowej. Pilarski i wsp. [2005] donoszą, że dodatek FOS do paszy wpłynął na obniżenie poziomu cholesterolu u 42. dniowych kurcząt brojlerów Hybro G. Z kolei w badaniach Salmy i wsp. [2007], zawartość cholesterolu w grupie kontrolnej była najwyższa i wyniosła 93,6 mg/100g. Mięso drobiu nie zawiera dużych ilości cholesterolu, jego zawartość w mięśniach piersiowych waha się w granicach ok. 50 – 70 mg/100g [Grabowski i Kijowski, 2004]. Jak podają Ayerza i wsp. [2002] jego ilość w mięśniach białych wynosi od 50 do 51 mg/100g. W niniejszych badaniach nie wykazano wpływu substancji bioaktywnych na poziom cholesterolu w mięśniach. Jego ilość nie była wysoka. Co prawda, zaobserwowano tendencję, że największa zawartość cholesterolu w grupie kontrolnej (73,11 mg/100g), była związana z największym procentowym udziałem włókien oksydacyjnych (20,05%). Jednakże, z badań Dinh i wsp. [2011] wynika, że włókna wykazujące aktywność tlenową nie zawsze zawierają większą ilość cholesterolu w porównaniu z włóknami o aktywności glikolitycznej.

Wartość pH, czyli stopień zakwaszenia tkanki mięśniowej jest jednym z bardziej powszechnych kryteriów oceny jakości mięsa. Wartość pH jest wskaźnikiem intensywności przemian glikolitycznych zachodzących w mięśniach, która jest podstawą do różnicowania jakości mięsa, jego przydatności technologicznej oraz twardości [Wnuk i wsp., 2013]. Jak podają Van Lack i wsp. [2000] pH końcowe jest ważnym czynnikiem określającym jakość mięsa.

Selekcja prowadzona w kierunku obniżenia pH końcowego może prowadzić do pojawienia się mięsa typu PSE (Pal – jasne, Soft – miękkie, Exudative - wodniste) lub też mięsa, które po obróbce termicznej jest twarde i nie nadaje się do przetwórstwa. Z drugiej strony, selekcja w kierunku wyższego pH mięśni kurcząt pozwala zwiększyć wydajność produkcji, ale negatywnie wpływa na jakość sensoryczną oraz trwałość mięsa w czasie przechowywania [Allen i wsp., 1997]. W zależności od wartości pH mierzonego w 15 minut po uboju, opracowano podział mięsa drobiowego na: mięso normalne ($pH = 5,9 - 6,2$), mięso wadliwe PSE ($pH < 5,7$) i DFD (Dark – ciemne, Firm – twarde, Dry – suche) ($pH > 6,4$) [Trojan i Niewiarowicz, 1971; Niewiarowicz, 1978]. W chwili uboju tkanka mięśniowa ma odczyn zbliżony do obojętnego. Po uboju następuje spadek pH i wzrasta stopień zakwaszenia mięsa. Jak podają Bihan – Duval i wsp. [2008] obniżenie wartości pH końcowego prowadzi do pojawienia się mięsa o jasnej barwie, większym wycieku wody oraz miękkiej strukturze. W badaniach własnych wartość pH mierzona po 45 minutach mieściła się w granicach od 6,57 do 6,62 i była zbliżona do wartości pH uzyskanych przez Maiorano i wsp. [2012]. Jednakże, jak podają Jakubowska i wsp. [2004] wartość pH_{15} nie zawsze oddziałuje na inne cechy jakości mięsa. W badaniach własnych zróżnicowanie między badanymi grupami w przypadku pH mięsa odnotowano dopiero po 24h. Istotnie wyższe pH_{24} w porównaniu do grupy 3 (5,79) miały mięśnie kurcząt z grypy 2 (5,91) (Tabela 4). Wartości te również były zbliżone do wyników uzyskanych przez Maiorano i wsp. [2012]. W przypadku badań Pellicano i wsp. [2003; 2005] oraz Jakubowskiej i wsp. [2014] dodatek probiotyków i prebiotyków w paszy i wodzie nie wpłynął istotnie na pH mięsa kurcząt brojlerów. Jego wartość mierzona 24h po uboju była zbliżona do wyników własnych. Podobne rezultaty otrzymali Park i Kim [2014]. Wartość pH w grupie traktowanej najwyższą dawką probiotyku była identyczna z pH otrzymanym w grupie, w której zastosowano prebiotyk Bit²os. Wpływ na kwasowość mięsa mają zarówno czynniki genetyczne, jak i środowiskowe. Na skutek stresu ilość glikogenu w mięśniach ptaków może być niższa, niż w bezstresowych warunkach. Proces glikolizy w mięśniu piersiowym kończy się przy pH powyżej 6,4. Mamy wówczas do czynienia z mięsem DFD. Podczas uboju wysoka temperatura przyspiesza glikolizę, w warunkach takich, na skutek „długotrwałego stresu cieplnego” mięso bardzo często staje się jasne, miękkie i wodniste – syndrom PSE. Mięso takie, w porównaniu do normalnego ma niższe pH, bardzo małą zdolność utrzymania wody własnej, niespoistą, nieelastyczną, rozmiękczoną teksturę oraz nienaturalnie bladą barwę [Saxena i wsp., 2009].

Barwa mięsa jest ważną cechą handlową, którą kierują się konsumenci przy zakupie mięsa i jest ściśle związana z jego świeżością i jakością [Fletcher 1999; Qiao i wsp., 2001; Salákova i wsp., 2009; Wnuk i wsp., 2013]. Jest również ważnym elementem końcowej oceny jakości gotowej potrawy czy produktu. Najbardziej pożądaną barwą świeżego mięsa jest jasnoczerwona barwa, mniej pożądana jest purpuroczerwona, natomiast niepożądaną barwą jest

brązowobrunatna. W przypadku mięsa drobiowego, przyjmuje się, że naturalną barwą jest barwa od szarobiałej do matowoczerwonej [Jurczak, 2005]. Qiao i wsp. [2001] na podstawie barwy mięsni piersiowe kurcząt klasyfikują następująco: barwa jaśniejsza niż normalna – $L^* > 53$, mięso o barwie normalnej – $48 < L^* < 53$ oraz mięso ciemniejsze niż normalne – $L^* < 48$. Natomiast, w powiązaniu z pH końcowym mięsa Soares i wsp. [2009] oceniają mięso według odpowiednich klas jakości: $L^* \geq 53$ – mięso PSE, $L^* \leq 44$ mięso DFD oraz $44 < L^* < 53$ – mięso normalne. W badaniach własnych synbiotyku z dodatkiem prebiotyku Bit²os istotnie wpłynął na wzrost jasności barwy mierzonej w 45 minut po uboju. Z kolei synbiotyku z dodatkiem inuliny spowodował istotne zmniejszenie wartości tego parametru. Jasność barwy (L^*) mierzona 45 minut po uboju, kształtowała się na poziomie od 45,81 do 48,54 i była zbliżona do wartości jakie otrzymali Pelicano i wsp. [2005] mierząc jasność barwy (L^*) 5 godzin po uboju. Nieznacznie wyższe wartości jasności barwy otrzymano na skutek dodania probiotyku do wody [Pelicano i wsp., 2003]. Różnice te jednak nie były istotne statystycznie. Wartość wskaźnika L^* otrzymana po 24h była zbliżona do wyników jakie otrzymali Jakubowska i wsp. [2014] oraz Park i Kim [2014]. Uzyskane w badaniach własnych wartości wskaźników a^* i b^* zarówno po 45 minutach, jak i po 24 godzinach były wyższe niż uzyskane przez Pelicano i wsp. [2003, 2005] i znacznie niższe od wyników otrzymanych od Park i Kim [2014]. Z kolei wyniki własne były zbliżone do wyników otrzymanych w badaniach Khalafalla i wsp. [2011], którzy w paszy zastosowali dodatek *B. subtilis*. Przyczyną różnic w otrzymanych wynikach może być rodzaj zastosowanej substancji bioaktywnej oraz sposób jej podania. Wpływ na barwę mięsa drobiowego mają również takie czynniki jak: płeć, wiek, wysiłek, przetwarzanie mięsa, czynniki chemiczne, temperatura obróbki termicznej mięsa, napromieniowanie [Fletcher, 2002]. O barwie mięśni decyduje ilość, stężenie mioglobiny (Mb) oraz jej przemiany, głównie pod wpływem tlenu. Hemoglobina (Hb) w mniejszym stopniu oddziałuje na barwę [Grabowski i Kijowski, 2004; Augustyńska – Prejsnar i Sokołowicz, 2014]. Zawartość barwników hemowych kształtujących barwę mięsa zależy od gatunku zwierzęcia, wieku, płci, sposobu żywienia, rodzaju mięśni i ich przyżyciowej aktywności, a także stopnia wykrwawienia. Czynnikiem, który również oddziałuje na barwę jest kwasowość mięsa (pH). Środowisko kwaśne (pH 5,8 – 6,2) stabilizuje korzystną barwę mięsa, przy pH 6,3 – 6,4 mięso przybiera barwę ciemnoczerwoną, charakterystyczną dla mięsa typu DFD [Grabowski i Kijowski, 2004], zaś pH < 5,6 związane jest zazwyczaj z jasną barwą mięsa i syndromem PSE [Kralik i wsp., 2014 za Medić i wsp., 2009]. W badaniach własnych pH mierzone po 45 minutach od uboju kurcząt było stosunkowo wysokie i wskazywało na występowanie mięsa DFD. Spadek wartości pH po 24 godzinach świadczył o prawidłowym przebiegu przemian glikolitycznych w mięśniach *post mortem*, jednak nadal pH końcowe wskazywało na wadę DFD. Natomiast wobec uzyskanych wartości stężenia jonów wodorowych, wyniki pomiarów jasności barwy L^* mięsa są trudne do

jednoznacznej interpretacji. Wskazują one na mięso jasne, blade (charakterystyczne dla PSE), a nie, jak należałoby się spodziewać, na ciemne, występujące w przypadku mięsa DFD. Jak podają Pietrzak i wsp. [2013] za Berri i wsp. [2005]; Fanatico i wsp. [2005]; Werner i wsp. [2008]; Gornowicz i wsp. [2009]; Rycielska i wsp. [2010], Mikulski i wsp. [2011]; Michalczuk i wsp. [2012], średnie pH końcowe mięśni piersiowych kurcząt brojlerów kształtuje się na poziomie 5,6 – 6,1. W przypadku parametru L^* , jego wartość u kurcząt brojlerów może wynosić od 41 do 67.

Jak podaje Kortz [2001] barwa mięsa nieustannie ulega zmianom. Na zawartość barwników hemowych wpływa ilość tłuszczu, zdolność wiązania wody, czas i warunki przechowywania mięsa oraz stopień zmęczenia i zestresowania zwierząt, procesy związane z przebiegiem postępowania przedubojowego, a także sposób oszłamiania i wykrwawiania [Pisula i Pospiech, 2011]. Barwa mięśni zależy również od proporcji włókien mięśniowych białych i czerwonych. Mięśnie czerwone zawierają więcej barwnika niż białe i są lepiej ukrwione. U drobiu do tego typu mięśni zalicza się mięśnie nóg, które zawierają co najmniej 50% włókien czerwonych. W mięśniu piersiowym znajduje się więcej białych włókien (co najmniej 60%) o niskiej zawartości mioglobiny [Grabowski i Kijowski, 2004]. W grupie 4 zaobserwowano najniższą wartość parametru L^* , która może wiązać się z niską zawartością mioglobiny. Blade mięśnie piersiowe charakteryzują się wyższą wartością jasności barwy (L^*), mięso ma jaśniejszą barwę, jest bardziej żółte, zawiera mniej mioglobiny i żelaza, a jego pH jest niższe [Boulianne i King, 1995]. Ciemne mięśnie piersiowe mają znacznie więcej pigmentu, mioglobiny i żelaza, wartość jasności barwy jest niższa, a pH wyższe, barwa mięsa jest zbliżona do barwy mięsa normalnego [Boulianne i King, 1998].

Z barwą mięsa skorelowana jest wodochłonność mięsa. Jest to zdolność utrzymywania przez tkankę mięśniową wody własnej i dodanej, pomimo działania ciśnienia czy ogrzewania. Jak podają Grabowski i Kijowski [2004] jest to pęczliwość mięśni i określa się ją, jako przyrost objętości i masy po wchłonięciu wody. Zacieśnianie i rozluźnianie struktury mięsa zachodzi pod wpływem poubojowych procesów, a także zmian wartości pH. WHC jest powiązana z cechami organoleptycznymi mięsa jak: soczystość, barwa czy smak. Mięśnie piersiowe kurcząt charakteryzują się lepszą wodochłonnością niż mięśnie udowe. Niska wartość pH mięsa powiązana jest z niską wodochłonnością. W badaniach własnych, w grupie 1 stwierdzono najkorzystniejszą WHC, w porównaniu z grupami: 3, 4 i 5 ($p < 0,01$). W grupie 3, zaś wartość WHC kształtowała się na poziomie 23,28% i była najwyższa ze wszystkich grup doświadczalnych. W badaniach Park i Kim [2014] udowodniono, że wyższe dawki substancji probiotycznej wpłynęły na wzrost WHC mięsa. Różnice te nie były jednak istotne statystycznie. Natomiast Ali [2010] w swoich badaniach odnotował, że istotnie wyższą, korzystną wartością parametru WHC charakteryzowały się mięśnie kurcząt żywionych paszą z dodatkiem *B. subtilis*, w porównaniu do grupy kontrolnej.

7.3. CECHY MIKROSTRUKTURY MIĘŚNI PIERSIOWYCH

Temat dotyczący substancji bioaktywnych podawanych *in ovo* i ich wpływu na mikrostrukturę mięśni jest bardzo rzadko podejmowany. Pomimo ważnej roli, jaką zaczęły pełnić probiotyki, prebiotyki i synbiotyki w żywieniu zwierząt, w dostępnej literaturze można znaleźć niewiele tego typu badań [Cianciullo, 2011/2012; Maiorano i wsp., 2012]. Niniejsza praca jest próbą szerszej oceny i interpretacji wyników w oparciu o cechy jakości oraz mikrostruktury *musculus pectoralis superficialis* kurcząt brojlerów, którym podczas rozwoju embrionalnego podano *in ovo* substancje bioaktywne.

Badania z zakresu nauk o zwierzętach od wielu lat skupiają się na zrozumieniu istoty procesu wzrostu i rozwoju mięśni szkieletowych. Analiza molekularnych i histologicznych podstaw powstawania mięśni umożliwia opracowanie skutecznych metod poprawy ilości oraz jakości mięsa. Mięśnie szkieletowe stanowią złożony i heterogenny kompleks, który pełni różne funkcje w organizmie [Bentzinger i wsp., 2012]. Wpływ na rozwój mięśni szkieletowych ssaków i ptaków ma proliferacja, różnicowanie oraz powstawanie mioblastów [McFarland, 1999]. Włókna mięśni szkieletowych ptaków powstają podczas rozwoju embrionalnego. Określenie struktury i funkcji mięśni ma miejsce w okresie inkubacji. Masa mięśni jest determinowana przez całkowitą liczbę włókien mięśniowych, ich wielkość oraz typ [Rehfeldt i wsp., 1999]. W momencie wylęgu piskląt włókna są już uformowane [Velleman, 2007]. Ich wzrost kontynuowany jest w okresie postnatalnym i trwa aż do osiągnięcia dojrzałości [Halevy i wsp., 2004]. Wzrost mięśni w okresie postnatalnym polega głównie na zwiększaniu się ich wielkości (hipertrofia – wzrost masy i objętości komórek) [Chen i wsp., 2013]. Liczba włókien mięśniowych jest determinowana przez wiele czynników genetycznych i środowiskowych. W przypadku ssaków i ptaków liczba włókien pozostaje niezmienna [Rehfeldt i wsp., 1999]. Badania nad histochemiczną aktywnością mięśni szkieletowych sięgają XVII w. Na podstawie koloru mięśni dokonano ich podziału na czerwone oraz białe. Jest to najstarszy, klasyczny podział [Kłosowska, 1984]. Istnieje wiele metod umożliwiających wyróżnienie i klasyfikację typów włókien mięśniowych [Dubowitz, 1965; Ashmore i Doerr, 1971; Dubowitz i Brooke, 1973; Kłosowska, 1984]. Badania nad związkiem pomiędzy morfologią, a funkcją mięśni, pozwoliły stwierdzić, że włókna czerwone kurczą się powoli i dlatego nazwano je włóknami wolnymi, zaś białe mają dużą prędkość kurczenia się i nazwano je włóknami szybkimi [Dubowitz, 1965].

Jak podają Smith i wsp., [1993] mięsień piersiowy kurcząt broilerów w 96% składa się z włókien glikolitycznych (białe). W badaniach własnych udział włókien oksydacyjnych wyniósł od 13,14% do 20,05%, włókna glikolityczne, zaś stanowiły od 79,95% do 86,86% wszystkich włókien (Tabela 5). Istotnie mniejszy udział włókien białych stwierdzono w grupie kontrolnej, w porównaniu do grupy, której podano synbiotyki (*Lactococcus lactis subsp.*

lactis + *inulina*). Substancje bioaktywne miały także istotny wpływ na udział procentowy włókien oksydacyjnych w mięśni. Istotnie mniej włókien oksydacyjnych, w porównaniu do grupy kontrolnej stwierdzono w grupie 4. Po wylęgu włókna czerwone ulegają transformacji we włókna białe, a w okresie późniejszego wzrostu, we włókna pośrednie [Seideman i wsp., 1984]. Dało to podstawę, do tego aby w badaniach własnych dokonać oceny wpływu substancji bioaktywnych na dwa typy włókien mięśniowych: o metabolizmie tlenowym oraz o metabolizmie glikolitycznym. Iniekcja *in ovo* prebiotyków i synbiotyków nie wpłynęła istotnie na średnice włókien mięśniowych. W badaniach Maiorano i wsp. [2012] iniekcja substancji bioaktywnych wpłynęła na zwiększanie średnic włókien mięśniowych w grupach doświadczalnych. Podobnie jak w badaniach własnych różnice pomiędzy grupami nie były istotne. Iniekcja węglowodanów HMB (β – hydroksy – β – metylomaślanu) również wpłynęła na zwiększenie średnic włókien w mięśni piersiowym brojlerów Cobb 500 w 35. dniu odchovu [Koransio i wsp., 2011]. Podobne wyniki otrzymali Zhou i wsp., [2015], średnice włókien mięśniowych kurcząt żywionych dodatkiem probiotyku były największe. Wzrost średnicy włókien, a co za tym idzie masy mięśni piersiowych jest pozytywnym efektem działania substancji bioaktywnych. Mięśnie piersiowe są najbardziej pożądaną częścią tuszki, stanowią około 30% jej masy. Wzrost ich wydajności jest bardzo ważny z punktu widzenia ekonomicznego [Marcu i wsp., 2013; 2014]. Z drugiej strony może to prowadzić do nadmiernego rozrostu włókien hipertroficzných. Jak podają Dransfield i Sośnicki [1999] u szybko rosnących ptaków częściej pojawiają się włókna olbrzymie, o powierzchni 3 do 5 – krotnie większej niż włókna normalne. Ponadto włókna te charakteryzują się szybszym spadkiem wartości pH, mięso takie jest bardziej podatne na występowanie zmian PSE [Barbut i wsp., 2008]. W badaniach własnych, w mięśniach kurcząt iniekowanych synbiotykami, pomimo, największego udziału włókien glikolitycznych, nie znaleziono włókien olbrzymich. Z kolei wyższa liczba włókien o małych i średnich średnicach wpływa na polepszenie cech jakości mięsa [Choi i Kim, 2009].

Masa mięśni jest determinowana przez liczbę włókien mięśniowych oraz ich średnicę [Rehfeld i wsp., 1999]. Jak podają Mobini i Asadi [2013] w mięśni czworogłowym uda drobiu domowego stwierdza się wyższy udział włókien, niż mięśni kurcząt brojlerów Ross. Nastomiast Scheuermann i wsp. [2004] donoszą, że mięśnie samców brojlerów charakteryzują się wyższą gęstością włókien, niż samice. Z kolei Chiang i wsp., [1995] stwierdzili, że płeć nie ma wpływu na ten parametr. Substancje bioaktywne w badaniach własnych nie wpłynęły istotnie na gęstość włókien mięśniowych, jednakże w grupach, w których zastosowano synbiotyki (grupa 4 i 5) liczba włókien przypadająca na 1 mm² była najwyższa i wyniosła odpowiednio: 188,33 i 184,75. Najmniej włókien/1mm² stwierdzono w grupie kontrolnej (grupa 1).

Mięśnie szkieletowe mają niejednorodną strukturę, różnią się prędkością skurczu oraz odpornością na zmęczenie. Typy włókien ptaków poza określoną

budową, odznaczają się specyficzną aktywnością enzymatyczną, metabolizmem oraz poziomem ukrwienia [Elminowska – Wenda i wsp., 2005]. Liczba kapilar jest proporcjonalna do poziomu metabolizmu oksydacyjnego włókien. Ilość krwi, która przepływa przez mięśnie szkieletowe wynosi około 20%. Według Hoppelera i Hudlickiej [1984] 88% kapilar w większości mięśni biegnie równolegle do ich osi. U kurcząt podczas prawidłowego rozwoju mięśni liczba kapilar przypadająca na jedno włókno mięśniowe wzrasta, spada zaś ich gęstość na jednostce powierzchni przekroju poprzecznego (CSA – Cross Sectional Area) [Hudlicka, 1985]. Wydłużanie włókna oraz wzrost jego średnicy powoduje przemieszczenie kapilar otaczających włókno [Santiago, 2001]. Intensywny wzrost zwierząt powoduje, że liczba naczyń włosowatych zaopatrujących mięsień nie jest wystarczająca, co może prowadzić do wystąpienia niedokrwienia oraz zwyrodnienia mięśni [Elminowska – Wenda, 2007; Kuttappan i wsp., 2013a;b]. Oceny wielkości łożyska naczyń kapilarnych dokonuje się poprzez określenie gęstości kapilarnej na 1mm^2 (Capillary Density – CD), bądź też przedstawiając liczbę kapilar przypadającą na 1 włókno mięśniowe (Capillary/ Fibre Ratio – C/F) [Hudlicka, 1985]. W badaniach własnych najniższą gęstość kapilarną na 1mm^2 stwierdzono w grupie 2, najwyższą zaś w grupie 4 (Tabela 5), ale różnic pomiędzy grupami nie potwierdziła analiza statystyczna. Gęstość kapilar związana jest również z wielkością włókien. Mięśnie złożone z włókien o większej średnicy są słabiej ukrwione [Hudlicka, 1985]. W badaniach własnych liczba kapilar przypadająca zarówno na 1mm^2 , jak na 1 włókno mięśniowe była niższa niż w badaniach przeprowadzonych przez Hoving – Bolink i wsp. [2000]. U kurcząt spadek liczby kapilar może być związany z obniżeniem zdolności utleniających podczas rozwoju oraz ze zmniejszonym przepływem krwi [Hudlicka, 1985].

Glikogen stanowi kluczowe źródło energii w ostatnich godzinach inkubacji zarodków ptaków [Foye i wsp., 2006; Shafey i wsp., 2012]. U dorosłych ptaków jest niezbędnym składnikiem, dostarczającym energii organizmowi. Największe jego rezerwy znajdują się w wątrobie oraz mięśniach szkieletowych. Badania własne wykazały, że większą zawartością glikogenu (% powierzchni), w porównaniu do grupy iniekowanej inuliną, charakteryzowały się mięśnie kurcząt z grup iniekowanych prebiotykami Bit²os, synbiotykami oraz z grupy kontrolnej. Z kolei, jak podają Uni i wsp., [2005] iniekcja węglowodanów do jaja nie wpłynęła istotnie na zawartość glikogenu w mięśniach ptaków. Jak podają Foye i wsp., [2006] iniekcja węglowodanów stymuluje uwalnianie insuliny, poprzez co pośrednio wpływa na wzrost zapasów glikogenu w mięśniach. W badaniach własnych istotnie mniej glikogenu posiadały mięśnie kurcząt z grupy 2, jednakże w grupie tej pH końcowe było najwyższe. Na skutek stresu, bezpośrednio przed ubojem, glikogen mógł ulec szybkiemu rozkładowi, czego skutkiem jest mniejsze zakwaszenie mięsa. Zgodnie z tym, co podają Grabowski i Kijowski [2004] niskie stężenie glikogenu wpływa na skrócenie procesu glikolizy, czego wynikiem jest wysokie końcowe pH oraz słabe stężenie pośmiertne. Wyższą

zawartość glikogenu stwierdzono również w mięśniach kurcząt iniekowanych HMB [Kornasio i wsp., 2011].

Skład chemiczny mięśnia piersiowego jest ważnym elementem kształtującym jakość mięsa. Tłuszcz, który decyduje o smaku potraw mięsnych i przetworów, wpływa na cechy sensoryczne mięsa oraz m. in. na jego teksturę [Jurczak, 2005]. W badaniach własnych zawartość tłuszczu śródmięśniowego, oznaczanego histochemicznie, w mięśniu piersiowym kurcząt była znacznie wyższa (od 3,05% do 6,30%), w porównaniu do danych literaturowych, w których ilość ta wyniosła od 0,3 – 2,9% [Gornowicz i wsp., 2009; Sláková i wsp., 2009; Pietrzak i wsp., 2013]. Dostępne obecnie na rynku mięso kurcząt brojlerów, w porównaniu z poprzednimi latami zawiera znaczenie większe ilości tłuszczu. Jak podają Kuttappan i wsp. [2012, 2013a;b] wzrost zawartości tłuszczu może być związany z występowaniem zmiany patologicznej jaką jest zespół białych włókien (white striping). Na skutek zmian degeneracyjnych we włóknach mięśniowych dochodzi do redukcji zawartości białka. Wówczas pojawia się więcej przestrzeni dla adipocytów, co wpływa na wzrost odkładania tłuszczu. Ponadto ilość tłuszczu zgromadzona w mięśniach jest powiązana z typem włókien mięśniowych. Włókna oksydatywne w porównaniu z glikolitycznymi mają więcej tłuszczu [Dinh i wsp., 2011].

Tkanka mięśniowa wykazuje dużą wrażliwość na szkodliwe czynniki. Jej cechą szczególną jest niejednakowa wrażliwość i odpowiedź na bodźce. Ponadto w tkance mięśniowej w obrębie tego samego włókna można zaobserwować występowanie zarówno procesu zwyrodnieniowego, jak i regeneracyjnego. Dlatego w diagnostyce chorób mięśniowych istotną rolę ogrywają badania histopatologiczne, które pozwalają rozpoznać schorzenie oraz w niektórych przypadkach wyjaśnić patogenezę choroby. Przyczyną zmian histopatologicznych może być niedotlenienie, zaburzenia elektrolitowe, stany infekcyjne lub toksyczne [Hausmanowa – Petrusiewicz, 1993; 1999].

W badaniach własnych oznaczono następujące zmiany patologiczne w strukturze włókien mięśniowych: atrofię, martwicę, występowanie włókien olbrzymich, rozszczepienie (*splitting*), przerost tkanki łącznej oraz zmiany kształtu włókien. W grupie iniekowanej synbiotykiem z dodatkiem inuliny stwierdzono najwięcej włókien prawidłowych (Tabela 6). W grupie tej odnotowano również mniej przypadków zmian takich jak: atrofia, zmiany kształtu włókien czy martwica. W pozostałych grupach, zaś zmiany te były bardziej rozległe. Występowanie włókien olbrzymich (GF – Giant Fibre) wielu autorów wiąże z intensywną selekcją genetyczną kurcząt [Dransfield i Sośnicki, 1999; Remignon i wsp., 2000]. Do tej pory jednak nie wykazano negatywnego wpływu tych włókien na jakość mięsa kurcząt. W badaniach własnych iniekcja substancji bioaktywnych nie wpłynęła istotnie na występowanie GF, a w przypadku grup iniekowanych synbiotykami nie zaobserwowano ich występowania. Rozszczepienie włókna oraz martwica najczęściej pojawiało się w grupie iniekowanej inuliną. Korespondujące wyniki z badaniami własnymi przedstawiła w swojej dysertacji Cianciullo [2011/2012]. Jak podają MacRae

i wsp. [2006] *splitting* jest odpowiedzią adaptacyjną na stres metaboliczny związany m. in. z funkcjonowaniem większych włókien. W przypadku atrofii, jak podają Borisov i wsp., [2001] jej obecność wskazuje na postępujący proces patologiczny. Atrofii zazwyczaj towarzyszy intensywna przebudowa łożyska kapilarnego, co prowadzi do szybkiej degeneracji kapilar. W grupie 2 odnotowano najniższą liczbę kapilar przypadającą na 1mm^2 , przy jednoczesnym największym udziale włókien atroficznych. Na wykresie 1 przedstawiono liczbę osobników z poszczególnych grup, u których stwierdzono przerost tkanki łącznej. Przerost tkanki łącznej zaklasyfikowany był, jako zmiana o małej rozległości (+). Zmian rozległych (++) i bardzo rozległych (+++) nie stwierdzono. Najwięcej osobników, u których występował przerost tkanki łącznej pochodziło z grupy kontrolnej (grupa 1), najmniej przerostu pojawiło się w mięśniach kurcząt iniekowanych synbiotykami (grupa 4 i 5). Podobny wpływ substancji bioaktywnych podawanych w postaci probiotyku stwierdzili Zhou i wsp. [2015].

8. WNIOSKI

1. Podanie *in ovo* prebiotyków lub synbiotyków w 12. dobie rozwoju embrionalnego, wpłynęło istotnie na cechy takie jak wylęgowość oraz masa ciała kurcząt brojlerów. Najwyższą masę ciała uzyskano u ptaków, którym iniekowano do komory powietrznej jaja prebiotyk Bi²tos, a najniższą w grupie kontrolnej oraz iniekowanej prebiotykiem inuliną. W grupie, której podano inulinę zanotowano również najniższą wylęgowość.
2. Nie wykazano wpływu pre- i synbiotyków na FCR, EWW oraz wydajność tuszki i mięśni piersiowych.
3. Stwierdzono istotny wpływ substancji bioaktywnych na cechy jakości mięsa badanych ptaków. Mięśnie kurcząt iniekowanych prebiotykiem Bi²tos odznaczały się największą zawartością kolagenu przy jednocześnie najniższym poziomie HLP. W grupie tej zaobserwowano również spadek wartości pH₂₄ oraz obniżenie zdolności wiązania wody w mięśniach. Wykazano korzystny wpływ synbiotyków na zawartość kolagenu mięśniowego. Ponadto synbiotyk Bi²tos + *Lactococcus lactis subsp. cremoris* IBB SL1 wpłynął pozytywnie na jasność barwy mięsa.
4. Wpływ iniekcji substancji pre- i synbiotycznych odnotowano także w przypadku oceny mikrostruktury mięśnia piersiowego powierzchownego kurcząt brojlerów. Najniższym poziomem włókien oksydacyjnych oraz najwyższym poziomem włókien glikolitycznych charakteryzowały się mięśnie ptaków iniekowanych *in ovo* synbiotykiem inulina + *Lactococcus lactis subsp. lactis* IBB SC1. Inulina wpłynęła również na obniżenie poziomu glikogenu w mięśniach, a prebiotyk Bi²tos na znaczne zwiększenie ilości śródmięśniowej tkanki tłuszczowej. W przypadku pozostałych cech histologicznych, nie stwierdzono istotnych różnic między badanymi grupami ptaków.
5. Analiza zmian histopatologicznych wykazała, że największym odsetkiem włókien prawidłowych charakteryzował się mięsień kurcząt, którym podano synbiotyk inulinę + *Lactococcus lactis subsp. lactis* IBB SC1. W mięśniu kurcząt, którym zainiekowano synbiotyki nie stwierdzono w obrazie mikroskopowym występowania włókien olbrzymich, których obecność stwierdza się w mięśniach szybko rosnących zwierząt. Ponadto iniekcja prebiotyku Bi²tos oraz synbiotyku na bazie inuliny wpłynęła korzystnie na kształt i zjawisko rozszczepienia włókien. Podanie synbiotyków wpłynęło pozytywnie na grubość śródmięśniowej tkanki łącznej.
6. Otrzymane wyniki nie dają jednoznacznej odpowiedzi na temat wpływu iniekcji *in ovo* prebiotyków i synbiotyków na cechy jakości i mikrostruktury mięśni piersiowych kurcząt brojlerów, dlatego konieczne są dalsze badania w tym kierunku.

9. SPIS PIŚMIENICTWA

1. Ahmad I. 2006. Effect of probiotics on broiler performance. Int. J. Poult. Sci. 5 (6), 593 – 597.
2. Ali F. H. M., 2010. *Probiotics Feed Supplement* to improve quality of broiler chicken carcasses. World Journal of Dairy & Food Sciences. 5 (1), 93 – 99.
3. Allen C. D., Russel S. M., Fletcher D. L., 1997. The relationship of broiler breast meat color and pH to shelf – life and odor development. Poult. Sci. 76, 1042 – 1046.
4. Amerah A. M., Quiles A., Medel P., Sánchez J., Lehtinen M. J., Gracia M. I., 2013. Effect of pelleting temperature and probiotic supplementation on growth performance and immune function of broilers fed maize/soy – based diets. Anim Feed Sci. Tech. 180, 55 – 63.
5. Apata D. F., 2009. Antibiotic resistance in poultry. Int. J. Poult. Sci. 8 (4), 404 – 408.
6. Apata D. F., 2012. The emergence of antibiotics resistance and utilization of probiotics for poultry production. Sci. J. Microbiology. 2, 8 – 13.
7. Ashmore C. R., Doerr L., 1971. Comparative aspects of muscle fiber types in different species. Exp. Neuorology. 31 (3). Abstract.
8. Augustyńska – Prejsnar A., Skołowicz Z., 2014. Czynniki kształtujące jakość sensoryczną mięsa kurcząt brojlerów. Wiad. Zoot. R LII, 2, 108 – 116.
9. Awad W. A., Ghareeb K., 2014. Some aspects of control salmonella infection in poultry for minimizing contamination in the food chain. World's Poult. Sci. J. 70, 519 – 530.
10. Awad W. A., Ghareeb K., Abdel – Raheem S., Böhm J., 2009. Effects of dietary inclusion of probiotic and synbiotic on growth performance, organ weights, and intestinal histomorphology of broiler chickens. Poult. Sci. 88, 49 – 55.
11. Awad W. A., Ghareeb K., Böhm J., 2008. Intestinal structure and function of broiler chickens on diets supplemented with a synbiotic containing *Enterococcus faecium* and oligosaccharides. Int. J. Mol. Sci. 9, 2205 – 2216.
12. Ayerza R., Coates W., Lauria M., 2002. Chia seed (*Salvia hispanica* L.) as an ω – 3 fatty acid source for broilers: influence on fatty acid composition, cholesterol and fat content of white and dark meats, growth performance, sensory characteristics. Poult. Sci. 81, 826 – 37.
13. Bailey J. S., Blankenship L. C., Cox N. A., 1991. Effect of fructooligosaccharide on *Salmonella* colonization of the chicken intestine. Poult. Sci. 70, 2433 – 2438.

14. Barbut S., Sośnicki A. A., Lonergan S. M., Knapp T., Ciobanu D. C., Gatcliffe L. J., Huffloneragan E., Wilson E. W., 2008. Progress in reducing the pale, soft and exudative (PSE) problem in pork and poultry meat. *Meat Sci.* 79, 46 – 63.
15. Baurhoo B., Ferket P. R., Zhao X., 2009. Effects of diets containing different concentrations of mannanoligosaccharide or antibiotics on growth performance, intestinal development, cecal and litter microbial populations, and carcass parameters of broilers. *Poult. Sci.* 88, 2262 – 2272.
16. Bednarczyk M., Brzezińska J., Sławińska A., Siwek M., Urbanowski M., Kasperczyk K., 2010. Technologia *in ovo* – narzędziem w nowoczesnej profilaktyce drobiu, *Biotechnologia*. 1 (88), 109 – 118.
17. Bednarczyk M., Urbanowski M., Gulewicz P., Kasperczyk K., and Maiorano G., Szwaczkowski T., 2011. Field and *in vitro* study on prebiotic effect of raffinose family oligosaccharides in chickens. *Bull Vet. Inst. Puławy*. 55, 465 – 469.
18. Bednarczyk, M., Lakota P., Zylinska J, Chmielewska M., Bardowski J. Dankowiakowska A., Maiorano. G., 2013. *In vitro* and *in vivo* selection of bioactives enabling the stimulation of chicken microbiome. *Ital. J. Anim. Sci.* 12(1s):132.
19. Bengmark S., 2001. Pre- , pro- and synbiotics. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Car.* 4, 571 – 579.
20. Bentzinger C. F., Wang Y. X., Rudnicki M. A., 2012. Building muscle: molecular regulation of myogenesis. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. 9, 1 – 17.
21. Biernasiak, J., Ślizewska, K., 2009. The effect of a new probiotic preparation on the performance and faecal microflora of broiler chickens. *Vet. Med.* 54 (11), 525 – 53.
22. Biggs P., Parsons C. M, Fahey G. C., 2007. The effects of several oligosaccharides on growth performance, nutrient digestibilities, and cecal microbial populations in young chicks. *Poult. Sci.* 86, 2327 – 2336.
23. Bihan – Duval E., Debut M., Berri C. M., Sellier N., Sante – Lhoutellier V., Jégo Y., Beaumont C., 2008. Chicken meat quality: genetic variability and relationship with growth and muscle characteristics. *BMC Genetics*. 9, 53, 1 – 6.
24. Borisov A. B., Dedkov E. I., Carlson B. M., 2001. Interrelation of myogenic response, progressive atrophy of muscle fibers, and cell death in denervated skeletal muscle. *Anat. Rec.* 264, 203 – 218.
25. Bosscher D., 2009. Fructan prebiotics derived from inulin. In: *Prebiotics i probiotics science and technology*. Vol. 1. Charalampopoulos, D. Rastall, R. A. (eds). New York, NY: Springer. 163 – 206.
26. Boulianne M., King A. J., 1995. Biochemical and color characteristics of skinless boneless pale chicken breast. *Poult. Sci.* 74, 693 – 1698.

27. Boulianne, M., King A. J., 1998. Meat color and biochemical characteristics of unacceptable dark – colored broiler chicken carcasses. *J. Food Sci.* 63(5), 759 – 762.
28. Bozkurt M., Küçükyılmaz V. A., Çabuk M., Çatli A. U., 2011. Performance of layer or broiler breeder hens varies in response to different probiotic preparations. *Ital. J. Anim. Sci.* 10 (31), 162 – 169.
29. Brown M. D., Cotter M. A., Hudlicka O., Vrbova G., 1976. The effects of different patterns of muscle activity on capillary density mechanical properties and structure of slow and fast rabbit muscles. *Pflügers Arch.* 361, 3, 241 – 250.
30. Brudnicki A., 2012. Rozwój morfologiczno – czynnościowy przewodu pokarmowego kurcząt szczepionych *in ovo* prebiotykiem ORR. Dysertacja doktorska. Uniwersytet Technologiczno – Przyrodniczy, Bydgoszcz.
31. Brzóska F., 2007. Efektywność kwasów organicznych i synbiotyku w żywieniu kurcząt rzeźnych. *Med. Wet.* 63 (7), 831 – 835.
32. Callway T. R., Edrington T. S., Harvey R. B., Anderson R. C., Nisbet D. J., 2012. Prebiotics in food animals, a potential to reduce foodborne pathogens and disease. *Rom. Biotechnol. Lett.* 17 (6), 7808 – 7815.
33. Chaveerach, P., Keuzenkamp D. A., Lipman L. J. A, Van Knapen F., 2004. Effect of organic acids in drinking water for young broilers, on *Campylobacter* infection, volatile fatty acid production, gut microflora and histological cell changes. *Poult. Sci.* 83, 330 – 334.
34. Chen W., Lv Y. T., Zhang H. X., Ruan D., Wang S., Lin Y. C., 2013. Developmental specificity in skeletal muscle of late – term avian embryos and its potential manipulation. *Poult. Sci.* 92, 2754 – 2764.
35. Chen Y. C., Nakthong C., Chen T. C., 2005a. Improvement of laying hen performance by dietary prebiotic chicory oligofructose and inulin. *Int. J. Poult. Sci.* 4 (2), 103 – 108.
36. Chen Y. C., Nakthong C., Chen T. C., 2005b. Effect of chicory fructans on egg cholesterol in commercial laying hen. *Int. J. Poult. Sci.* 4 (2), 109 – 114.
37. Chiang S. H., Hsieh W. M., 1995. Effect of direct – fed microorganisms on broiler growth performance and litter ammonia level. *Asian – Australas. J. Anim. Sci.* 8(2), 159 – 162.
38. Chiang W., Solomon M. B., Kotula K. L., 1995. Muscle fiber type of selected muscles from broiler chickens in relation to age and sex. *J. Muscle Foods.* 6, 197 – 200.
39. Chichlowski M., Croom W. J., Edens F. W., McBride B. W., Qiu R., Chiang C. C., Daniel L. R., Havenstein G. B., Koci M. D., 2007b. Microarchitecture and spatial relationship between bacteria and ileal, cecal, and colonic epithelium in chicks fed a direct – fed microbial, PrimaLac, and Salinomycin. *Poult. Sci.* 86, 1121 – 1132.
40. Chichlowski M., Croom W. J., McBride B. W., Havenstein G. B., Koci M. D., 2007a. Metabolic and physiological impact of probiotics or direct

- fed – microbials on poultry: a brief review of current knowledge. *Int. J. Poult. Sci.* 6 (10), 694 – 704.
41. Choi Y. M., Kim B. C., 2009. Muscle fiber characteristics, myofibrillar protein isoforms, and meat quality. *Livestock Science*, 122, 105 – 118.
 42. Cianciullo D., 2011/2012. Effect of prebiotic and synbiotic injected *in ovo* on performance, meat quality and histopathological changes in muscle of broiler chickens. Doctorate thesis.
 43. Collins M. D., Gibson G. R., 1999. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut, *Am. J. Clin. Nutr.* 69 (Suppl.), 1052 – 1057.
 44. Corcionivoschi N., Drinceanu D., Stef L., Luca I., Julean C., Mingyart O., 2010. Probiotics – identification and ways of action. *Innov. Rom. Food Biotechnol.* 6 (3), 1 – 11.
 45. Coró F. A. G., Youssef E. Y., Shimokomaki M., 2003. Age related changes in poultry breast meat collagen pyridinoline and texture. *J. Food Biochem.* 26, 533 – 54.
 46. Cox N. A., Bailey J. S., Blankenship L. C., Gildersleeve R. P., 1992. *In ovo* administration of a *competitive exclusion* culture treatment to broiler embryos. *Poult. Sci.* 71, 1781 – 1784.
 47. Cummings J. H., Macfarlane G. T., 2002. Gastrointestinal effects of prebiotics. *Br. J. Nut.* 87. Suppl. 2, 145 – 151.
 48. Cummings J. H., Macfarlane G. T., Englyss H. N., 2001. Prebiotic digestion and fermentation. *Am J Clin Nutr.* 73 (Suppl.), 415 – 420.
 49. Dankowiakowska A., Kozłowska I., Bednarczyk M., 2013. Probiotics, prebiotics and synbiotics in poultry – mode of action, limitation, and achievements. *JCEA.* 14 (1), 467 – 478.
 50. Das Ch., Roy B., Ch., Oshima I., Miyachi H., Nishimura S., Iwamoto H., Tabata S., 2010. Collagen content and architecture of the *pectoralis* muscle in male chicks and broilers reared under various nutritional conditions. *Anim. Sci. J.* 81, 252 – 263.
 51. De Oliveira J. E., Van der Hoeven – Hangoor E., Van de Linde I. B., Montijn R. C., Van der Vossen J. M. B. M., 2014. *In ovo* inoculation of chicken embryos with probiotic bacteria and its effect on posthatch *Salmonella* susceptibility. *Poult. Sci.* 93, 818 – 829.
 52. Dinh T. T. N., Thompson L. D., Galyean M. L., Brooks J. Ch., Patterson K. Y., Boylan M., 2011. Cholesterol content and methods for cholesterol determination in meat poultry. *CRFSFS.* 10, 269 – 288.
 53. Doktor J., 2007. Wpływ postępowania przedubojowego na jakość tuszki i mięsa kurcząt rzeźnych. *Wiad. Zoot. R.* XLV. 3, 25 – 30.
 54. Donalson L. M., McReynolds J. L., Kim W. K., Chalova V. I., Woodward C. L., Kubena L. F., Nisbet D. J., Ricke S. C., 2008. The influence of a fructooligosaccharide prebiotic combined with alfalfa molt diets on the gastrointestinal tract fermentation, *Salmonella enteritidis*

- infection, and intestinal shedding in laying hens. Poult. Sci. 87, 1253 – 1262.
55. Dransfield E., Sośnicki A. A., 1999. Relationship between muscle growth and poultry meat quality. Poult. Sci. 78, 743 – 746.
 56. Dubowitz V., 1965. Enzyme histochemistry of skeletal muscle. Part I Developing animal muscle. J. Neurol. Neurosurg. Psychiat. 28, 516 – 519.
 57. Dubowitz W., Brooke M., 1973. Muscle Biopsy: A Modern Approach. W. B. Saunders Company LDT London, Philadelphia, Toronto.
 58. Edens F. W., Parkhurst C. R., Casas I. A., Dobrogoszcz W. J., 1997. Principles of *ex ovo competitive exclusion* and *in ovo* administration of *Lactobacillus reuteri*. Poult. Sci. 76, 179 – 196.
 59. Edens F., Pierce J., 2010. Nutrigenomics: Implications for prebiotics and intestinal health. Alltech Technical Symposium. Arkansas Nutrition Conference. Rogers.
 60. Elminowska – Wenda G., 2007. Mikrostruktura mięśni szkieletowych drobiu i świń w zależności od wybranych czynników genetycznych i żywieniowych. Rozprawy nr 126. Bydgoszcz.
 61. Elminowska – Wenda G., Szpinda M., Kłosowska D., 2005. Capillaries of pectoralis and *biceps femoris* muscles in turkeys. Die Kapillaren des Brust – und Oberschenkelmuskels von Puten. Arch. Geflügelk., 69 (1), 35 – 39.
 62. Ergun, A., Yalcin S., Sacakli P., 2000. The usage of probiotic and zinc bacitracin in broiler rations. Ankara Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi. 47, 271 – 280.
 63. Eyre D. R., Koob T. J., Van Ness K. P., 1984. Quatnitiation of hydroxypyridinium crosslinks in collagen by high – performance liquid chromatography. Anal. Biochem. 137, 380 – 388.
 64. Ezema C., 2013. Probiotics in animal production: A review. J. Vet. Med. Anim. Health. 5 (11), 308 – 316.
 65. Fallah R., Kiani A., Azarfar A., 2013. A review of the role of five kinds of alternatives to in – feed antibiotics in broiler production. J. Vet. Med. Anim. Health. 5(11), 317 – 321.
 66. FAO/WHO: Working Group Report on Drafting Guide – lines for the Evaluation of Probiotics in Food, London, Ontario, Canada, April 30 and May 1, 2002.
 67. Field R. A., McCormick R. J., Brown D. R., Hinds F. C., Snowden G. D., 1996. Collagen crosslinks in longissimus muscle from lambs expressing the callipyge gene. J. Anim. Sci. 74, 2943 – 2947.
 68. Finucane M., Spring P., Newman K., 1999. Incidence of mannose sensitive adhesins in enteric bacteria. Abstracts 88th Annual Meeting Poult. Sci. 139.

69. Fletcher D. L., 1999. Broiler breast meat color variation, pH, and texture. *Poult. Sci.* 78, 1323 – 1227.
70. Fletcher D. L., 2002. Poultry meat quality. *World's Poult. Sci. J.* 58, 131 – 145.
71. Foye O. T., Uni Z., Ferket P. R., 2006. Effect of *in ovo* feeding egg white protein, β – hydroxy – β – methylbutyrate, and carbohydrates on glycogen status and neonatal growth of turkeys. *Poult. Sci.* 85, 1185 – 1192.
72. Fritts C. A., Kersey J. H., Motl M. A., Kroger E. C., Yan F., Si J., Jiang Q., Compos M. M., Waldroup A. L., Waldroup P. W., 2000. *Bacillus subtilis* C – 310 (calsporin) improves live performance and microbiological status of broiler chicken. *J. Appl. Poult. Sci.* 9, 149 – 155.
73. Fuller R., 1989. Probiotics in man and animals. *J. Applied Bacteriology*, 66, 365 – 378.
74. Gibson G. R., 1999. Dietary modulation of the human gut microflora using the prebiotics oligofructose and inulin. *J. Nutr.* 129, 1438 – 1441.
75. Gibson G. R., Roberfroid M. B., 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.* 125, 1401 – 1412.
76. Gornowicz E., Lewko L., Pietrzak M., Gornowicz J., 2009. The effect of broiler chicken origin on carcass and muscle yield and quality. *JCEA*. 109 (3), 193 – 200.
77. Górka S., Jarząb A., Gamian A., 2009. Bakterie probiotyczne w przewodzie pokarmowym człowieka jako czynnik stymulujący układ odpornościowy. *Postępy Hig. Med. Dosw.* 63, 653 – 667.
78. Grabowski T., Kijowski J., 2004. Mięso i przetwory mięsne. Technologia, higiena i jakość. Wyd. Naukowo – Techniczne Warszawa.
79. Grau R., Hamm R., 1952. Eine einfache Methode zur Bestimmung der Wasserbindung im Fleisch. *Fleischwirtschaft*. 4, 295 – 296.
80. Griggs J. P., Jacob J. P., 2005. Alternatives to antibiotics for organic poultry production. *J. Appl. Poult. Res.* 14, 750 – 756.
81. Gaaadaoui A., Benaicha S., Elmajdoub N., Bellaoui M., Hamal A., 2014. What is a bioactive compound? A combined definition for a preliminary consensus. *Int. J. Food Nutr. Sci.* 3 (3), 174 – 179.
82. Gunasekar K. R., 2006. Formulating feed for broiler performance <http://www.thepoultrysite.com/articles/560/formulating-feed-for-broiler-performance>.
83. Hajati H., Rezaei M., 2010. The application of prebiotics in poultry production. *Int. J. Poult. Sci.* 9 (3), 298 – 304.
84. Halevy O., Piastun Y., Allouh M. Z., Rosser B. W., Rinkevich Y., Reshef R., Rozenboim I., Wleklinski – Lee M., Yablonka – Reuveni Z., 2004. Pattern of pax7 expression during myogenesis in the posthatch chicken

- establishes a model for satellite cell differentiation and renewal. *Dev. Dyn.* 231, 489 – 502.
85. Hamadani H., Khan A. A., Banday M. T., Hamadani A., 2013. Early chick feeding and *in – ovo* nutrition – two managerial strategies to combat the effects of delayed feeding. *Int. J. Modern Plant & Anim. Sci.* 1 (3), 123 – 141.
 86. Hausmanowa – Petrusiewicz I., 1993. *Choroby mięśni*. Wyd. Naukowe PWN Warszawa.
 87. Hausmanowa – Petrusiewicz I., 1999. *Choroby nerwowo – mięśniowe*. Wyd. Naukowe PWN Warszawa.
 88. Heczko P. B., Strus M., Kochan P., 2006. Critical evaluation of probiotic activity of lactic acid bacteria and their effects. *J. Physiol. Pharmacol.* 57. Suppl. 9, 5 – 12.
 89. Higgins J. P., Higgins S. E., Vicente J. L., Wolfenden A. D., Tellez G., Hargis B. M., 2007. Temporal effects of lactic acid bacteria probiotic culture on *Salmonella* in neonatal broilers. *Poult. Sci.* 86, 1662 – 1666.
 90. Hooge D. M., 2004. Meta – analysis of broiler chicken pen trials evaluating dietary mannan oligosaccharide, 1993 – 2003. *Int. J. Poult. Sci.* 3 (3), 163 – 174.
 91. Hoppeler H., Hudlicka O., 1984. Capillary density with respect to oxidative potential of muscle fibres. *Microcirculation Clin. Exp.* 3, 557 – 567.
 92. Houshmand M., Azhar K., Zulkifili I., Bejo M. H., Kamyab A., 2012. Effects of prebiotics, protein level, and stocking density on performance, immunity, and stress indicators of broilers. *Poult. Sci.* 91, 393 – 401.
 93. Hoving – Bolink A. H., Kranen R. W., Klont R. E. , Gerritsen C. I. M., de Greef K. H., 2000. Fibre area and capillary supply in broiler breast muscle in relation to productivity and ascites. *Meat Sci.* 56, 397 – 402. *Anim. Sci. Biotech.* 56, 397 – 402. <http://en.engormix.com/MA-poultry-industry/articles/facing-realities-poultry-health-t209/p0.htm>
 94. Hudlicka O., 1985. Development and adaptability of microvasculature in skeletal muscle. *J. Exp. Biol.* 115, 215 – 228.
 95. Iji P.A., Tivey D. R., 1998. Natural and synthetic oligosaccharides in broiler chicken diets. *World's Poult. Sci. J.* 54 (2), 129 – 143.
 96. Ingr I., 1989. Meat quality: Defining the term by modern standards. *Fleisch.* 69, 1268.
 97. *J. Am. Diet. Assoc.*, 2004. 104, 814 – 826.
 98. Jakubowska M., Gardzielewska J., Karamucki T., Rybarczyk A., Czernomysy – Furowicz D., Matusevicius P., 2014. The effect of the lactic acid addition to drinking water on the hygiene and quality of chicken broiler meat. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* 13 (4), 45 – 54.
 99. Jakubowska M., Gardzielweska J., Kortz J., Karamucki T., Buryta B., Rybarczyk A., Otolińska A., Natalczyk – Szymkowska W., 2004. Kształtowanie się wybranych cech fizykochemicznych mięśni

- piersiowych w zależności od wartości pH mierzonego 15 minut po uboju u kurcząt brojlerów. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* 3 (1), 139 – 144.
100. Janardhana V., Broadway M. M., Bruce M. P., Lowenthal J. W., Geier M. S., Hughes R. J., Bean A. G. D., 2009. Prebiotics modulate immune responses in the gut – associated lymphoid tissue of chickens. *J. Nutr.* 139, 1404 – 1409.
 101. Jang I. S., Ko Y. H., Yang H. Y., Ha J. S., Kim J. Y., Kang S. Y., Yoo D. H., Nam D. S., Kim D. H., Lee C. Y., 2004. Influence of essential oil components on growth performance and the functional activity of the pancreas and small intestine in broiler chickens. *Asian – Aust. J. Anim. Sci.* 17 (3), 394 – 400.
 102. Janocha A., Milczarek A., Osek M., Turyk Z., 2010. Efektywność bakterii probiotycznych i prebiotyku w żywieniu kurcząt brojlerów. *Acta Sci. Pol. Zootechnica.* 9 (1), 21 – 30.
 103. Jassim J. M., Riyad K. M., Maijd H. A., Yanzhang G., 2011. Evaluation of physical and chemical characteristics of male and female ducks carcasses at different ages. *Pakistan J. Nutr.* 10 (2), 182 – 189.
 104. Jeffrey J. S., 1999. Use of *competitive exclusion* products in poultry, *Poult. Fact Sheet.* 30.
 105. Jin L. Z., Ho Y. W., Abdullah N., Jajaludin S., 2000. Digestive and bacterial enzyme activities in broiler fed diets supplemented with *Lactobacillus* Cultures. *Poult. Sci.* 79, 886 – 891.
 106. Jin, L. Z., Ho, Y. W. Abdullah, N., Jalaludin, S., 1996. Influence of dried *Bacillus subtilis* and lactobacilli cultures on intestinal microflora and performance in broilers. *Asian – Aust. J. Anim. Sci.* 9, 397 – 404.
 107. Johnston P. A., Liu H., O'Connell T., Phelps P., Bland M., Tyczkowski J., Kemper A., Harding T., Avakian A., Haddad E., Whitfill C., Gildersleeve R., Ricks C. A., 1997. Applications in *in ovo* technology. *Poult. Sci.* 76, 165 – 178.
 108. Jung S. J., Houde R., Baurhoo B., Zhao X., Lee B. H., 2008. Effects of galacto – oligosaccharides and bifidobacteria lactis – based probiotic strain on the growth performance and fletched fecal microflora of broiler chickens. *Poult. Sci.* 87, 1694 – 1699.
 109. Jurczak M. E., 2005. *Towaroznawstwo produktów zwierzęcych. Ocena jakości mięsa.* Wyd. SGGW Warszawa.
 110. Ka – Lung L., Cheung Chi – Keung P., 2013. Non – digestible long chain beta – glucans as novel prebiotics. *Bioactive carbohydrates and dietary fibre.* 2, 45 – 64.
 111. Kabir S. M. L., 2009a. Effect of probiotics on broiler meat quality. *Afr. J. Biotechnol.* 8 (15), 3623 – 3627.
 112. Kabir S. M. L., 2009b. The role of probiotics in the poultry industry. *Int. J. Mol. Sci.* 10, 3531 – 3546.

113. Khalafalla F. A., Fatma H. M. A., Zahran D. A., Mosa A. M. M. A., 2011. Influence of feed additives in quality of broiler carcasses. *J. World's Poult. Res.* 2 (3), 40 – 47.
114. Khan R. U., Naz S., 2013. The applications of probiotics in poultry production. *World's Poult. Sci. J.* 69, 621 – 631.
115. Kim G. B., Seo Y. M., Kim C. H., Paik I. K., 2011. Effect of dietary prebiotic supplementation on the performance, intestinal, and immune response of broilers. *Poult. Sci.* 90, 75 – 82.
116. Kłosowska D., 1984. Cechy histologiczne i histochemiczne mięśni świń, bydła i drobiu a jakość mięsa. Rozprawa habilitacyjna. BTN. Praca Wydziału Nauk Przyrodniczych, Seria B.
117. Kocamis H., Yeni Y. N., Brown C. U., Kenney P. B., Kirkpatrick – Keller D. C., Killefer J., 2000. Effect of *in ovo* administration of insulin – like growth factor – I on composition and mechanical properties of chicken bone. *Poult. Sci.* 79, 1345 – 1350.
118. Kocamis H., Yeni Y. N., Kirkpatrick – Keller D. C., Killefer J., 1999. Postnatal growth of broilers in response to *in ovo* administration of chicken growth hormone. *Poult. Sci.* 78, 1219 – 1226.
119. Koksall B. H., Cengiz O., Sevim O., Tatli O., Uner A. G., Beyaz D., Buyukyoruk S., Onol A. G., 2013. Use of prebiotic supplementation to diet for reducing the negative effects of delayed feed access on growth rate in broiler chickens. *Int. J. Poult. Sci.* 12 (12), 714 – 720.
120. Koop – Hoolihan L., 2001. Prophylactic and therapeutic uses of Probiotics. *J. Am. Diet Assoc.* A review. 147, 747 – 748.
121. Kornasio R., Halevy O., Kedar O., Uni Z., 2011. Effect of *in ovo* feeding and its interaction with timing of first feed on glycogen reserves, muscle growth, and body weight. *Poult. Sci.* 90, 1467 – 1477.
122. Kortz J., 2001. Ocena surowców rzeźnych. Wyd. Akademii Rolniczej Szczecin.
123. Kowalczyk E., Patyra E., Kwiatek K., 2013. Kwasy organiczne i ich znaczenie w produkcji zwierzęcej. *Med. Wet.* 69 (5), 269 – 273.
124. Kralik G., Djurkin I., Kralik Z., Skrtic Z., Radisic Z., 2014. Quality indicators of broiler breast meat in relation to colour. 32 (2), 173 – 178.
125. Krawczyk J., Puchała M., Obrzut J., 2012. Wylęgowość w stadach kur nieśnych objętych programem ochrony. *Wiad. Zoot. R. L.* 4, 41 – 46.
126. Kuttappan V. A., Brewer V. B., Apple J. K., Waldroup P. W., Owens C. M., 2012. Influence of growth rate on the occurrence of white striping in broiler breast fillets. *Poult. Sci.* 91, 2677 – 2685.
127. Kuttappan V. A., Huff G. R., Huff W. E., Hargis B. M., Apple J. K., Coon C., Owens C. M., 2013a. Comparison of hematologic and serologic profiles of broiler birds with normal and severe degrees of white striping in breast fillets. *Poult. Sci.* 92, 339 – 345.
128. Kuttappan V. A., Shivaprasad H. L., Shaw D. P., Valentine B. A., Hargis B. M., Clark F. D., McKee S. R., Owens C. M., 2013b.

- Pathological changes associated with white striping in broiler breast muscle. *Poult. Sci.* 92, 331 – 338.
129. Lillehoj H. S., Lee K. W., 2012. Immune modulation of innate immunity as alternatives – to – antibiotics strategies to mitigate the use of drugs in poultry production. *Poult. Sci.* 91, 1286 – 1291.
 130. Lipiński K., Tywończuk J., Siwicki A., 2009. Wpływ mannanoligoacharydów na status zdrowotny i jakość mięsa kurcząt brojlerów. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość.* 4 (65), 26 – 33.
 131. Liu A., Nishimura T., Takahashi K., 1996. Relationship between structural properties of intramuscular connective tissue and toughness of various chicken skeletal muscles. *Meat Sci* 43, 43 – 49.
 132. MacRae V. E., Mahon M., Gilpin S., Sandercock D. A., Mitchell M. A., 2006. Skeletal muscle fiber growth and growth associated myopathy in the domestic chicken (*Gallus domesticus*). *Br. Poult. Sci.* 47, 264 – 272.
 133. Mahadavi S., Zakeri Z., Mehmannaavaz Y., Nobakht A., 2013. Comparative study of probiotic, acidifier, antibiotic growth promoters and prebiotic on activity of humoral immune and performance parameters of broiler chickens. *IJAS.* 3 (2), 295 – 299.
 134. Maiorano G., Sobolewska A., Cianciullo D., Walasik K., Elminowska – Wenda G., Sławińska A., Tavaniello S., Żylińska J., Bardowski J., Bednarczyk M., 2012. Influence of *in ovo* prebiotic and synbiotics administration on meat quality of broiler chickens. *Poult. Sci.* 91, 2963 – 2969.
 135. Majd E. N., Mayahi M., Sadeghi Moghadam A., 2013. The effect of alphamune and biomin on histomorphological structure of small intestine and caecal tonsil lymphoid tissue in broiler chicken. *IJVR.* 15 (1), 30 – 35.
 136. Maraschiello C., Diaz I., Garcia Regueiro J.A., 1996. Determination of cholesterol in fat and muscle of pig by HPLC and capillary gas chromatography with solvent venting injection. *J. High Resol. Chromatogr.* 19, 165 – 168.
 137. Marcinkowska – Lesiak M., Moczowska M., Wyrwisz J., Stelmasiak A., Zdanowska – Sąsiadek Ż., Damaziak K., Michalczyk M., 2013. Wpływ płci na wybrane cechy jakości mięśni mieszańców (CCZk). *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.* 574, 39 – 47.
 138. Marcu A., Dumitrescu G., Stef L., Ciochina P. L., Pet I., Dronca D., Baul S., Marcu A., 2014. The influence of nutrition, sex, slaughter age on characteristics of pectoral major muscle at broiler chickens Ross – 308. *Anim. Sci. Biotech.* 47(1), 306 – 321.
 139. Marcu A., Vacaru – Opris I., Dumitrescu G., Marcu A., Ciochina L. P., Nicula M., Dronca M., Kelciov B., 2013. Effect of diets with different energy and protein levels on breast muscle characteristics of broiler chickens. *Anim. Sci. Biotech.* 46 (1), 333 – 340.

140. Mateos G. G., Gonzáles – Alvarado J. M., Lázaro R., 2006. Facing the realities of poultry health and performance without antibiotics in Europe. 69 – 79.
141. Matsushita S., Yamashita J., Iwasawa T., Tomita T., Ikeda M., 2006. Effects of *in ovo* exposure to imazalil and atrazine on sexual differentiation in chick gonads. Poult. Sci. 85, 1641 – 1647.
142. McCormick R. J., 1999. Extracellular modifications to muscle collagen: implications for meat quality. Poult. Sci. 78, 785 – 791.
143. McFarland D. C., 1999. Influence of growth factors on poultry myogenic satellite cells. Poult. Sci. 78, 747 – 758.
144. McReynolds J. L., Caldwell D. Y., Barnhart E. T., Deloach J. R., McElroy A. P., Moore R. W., Hargis B. M., Caldwell D. J., 2000. The effect of *in ovo* or day – of – hatch subcutaneous antibiotic administration on *competitive exclusion* culture (PREEMPT™) establishment in neonatal chickens. Poult. Sci. 79, 1524 – 1530.
145. Miziak L., Gryko R., Kwiatek M., Parasian S., 2012. Probiotyki w żywieniu zwierząt. Życie Wet., 87 (9), 736 – 742.
146. Mobini B., Asadi K. A., 2013. A comparative histomorphometrical study of qadiceps femoris muscle fibers between commercial broiler and domestic fowls. World Appl. Sci. J. 22 (10), 1506 – 1509.
147. Mohan B., Kadriavel R. Natarajan A., Bhaskaran M., 1996. Effect of probiotic supplemetation on growth, nitrogen utilization and serum choleterol in broilers. Br. Poult. Sci. 37, 395 – 401.
148. Moran Jr. E. T., 2007. Nutrition of the developing embryo and hatchling. Poult. Sci. 86, 1043 – 1049.
149. Mroczyńska M., Libudzisz Z., Gałęcka M., Szachta P., 2011. Mikroorganizmy jelitowe człowieka i ich aktywność metaboliczna. Prz. Gastroenterol. 6 (4), 1 – 7.
150. Munyaka P. M., Echeverry H., Yitbarek A., Camelo – Jaimes G., Sharif S., Guenter W., House J. D., Rodriguez – Lecompte J. C., 2012. Local and systemic innate immunity in broiler chickens supplemented with yeast – derived carbohydrates. Poult. Sci. 91, 2164 – 2172.
151. Mutuş R., Kocabağ N., Alp M., Acar N., Eren M., Gezen Ş. Ş., 2006. The effect of dietary probiotic supplementation on tibial bone characteristics and strength in broilers. Poult. Sci. 85, 1621 – 1625.
152. Nabizadeh A., 2012. The effect of inulin on broiler chicken intestinal microflora, gut morphology, and performance. J. Anim. Feed Sci. 21, 725 – 734.
153. Naidu A. S., Bidlack W. R., Clemens R. A., 1999. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 39, 13 – 126.
154. Niewiarowicz A., 1978. Meat anomalies in broiler. Poult. Internat. 17, 1, 50 – 52.

155. Nowak A., Śliżewska K., Libudzisz Z., 2010. Probiotyki – historia i mechanizmy działania. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość.* 4 (71), 5 – 19.
156. Noy Y., Uni Z., 2010. Early nutritional strategies. *WPSA* 66, 639 – 646.
157. Nunes R. V., Scherer C., Pozza P. C., Eyneg C., Bruno L. D. G. B., Vieties F. M., 2012. Use of probiotics to replace anitibiotics for broilers. *R. Bras. Zootec.*, 41, 10, 2219 – 2224.
158. Ohashi Y., Ushida K., 2009. Health – beneficial effects of probiotics: It's mode of action. *Anim. Sci. J.* 80, 361 – 371.
159. Ohta Y., Kidd M. T., 2001a. Optimum site *in ovo* amino acid injection in broiler breeder eggs. *Poult. Sci.* 80, 1425 – 1429.
160. Ohta Y., Kidd M., Ishibashi T., 2001b. Embryo growth and amino acid concentration profiles of broiler breeder eggs, embryos, and chick after *in ovo* administration of amino acids. *Poult. Sci.* 80, 1430 – 1436.
161. Okwor G. O., El – Yuguda A., Baba S. S., 2014. Profile of maternally derived antibody in broiler chicks and *in – ovo* vaccination of chick embryo against Newcastle Disease. *World J. Vaccines.* 4, 72 – 80.
162. Oyarzabal O. A., Conner D., 1996. Application of direct – fed microbial bacteria and fructooligosaccharides for *Salmonella* control in broilers during feed withdrawal. *Poult. Sci.* 75, 186 – 190.
163. Panda A. K., Rao S. V. R, Reddy M., Rand. Praharaj N. K., 1999. Effect of dietary inclusion of probiotic on growth, carcass traits and immune response in broilers. *Ind. J. Poult.Sci.*, 34, 343 – 346.
164. Panda A. K., Reddy M. R, Rao, S. V. R., Raju M. V. L. Rand Praharaj, N. K., 2000. Growth, carcass characteristics, immunocompetences and response to *Escherichia coli* of broilers fed diets with various levels of probiotic. *Archiv fur Geflugelkunde.* 64, 152 – 156.
165. Park J. H., Kim I. H., 2014. Supplemental effect of probiotic *Bacillus subtilis* B2A on productivity, organ weight, intestinal *Salmonella* microflora, and breast meat quality of growing broiler chicks. *Poult. Sci.* 93, 2054 – 2059.
166. Patterson J. A., Burkholder K. M., 2003. Application of prebiotics and probiotics in poultry production. *Poult. Sci.* 82, 627 – 31.
167. Pedroso A. A., 2009. Which came first: the egg or its microbiota? *PIP.* 109, 1 – 5.
168. Pelicano E. R. L., Souza P. A, Souza H. B. A., Oba A., Boiago M. M., Zeola N. M. B. L., Scatolini A. M., Bertanha V. A., Lima T. M. A., 2005. Carcass and cut yields and meat qualitative traits of broilers fed diets containing probiotics and prebiotics. *Brazilian J. Poult. Sci.* 7(3), 169 – 175.
169. Pelicano E. R. L., Souza P. A, Souza H. B. A., Oba A., Norkus E. A., Kodawara L. M., Lima T. M. A., 2003. Effect of different probiotics on broiler carcass and meat quality. *Brazilian J. Poult.* 5(3), 207 – 214.

170. Petracci M., Cavani C., 2012. Muscle growth and poultry meat quality issues. *Nutrients*. 4, 1 – 12.
171. Pietras M., Skraba B., 2000. Wpływ preparatu probiotycznego na wskaźniki odporności i wyniki odchowu kurcząt brojlerów. *Rocz. Nauk. Zoot. Supl.* 6, 357 – 361.
172. Pietrzak D., Michalczyk M., Niemiec J., Mroczek J., Adamczak L., Łukasiewicz M., 2013. Porównanie wybranych wyróżników jakości mięsa kurcząt szybko i wolno rosnących. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*. 2 (87), 30 – 38.
173. Pilarski R., Bednarczyk M., Lisowski M., Rutkowski A., Bernacki Z., Wardęńska M., Gulewicz K., 2005. Assessment of the effect α – galactosides injected during embryogenesis on selected chicken traits. *Folia Biologica (Kraków)*. 53, (1 – 2), 13 – 20.
174. Pisula A., Pospiech E., 2011. Mięso – podstawy nauki i technologii. Wyd. SGGW Warszawa.
175. Pomianowski J. F., Wójcik A., Sowińska J., Mituniewicz T., Witkowska D., Chorąży Ł., Kwiatkowska – Stenzel A., 2011. Wartość odżywcza mięsa kurcząt brojlerów transportowanych na różne odległości. *Inż. Ap. Chem.* 50, 3, 67 – 68.
176. Przeniosło – Siwczyńska M., Kwiatek K., 2013. Dlaczego zakazano stosowania w żywieniu zwierząt antybiotykowych stymulatorów wzrostu? *Życie Wet.* 88 (2), 104 – 108.
177. Pym R., Nicholls, P., 1979. Selection for food conversion in broilers: direct and correlated responses to selection for body weight gain, food consumption and food conversion ratio. *Br. Poult. Sci.* 20, 73 – 86.
178. Qiao M., Fletcher D. L., Smith D. P., Northcutt J. K., 2001. The effect of broiler breast meat color on pH, moisture, water – holding capacity, and emulsification capacity. *Poult. Sci.* 80, 676 – 680.
179. Rai V., Yadav B., Lakhani G. P., 2013. Application of probiotic and prebiotic in animals production: a review. *Environment & Ecology*. 31(2B), 873 – 876.
180. Rehfeldt C., Stickland N. C., Fiedler I., Wegner J., 1999. Environmental and genetic factors as sources of variation on skeletal muscle fiber number. *Basic Appl. Myol.* 9 (5), 235 – 253.
181. Rehman H., Rosenkranz C., Böhm J., Zentek J., 2007. Dietary inulin affects the morphology but not the sodium – dependent glucose and glutamine transport in the jejunum of broilers. *Poult. Sci.* 86, 118 – 122.
182. Remignon H., Zanusso J., Gaëlle A., Babilé R., 2000. Occurrence of giant myofibres according to muscle type, pre or *postrigor* state and genetic background in turkeys. *Meat Sci.* 56, 337 – 343.
183. Revollo L., Ferreira A. J. P., Mead G. C., 2006. Prospects in *Salmonella* control: *competitive exclusion*, probiotics, and enhancement of avian intestinal immunity. *J. Appl. Poult. Res.* 15, 341 – 351.

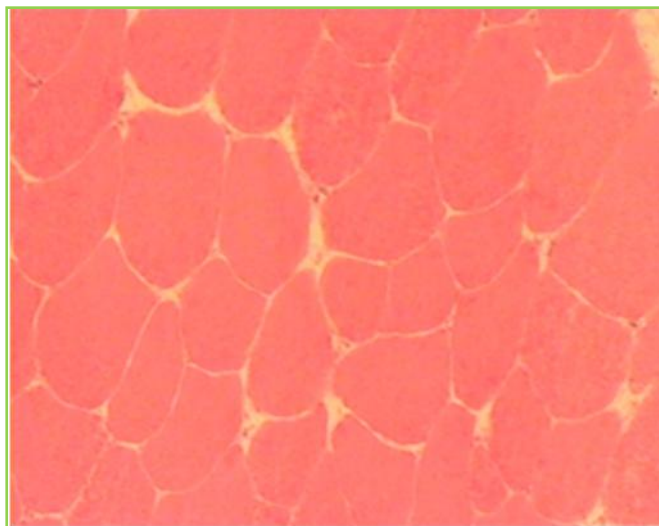
184. Salma U., Miah A. G., Maki T., Nishimura M., Tsujii H., 2007. Effect of dietary *Rhodobacter capsulatus* on cholesterol concentration and fatty acid composition in broiler meat. *Poult. Sci.* 86, 1920 – 1926.
185. Salminen S., 1996. Uniqueness of probiotic strains. *Int. Dairy Fed. Nutr. Newsl.* 5, 16 – 18.
186. Samarakoon S. M. R. and Samarasinghe K., 2012. Strategies to Improve the Cost Effectiveness of Broiler Production. *Tropical Agricultural Research Vol.* 23 (4), 338– 346.
187. Saminathan M., Sieo C. C., Kalavathy R., Abdullah N. Ho Y. W., 2011. Effect of prebiotic oligosaccharides on growth of *Lactobacillus* strains used as a probiotic for chickens. *Afr. J. Microbiol. Res.* 5 (1), 57 – 64.
188. Santiago H. L., 2001. Impact of Genetic Selection on Skeletal Muscle in Meat – Type Poultry.
<http://academic.uprm.edu/hsantiago/Impact%20of%20Genetic%20Selection%20on%20Skeletal%20Muscle%20in%20Meat-Type%20Poultry.pdf>.
189. Saxena V. K., Sachdev A. K., Gopal R., Pramod A. B., 2009. Roles of important candidate genes on broiler meat quality. *World's Poult. Sci. J.* 65 (1), 37 – 50.
190. Scheuermann G. N., Bilgili S. F, Tuzun S., Mulvaney D. R, 2004. Comparison of chicken genotypes: Myofibre number in pectoralis muscle and myostatin ontogeny. *Poult. Sci.* 83, 1404 – 1412.
191. Schneitz C., 2005. *Competitive exclusion* in poultry – 30 years of research. *Food Control.* 16, 657 – 667.
192. Schrezenmeir J., De Vrese M., 2001. Probiotics, prebiotics and synbiotics – approaching a definition. *Am. J. Clin. Nutr.* 73 (Suppl.), 361 – 364.
193. Scientific Raport of EFSA, 2010. Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Calmplobacter* in broiler batches and of *Campylobacter* and *Salmonella* on broiler carcasses in the EU, 2008, EFSA Journal, 8 (3), 1503.
194. Seideman S. C., Cohen S. H., Schollmeyer J. V., 1984. Some factors influencing ante – mortem changes in muscle: a brief review. *Food Microstruct.* 3, 127 – 132.
195. Seifert S., Watzl B., 2007. Inulin and oligofructose: Review of experimental data on immune modulation. *J. Nutr.* 137, 2563 – 2567.
196. Shabani R., Nosrati M., Javandel F., Gothbi A. A. A., Kioumars H., 2012. The effect of probiotics on growth performance of broilers. *Ann. Biol. Res.* 3 (12), 5450 – 5452.
197. Shafey T. M., Alodan M. A., Al – Ruqaie I. M., Abouheif M. A., 2012. *In ovo* feeding of carbohydrates and incubated at a high incubation temperature on hatchability and glycogen status of chicks. *S. Afr. J. Anim. Sci.* 42 (3), 210 – 220.

198. Shashidhara R. G., Devegowda G., 2003. Effect of dietary oligosaccharide on broiler breeder production traits and immunity. *Poult. Sci.* 82, 1319 – 1325.
199. Škrlep M., Čandek – Potokar M., 2006. Pork color measurement as effected by bloom time and measurement location. *J. Muscle Food.* 18, 78 – 87.
200. Sláková A., Strakova E., Valkova V., Buchtova H., Steinhauserova I., 2009. Quality indicators of chickens broiler raw and cooked meat depending on their sex. *Acta Vet.* 78, 497 – 504.
201. Sławińska A., Siwek M., Bednarczyk M., 2014a. Effects of synbiotics injected *in ovo* regulate immune – related gene expression in adult chickens. *AJVR.* 75, 11, 997 – 1003.
202. Sławińska A., Siwek M., Żylińska J., Bardowski J., Brzezińska J., Gulewicz K., Nowak M., Urbanowski M., Płowiec A., Bednarczyk M., 2014b. Influence of synbiotics delivered *in ovo* on the immune organs development and structure. *Folia Biol. (Kraków).* 62 (3), 277 – 285.
203. Śliżewska K., Biernasiak J., Libudzisz Z., 2006. Probiotyki jako alternatywa dla antybiotyków. *Zeszyty Naukowe Politechniki Łódzkiej.* 984, 79–91.
204. Śliżewska, K., Nowak A., Barczyńska R., Libudzisz Z., 2013. Prebiotyki – definicja, właściwości i zastosowanie w przemyśle. *Żywność. Nauka.Technologia. Jakość.* 1(86), 5 – 20.
205. Smirnov A., Tako E., Ferket P. R., Uni Z., 2006. Mucin gene expression and mucin content in the chicken intestinal goblet cells are affected by *in ovo* feeding of carbohydrates. *Poult. Sci.* 85, 669 – 673.
206. Smith D. P., Fletcher D. L., Buhr R. J., Beyer R. S., 1993. Pekin duckling and broiler pectoralis muscle structure and composition. *Poult. Sci.* 72, 202 – 208.
207. Soares A. L., Marchi D. F., Matsushita M., Guarnieri P. D., Droval A. A., Ida E. I., Shimokomaki M., 2009. Lipid oxidation and fatty acid profile related to broiler breast meat color abnormalities. *Braz. Arch. Biol. Tech.* 52(6), 1513 – 1518.
208. Sprawozdanie IBB PAN z realizacji Zadania 1 projektu Nr 2011/01/B/NZ9/00642 pt. „Stymulacja *in ovo* mikrobiomu kury – charakterystyka mechanizmów działania prebiotyków i synbiotyków”, za okres 10.03 – 15.10. 2012; wykonawcy: Żylińska J., Chmielewska M., Bardowski J.
209. Swamy M. N., Upendra H. A., 2013. Growth performance, crude protein, ether extract and total ash in the breast muscle of broiler chickens supplemented with probiotics. *Int. J. Sci. Environment and Technology.* 2 (5), 1000 – 1007.
210. Świątkiewicz S., Koreleski J., 2007. Dodatki paszowe o działaniu immunomodulacyjnym w żywieniu drobiu. *Med. Wet.* 63 (11), 1291 – 1295.

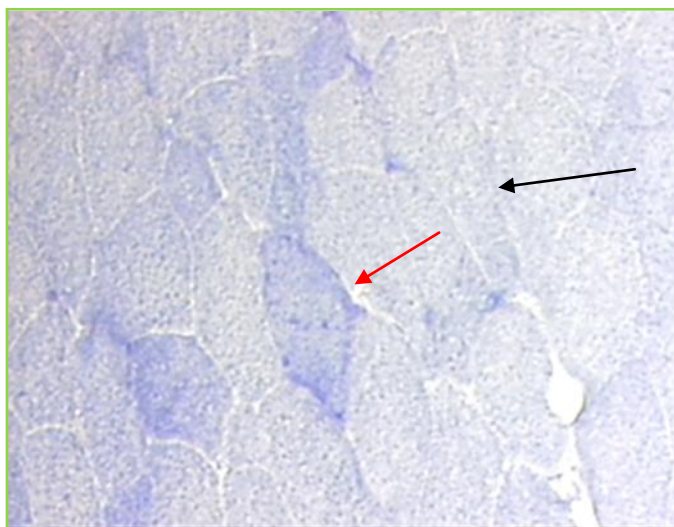
211. Świątkiewicz S., Świątkiewicz M., 2008. Zastosowanie fruktanów o właściwościach prebiotycznych w żywieniu zwierząt gospodarskich. *Med. Wet.* 64 (8), 987 – 990.
212. Szymańska – Czerwińska M., Bednarek D., 2007. Betaglukany alternatywą antybiotykowych stymulatorów wzrostu. *Życie Wet.* 82 (10), 842 – 843.
213. Szymańska – Czerwińska M., Bednarek D., 2008. Wpływ prebiotyków na procesy immunologiczne u zwierząt. *Med. Wet.* 64 (3), 262 – 264.
214. Tougan P. U., Dahouda M., Salikofou C. F. A., Ahounou S. G. A., Kpodekon M. T., Mensah G. A., Thewis A., Karim I. Y. A., 2013. Conversion of chicken muscle to meat and factors affecting chicken meat quality: a review. *IJAAR.* 3 (8), 1 – 20.
215. Trojan M., Niewiarowicz A., 1971. Method of identifying of water broiler chicken meat and observations on the frequency of this anomaly. *Post. Drob.* 13, 1, 47 – 50.
216. Uni Z., Ferket P. R., 2003. Enhancement of development of oviparous species by *in ovo* feeding. US Patent Number 6.592.878.
217. Uni Z., Ferket P. R., Tako E., Kedar O., 2005. *In ovo* feeding improves energy status of late – term chicken embryos. *Poult. Sci.* 84, 764 – 770.
218. Van Lack R. L. J. M., Liu C. H., Smith M. O., Loveday H. D., 2000. Characteristics of pale, soft, exudative broiler breast meat. *Poult. Sci.* 79, 1057 – 1061.
219. Velleman S. G., 2007. Muscle development in the embryo and hatchling. *Poult. Sci.* 86, 1050 – 1054.
220. Villaluenga C. M., Wardeńska M., Pilarski R., Bednarczyk M., Gulewicz K., 2004. Utilization of the chicken embryo model for assessment of biological activity of different oligosaccharides. *Folia Biol. (Kraków).* 52 (3 – 4), 135 – 142.
221. Willems O. W., Miller S.P. and Wood B. J., 2013. Aspects of selection for feed efficiency in meat producing poultry. *World's Poult. Sci. J.* 69, 77 – 87.
222. Williams C. J., 2011. *In ovo* vaccination and chick quality. *Int. Hatchery Practice.* 19 (2), 7 – 13.
223. Williams C. J., Hopkins B. A., 2011. Field evaluation of the accuracy of vaccine deposition by two different commercially available *in ovo* injection systems. *Poult. Sci.* 90, 223 – 226.
224. Williams C. J., Murray D. L., Brake J., 2000. Development of a model to study *Aspergillus fumigatus* proliferation on the air cell membrane of *in ovo* injection broiler eggs. *Poult. Sci.* 79, 1536 – 1542.
225. Williams C., 2007. *In ovo* vaccination for disease prevention. *Int. Poult. Prod.* 15(8), 7 – 9.
226. Wnuk A., Łukasiewicz M., Mroczek – Sosnowska N., Gondek A., 2013. Wpływ budowy histologicznej na wybrane wyróżniki jakości mięsa. *Pol. Drob.*, 9, 10 – 13.

227. Yamawaki R. A., Milbradt E. L., Coppola M. P., Rodrigues J. C. Z., Andreatti Filho R. L., Padovani C. R., Okamoto A. S., 2013. Effect of immersion and inoculation *in ovo* of *Lactobacillus spp.* in embryonated chicken eggs in the prevention of *Salmonella Enteritidis* after hatch. Poult. Sci. 92, 1560 – 1563.
228. Yang Y., Iji P. A., Choct M., 2009. Dietary modulation of gut microflora in broiler chickens: a review of the role of six kinds of alternatives to in – feed antibiotics. World's Poult. Sci. J. 65, 97 – 114.
229. Yegani M., Korver D. R., 2008. Factors affecting intestinal health in poultry. Poult. Sci. 87, 2052 – 2063.
230. Yörük M. A., Gül M., Hayirli A., Macit M., 2004. The effects of supplementation of humate and probiotic on egg production and quality parameters during the late laying period in hens. Poult. Sci. 83, 84 – 88.
231. Younis T. M., El – Shafei A. A., Al – Gamal M. A., El – Sayed A. L., 2013. Effects of commercial probiotics on productive and physiological performance of broiler chickens. J. Appl. Sci. Res. 9 (13), 6643 – 6654.
232. Zhai W., Gerard P. D., Pulikanti R., Peebles E. D., 2011a. Effects of *in ovo* injection of carbohydrates on embryonic metabolism, hatchability, and subsequent somatic characteristics of broiler hatchlings. Poult. Sci. 90, 2134 – 2143.
233. Zhai W., Rowe D. E., Peebles E. D., 2011b. Effects of commercial *in ovo* injection of carbohydrates on broiler embryogenesis. Poult. Sci. 90, 1295 – 1301.
234. Zhang G., Ma L., Doyle M. P., 2006. Efficiency of probiotics, prebiotics and synbiotics on weight increase of chickens. (*Gallus Domesticus*). <http://www.ugacfs.org/research/pdfs/Poultry2006.pdf>.
235. Zhou X., Jin E., Shenghe L., Wang C. Qiao E., Guozhong W., 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, 1 – 8.
236. Zhou X., Wang Y., Gu Q., Li W., 2010. Effect of dietary probiotic, *Bacillus coagulans*, on growth performance, chemical composition, and meat quality of Guangxi Yellow chicken. Poult. Sci. 89, 588 – 593.
237. Ziegan J., 1979. Kombinationen enzymhistochemischer methoden zur fasertypendifferenzierung und beurteilung der skelettmuskulatur. Acta Histochem. 65, 34 – 40

10. FOTOGRAFIE MIKROSKOPOWE

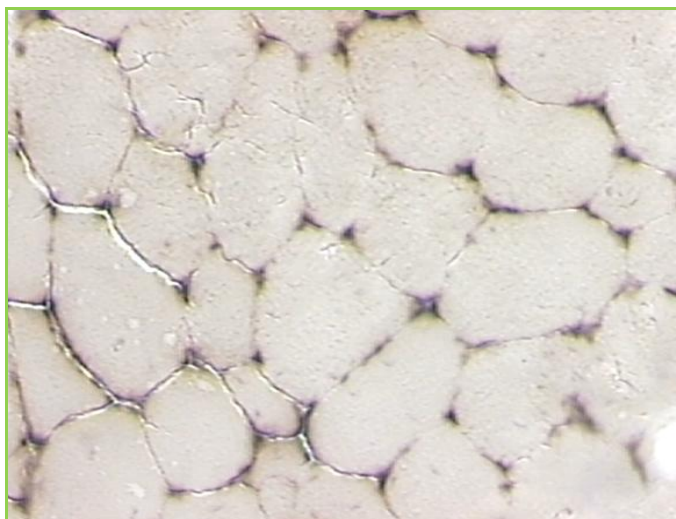


Fot. 12. Obraz przekroju poprzecznego *musculus pectoralis superficialis* 35. dniowych kurcząt brojlerów Ross 308.
Barwienie H + E (pow.12,5x10)

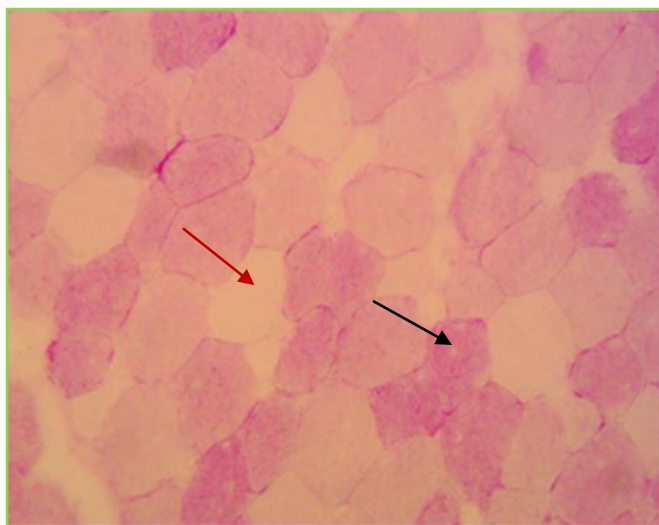


Fot. 13.. Obraz przekroju poprzecznego *musculus pectoralis superficialis* 35. dniowych kurcząt brojlerów Ross 308.
Reakcja na aktywność reduktazy tetrazolinowej NADH – TR (pow.12,5x10)

—→ Włókno glikolityczne
—→ Włókno oksydacyjne



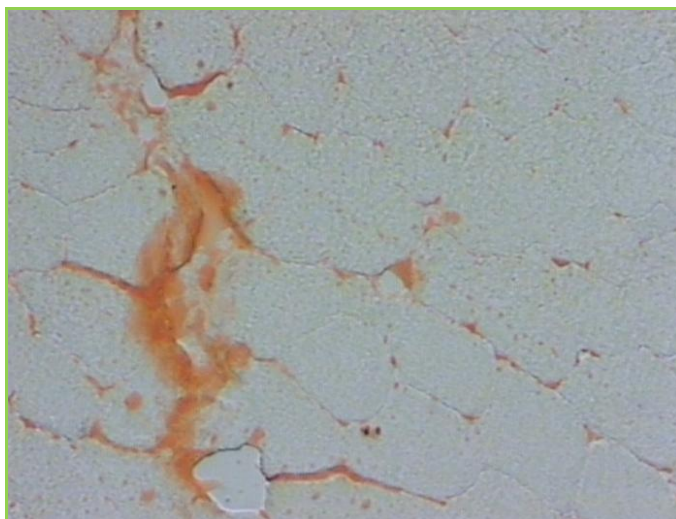
Fot. 14. Obraz przekroju poprzecznego *musculus pectoralis superficialis* 35. dniowych kurcząt brojlerów Ross 308.
Barwienie uwidaczniające kapilary (pow.12,5x10)



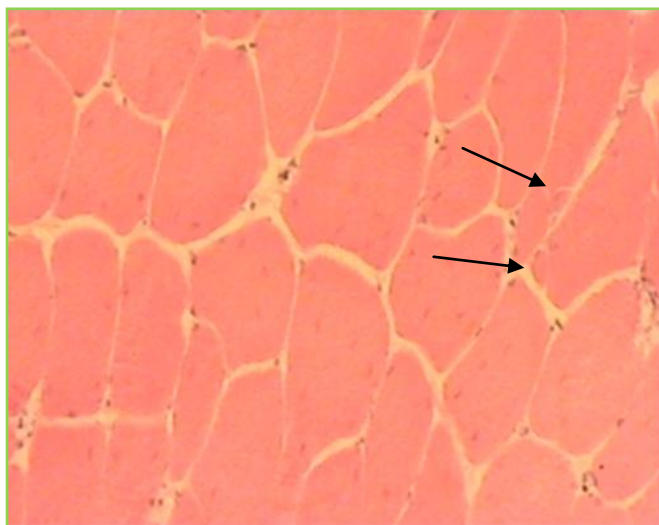
Fot. 15. Obraz przekroju poprzecznego *musculus pectoralis superficialis* 35. dniowych kurcząt brojlerów Ross 308.

Barwienie PAS (pow. 10x10)

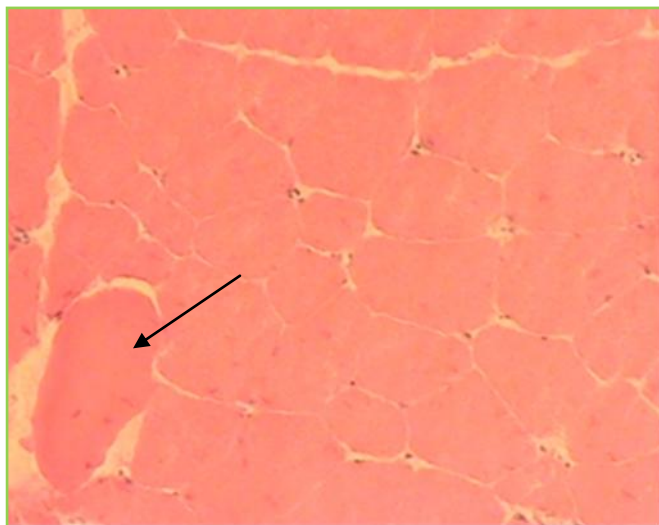
- Duża zawartość glikogenu
- Brak lub mała zawartość glikogenu



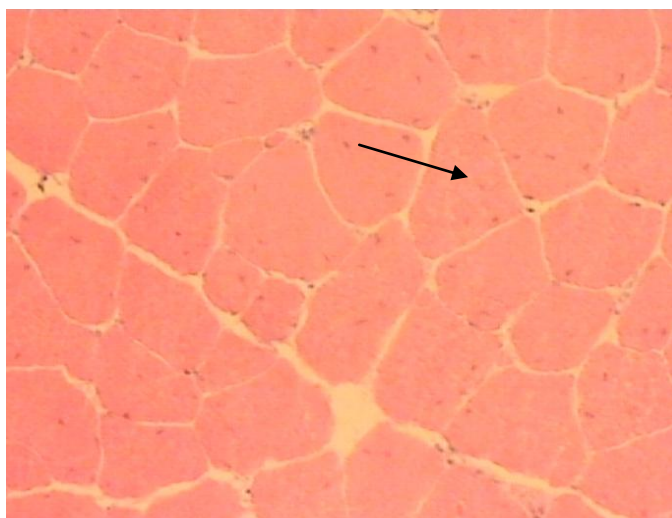
Fot. 16. Obraz przekroju poprzecznego *musculus pectoralis superficialis* 35. dniowych kurcząt brojlerów Ross 308.
Barwienie Oil Red (pow.12,5x10)



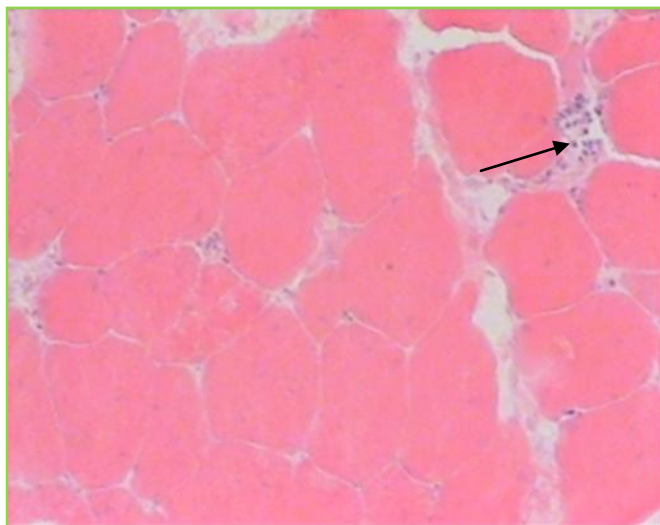
Fot. 17. Obraz przekroju poprzecznego *musculus pectoralis superficialis* 35. dniowych kurcząt brojlerów Ross 308.
Atrofia włókna (pow.12,5x10)



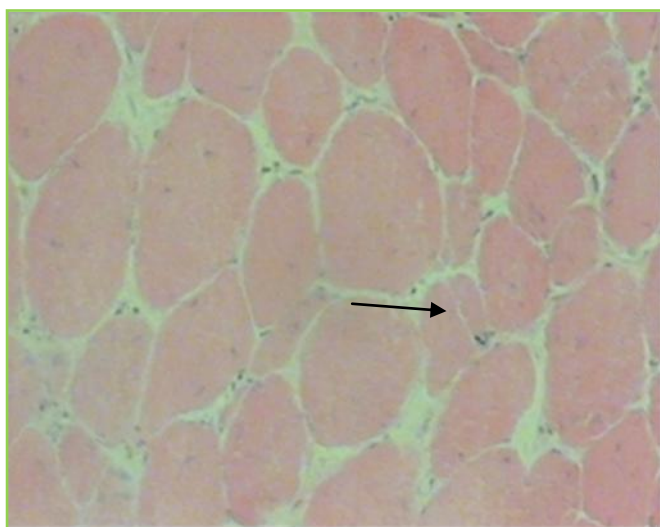
Fot. 18. Obraz przekroju poprzecznego *musculus pectoralis superficialis* 35. dniowych kurcząt brojlerów Ross 308.
Włókno olbrzymie (GF) (pow.12,5x10)



Fot. 19. Obraz przekroju poprzecznego *musculus pectoralis superficialis* 35. dniowych kurcząt brojlerów Ross 308 .
Zmiana kształtu włókna (pow. 12,5x10)



Fot. 20. Obraz przekroju poprzecznego *musculus pectoralis superficialis* 35. dniowych kurcząt brojlerów Ross 308.
Martwica z fagocytozą (pow. 12,5x10)



Fot. 21. Obraz przekroju poprzecznego *musculus pectoralis superficialis* 35. dniowych kurcząt brojlerów Ross 308.
Rozszczepienie włókna (*splitting*) (pow.12,5x10)

11. STRESZCZENIE

Celem badań było porównanie wpływu substancji prebiotycznych oraz synbiotycznych podanych *in ovo* w 12. dobie rozwoju zarodkowego, na cechy użytkowe kurcząt oraz cechy jakości i mikrostruktury mięśnia piersiowego (*musculus pectoralis superficialis*) 35. dniowych kurcząt brojlerów.

Materiał doświadczalny stanowiło 50 kogutów Ross 308, które podzielono na 5 grup w zależności od iniekowanej substancji. W 12. dobie rozwoju embrionalnego, za pomocą automatycznej technologii *in ovo* do komory powietrznej rozwijającego się zarodka podano 0,2 ml roztworu substancji bioaktywnej. Grupa kontrolna (1) otrzymała roztwór soli fizjologicznej, grupy prebiotyczne (2 i 3) zainiekowano roztworem zawierającym 1,760 mg inuliny (Sigma Aldrich) oraz roztworem zawierającym 0,528 mg komercyjnego prebiotyku Bi²tos (Clasado Ltd.). Grupy synbiotyczne, zawierające 1,760 mg inuliny (4) i 0,528 mg Bi²tos (5) wzbogacono o bakterie probiotyczne. Grupa 4 otrzymała 1000 CFU *Lactococcus lactis subsp. lactis* IBB SC1, grupa 5 otrzymała 1000 CFU *Lactococcus lactis subsp. cremoris* IBB SL1. Roztwór synbiotyku zawierał 20 µl zawiesiny bakteryjnej oraz 180 µl roztworu prebiotyku.

Ptaki ubijano w 35. dniu życia. Po uboju pobierano próbki mięśni piersiowych i zamrażano w ciekłym azocie. Po sporządzeniu preparatów mikroskopowych, przy użyciu programu MultiScan, w badanych grupach kurcząt dokonano analizy następujących cech mikrostruktury mięśnia piersiowego: procentowego udziału włókien okstydatywnych i glikolitycznych, pomiaru średniej średnicy włókien mięśniowych, analizy ukrwienia mięśnia, oznaczono również zawartość glikogenu i tłuszczu śródmięśniowego oraz określono rodzaj zmian patologicznych w mięśniu. Wartość pH oraz barwę mięsa określono po upływie 45 minut oraz 24 godzin po uboju. Wodochłonność mięsa (WHC) wyrażono jako procentową zawartość wody luźnej w mięsie.

Podanie *in ovo* prebiotyków i synbiotyków w 12. dobie rozwoju embrionalnego wpłynęło na cechy takie jak wylęgowość oraz masa ciała. Podanie komercyjnego prebiotyku Bi²tos wpłynęło na wzrost masy ciała kurcząt brojlerów. Nie wykazano wpływu pre- i synbiotyków na FCR, EWW oraz wydajność tuszki i mięśni piersiowych. Synbiotyki korzystnie wpłynęły na zawartość kolagenu oraz występowanie włókien olbrzymich. Analiza zmian histopatologicznych wykazała, że największym odsetkiem włókien prawidłowych charakteryzował się mięsień kurcząt, którym podano synbiotyki inulinę + *Lactococcus lactis subsp. lactis* IBB SC1. Analiza profilu enzymatycznego wykazała, że w mięśniu piersiowym badanych kurcząt przeważały włókna glikolityczne (80 – 86%).

SUMMARY

The aim of this study was to compare the effects of prebiotic and synbiotic substances given in ovo at the age of 12. embryonic development, on the traits of chickens and quality characteristics and microstructure of the pectoral muscle (*musculus pectoralis superficialis*) 35. day old broiler chickens.

The experimental material consisted of 50 cocks Ross 308, which were divided into 5 groups according to injected substances. At 12. day of embryonic development into the air chamber using an automatic technology in ovo 0.2 ml of a solution of the bioactive substance were given. The control group (1) received saline solution, prebiotic group (2 and 3) injected solution containing 1,760 mg inulin (Sigma-Aldrich) and a solution containing 0.528 mg of commercial prebiotic Bi²tos (Clasado Ltd.). Synbiotic group, which contain 1,760 mg of inulin (4) and 0.528 mg of Bi²tos (5) enriched with probiotics. Group 4 received the 1000 CFU *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IBB SC1, Group 5 received the 1000 CFU *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* IBB SL1. Synbiotic solution contained 20 ml of bacterial suspension and 180 ml of prebiotic solution.

The birds were slaughtered at 35. days of age. After slaughter, samples from pectoral muscles were taken and frozen into the liquid nitrogen. After preparation of microscope slides, using MultiScan program, in experimental groups of chickens were analyzed following microstructural features of pectoral muscle: the percentage of oxidative and glycolytic fiber, measuring the average diameter of muscle fibers, the analysis of the blood supply to the muscle, also determined the content of glycogen and intramuscular fat and defines the type of pathological change in the muscle. The pH and the color of the meat was determined after 45 minutes and 24 hours after slaughter. Water holding capacity of meat (WHC) was expressed as the percentage of water content in the meat loose.

In ovo administration of prebiotics and synbiotics at the age of 12. embryonic development resulted in traits such as hatchability and weight. Prebiotic commercial application Bi²tos increased the weight of broiler chickens. There was no effect of pre- and synbiotics on FCR, EWW, carcass performance and pectoral muscles. Synbiotics had a positive impact on collagen content and the presence of giant fibers. Analysis of histological changes showed that the highest percentage of correct fiber characterized by muscle chickens which are given synbiotic inulin + *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IBB SC1. Profile analysis of the enzyme revealed that the pectoral muscle examined chickens predominated glycolytic fibers (80 - 86%).