

## 6. STRESZCZENIE

Racjonalne żywienie świń jest jednym z ważniejszych czynników wpływających na efekty produkcyjne, a tym samym na opłacalność hodowli trzody chlewnej (168-170). Współczesne systemy hodowlane oparte na intensywnej produkcji trzody chlewnej oraz zasadach wczesnego odsadzania prosiąt i szybkiego, efektywnego tuczu sprzyjają niekorzystnemu oddziaływaniu różnorodnych czynników stresowych, przyczyniających się m.in. do występowania chorób przewodu pokarmowego z objawami biegunki (58, 126). Jednym z częściej podejmowanych w przeszłości działań mających na celu poprawę zdrowotności świń w warunkach intensywnego chowu było stosowanie antybiotyków w dawkach subterapeutycznych jako dodatków paszowych (3, 32). Definitywne wycofanie chemioterapeutyków w 2006 roku z systemów żywienia świń przyczyniło się do ograniczenia problemu lekooporności drobnoustrojów, ale spowodowało wzrost liczby przypadków biegunek u świń oraz nasilenie stanów zapalnych przewodu pokarmowego, prowadzących do zmniejszenia przyrostów masy ciała i zwiększenia śmiertelności, a w konsekwencji wzrostu kosztów produkcji trzody chlewnej (35). Te negatywne zjawiska stworzyły konieczność poszukiwania alternatywnych strategii żywieniowych, mających na celu utrzymanie wysokiej zdrowotności zwierząt oraz wydajności produkcyjnej, przy jednoczesnym pozyskiwaniu wysokiej jakości produktów spożywczych bezpiecznych dla zdrowia człowieka i środowiska (152, 160). Aktualnie spośród licznych związków stosowanych jako dodatki paszowe dla świń w celu poprawy efektywności żywienia, statusu zdrowotnego i kondycji zwierząt, a także produktywności najczęściej wykorzystywane są różnego rodzaju probiotyki (24, 26, 28).

Probiotyki zapewniają równowagę mikrobiologiczną w obrębie jelit, stymulują rozwój enterocytów, regulują motorykę przewodu pokarmowego, polepszają procesy trawienia i wchłaniania zwiększając współczynnik konwersji paszy oraz uczestniczą w produkcji licznych związków biologicznie czynnych, m.in. witamin (1, 3, 6, 11). Główny korzystny efekt

oddziaływania probiotyków w obrębie przewodu pokarmowego świń polega na zapobieganiu kolonizacji błony śluzowej jelit przez drobnoustroje patogenne (27, 104, 164). W konsekwencji dochodzi m.in. do ograniczenia możliwości namnażania bakterii z gatunków *Salmonella* spp. i *Escherichia coli* oraz występowania poodradzeniowej kolibakteriozy, wywoływanej przez enterotoksyczne szczepy *E. coli* (ETEC) (12). Niezależnie od wspomnianego działania bezpośredniego probiotyki oddziałują stymulacyjnie na lokalne mechanizmy immunologiczne błony śluzowej przewodu pokarmowego (GALT) oraz na odporność systemową, przyczyniając się do pobudzenia mechanizmów obronnych gospodarza, wzmocnienia odporności ogólnej i miejscowej oraz zwiększenia zdrowotności zwierząt (13, 47, 142-144). Aktualne wyniki badań wskazują, że stosowanie probiotyków opartych na licznych szczepach drobnoustrojów jest bardziej korzystne w porównaniu do wytwarzanych na bazie pojedynczych szczepów, ponieważ mogą one m.in. aktywnie oddziaływać w różnych miejscach jelita, prezentując jednocześnie zróżnicowane mechanizmy działania (122, 136, 156). Spośród dostępnych na rynku wieloszczepowych preparatów probiotycznych w żywieniu świń coraz powszechniej wykorzystywane są tzw. efektywne mikroorganizmy (EM). Opublikowane dotychczas wyniki badań wskazują na szerokie możliwości zastosowania EM w różnych gałęziach rolnictwa i przemysłu, m.in. w ogrodnictwie, kompostowaniu, biodegradacji, neutralizacji szkodliwych gazów i odorów, kontrolowaniu wzrostu glonów, a także w gospodarstwie domowym jako środki czyszczące (64, 85). Są one wykorzystywane także w hodowli zwierząt, a ich działanie przejawia się zwiększeniem dziennych przyrostów masy ciała, poprawą przyswajalności paszy, zwiększeniem wydajności produkcyjnej i zdrowotności, a także zmniejszeniem współczynnika śmiertelności (60, 91-92, 140, 149, 153). Pomimo widocznych korzystnych efektów produkcyjnych wiele mechanizmów leżących u podstaw efektywnego oddziaływania tego typu preparatów pozostaje niewyjaśnionych. Dotyczy to w szczególności mechanizmów odpowiedzialnych za modulowanie lokalnej i systemowej odpowiedzi immunologicznej organizmu, które nie zostały

dotychczas bliżej poznane. Z dostępnego piśmiennictwa wynika także, że nie prowadzono szerzej zakrojonych badań dotyczących efektów stosowania EM u macior w okresie ciąży i laktacji oraz ich wpływu na jakość siary i mleka w aspekcie immunologicznym.

Wymienione przesłanki stały się impulsem do zaplanowania i realizacji badań, których celem była ocena efektywności suplementacji EM paszy dla świń we wszystkich etapach cyklu hodowlanego. Oceny tej dokonywano poprzez analizę wybranych wskaźników produkcyjnych i zdrowotnych oraz określenie wpływu stosowania EM jako dodatku paszowego na wybrane parametry nieswoistej i swoistej odpowiedzi immunologicznej u świń we wszystkich etapach produkcji tj. u macior, prosiąt, warchlaków i tuczników.

Badania wykonywano w fermie hodowlanej trzody chlewnej o zamkniętym cyklu produkcyjnym, stanowiącej własność prywatną. Obsadę fermy stanowiło 150 macior stada podstawowego w wieku od 2-4 lat i masie ciała 150-200 kg oraz 3000 świń tworzących poszczególne sektory produkcyjne tj. prosięta w okresie przed i poodsadzeniowym, warchlaki i tuczniaki. W pierwszym etapie badań (praca nr 1) badaniem objęto łącznie 30 świń mieszańców rasy wielka biała polska/polska biała zwisloucha w wieku 5 tygodni o wyjściowej masie ciała 10 kg +/- 0,3 kg. Zwierzęta podzielono na dwie grupy (I i II), liczące po 15 świń. Świnie z grupy I, kontrolnej w całym okresie produkcji żywiono paszą standardową bez dodatku probiotyku. Świnom z grupy II, doświadczalnej dodawano do paszy efektywne mikroorganizmy w postaci preparatu EM Bokashi<sup>®</sup> (Greenland Technologia EM, Janowiec n/Wisłą, Poland) w dawkach zalecanych przez producenta. W drugim etapie (praca nr 2) badania przeprowadzono na losowo wybranych 60 lochach mieszańcach (wielka biała polska x polska biała zwisloucha), które podzielono na dwie grupy (I – grupa kontrolna i II – grupa doświadczalna) liczące po 30 loch. Lochy z grupy I kontrolnej żywiono od momentu inseminacji do odsadzenia prosiąt standardową paszą bez dodatku probiotyku. Lochom z grupy II doświadczalnej, w takim samym prze-

dziale czasowym, do paszy dodawano efektywne mikroorganizmy w postaci preparatu EM Bokashi® w ilości 10 kg/tonę. W trzecim etapie (praca nr 3) badania przeprowadzono na losowo wybranych 60 prosiątach, samicach o masie ciała po urodzeniu 1,10-1,30 kg, które podzielono na dwie grupy, grupę I – kontrolną i grupę II – doświadczalną, liczące po 30 prosiąt. Świnie z grupy I, kontrolnej od 7 dnia życia do końca doświadczenia tj. do uzyskania wagi ubojowej, żywiono standardową paszą bez dodatku probiotyku. Świniom z grupy II, doświadczalnej od 7 dnia życia do końca eksperymentu tj. do uzyskania wagi ubojowej do paszy podstawowej dodawano probiotyk w postaci preparatu EM Bokashi® w ilości 10 kg/tonę paszy.

We wszystkich etapach doświadczeń u świń oceniano parametry zdrowotne, produkcyjne i hodowlane. Do badań immunologicznych wykorzystywano krew pobieraną od świń z grupy I i II w następujących terminach: 60 i 114 dzień ciąży, 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 63, 70, 98, 126 i 154 dzień po urodzeniu oraz po osiągnięciu masy ciała 30 kg, 60 kg, 90 kg, i 115 kg (masa ubojowa). Ponadto, do badań wykorzystywano próbki siary pobierane od loch z grupy I i II w następujących terminach: 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144 i 168 godzina po porodzie. Dodatkowo, przeprowadzono badania z użyciem hodowli izolowanych i stymulowanych konkanawaliną A komórek PBMC siary oraz jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (PBMC). W trakcie badań dokonano analizy stężenia cytokin i immunoglobulin w krwi obwodowej świń, w hodowli niestymulowanych i stymulowanych Con-A komórek PBMC krwi obwodowej, siarze i mleku oraz w hodowli stymulowanych Con-A komórek PBMC siary. Przeprowadzono także cytometryczną analizę ekspresji cząsteczek powierzchniowych CD w odniesieniu do komórek krwi obwodowej świń oraz ocenę zjawiska fagocytozy i metabolizmu tlenowego granulocytów i monocytów. Uzyskane wyniki badań poddane zostały analizie statystycznej.

Wyniki doświadczenia wskazują, że stosowanie EM u loch sprzyja lepszemu wykorzystaniu paszy poprzez zwiększenie jej strawności i przyswajalności, co ogranicza utratę masy ciała samic. Lepsze wykorzystanie składników odżywczych podczas ciąży i laktacji wpływa

bezpośrednio na jakość siary i mleka. Wysoki status immunologiczny siary i mleka macior karmionych paszą z dodatkiem EM wpływał znacząco na obniżenie współczynnika śmiertelności prosiąt w pierwszych 7 dniach życia oraz odsetka prosiąt z objawami biegunki. Wykazano, że immunomodulacyjne działanie EM ogranicza możliwość rozwoju zakażeń, zwłaszcza w obrębie przewodu pokarmowego, co uwarunkowane jest dodatkowo wysokimi stężeniami immunoglobulin i cytokin w sianie i łącznie przekłada się na lepsze efekty produkcyjne oraz ograniczenie strat finansowych na fermach trzody chlewnej. Uzyskane wyniki dowodzą również, że probiotyk EM Bokashi<sup>®</sup> wywiera znaczący wpływ na wielkość parametru ADG u świń podczas całego okresu produkcyjnego, co wiąże się z polepszeniem strawności składników pokarmowych. Ponadto, suplementacja paszy dla świń EM Bokashi<sup>®</sup>, zawierającym różne pożyteczne drobnoustroje, zapewnia oddziaływanie tych mikroorganizmów na wielu etapach odpowiedzi immunologicznej, przyczyniając się do aktywacji komórkowych i humoralnych mechanizmów odporności i zapewniając, poprzez modulowanie reakcji immunologicznych, utrzymywanie równowagi Th1/Th2. Preparat ten, wpływając na mikroflorę przewodu pokarmowego i lokalne mechanizmy odpornościowe (GALT), oddziałuje systemowo na produkcję cytokin pro- i przeciwzapalnych, utrzymuje homeostazę jelitową i ogólnoustrojową oraz hamuje rozwój procesów zapalnych w obrębie przewodu pokarmowego. U świń z grupy eksperymentalnej dochodziło także do zwiększenia aktywności fagocytarnej komórek żernych i wybuchu tlenowego, co dowodzi pobudzenia pod wpływem probiotyku nieswoistych mechanizmów immunologicznych, przyczyniających się do wzmocnienia potencjału odporności na zakażenie. Wykorzystywanie EM Bokashi<sup>®</sup> jako dodatku paszowego dla loch prowadzi do zwiększenia potencjału immunologicznego siary i mleka, uwarunkowanego wzrostem syntezy immunoglobulin i cytokin pro- i przeciwzapalnych uczestniczących w procesie modulacji odpowiedzi immunologicznej i utrzymywania równowagi Th1/Th2, co wtórnie wpływa na wzmocnienie potencjału odporności biernej prosiąt ssących.

## 7. SUMMARY

Rational pig nutrition is one of the most important factors influencing production outcomes, and thus the profitability of pig farming (168, 170). Contemporary systems based on intensive pig production, early weaning of piglets, and fast, efficient fattening increase susceptibility to the adverse effects of various stress factors contributing to the occurrence of gastrointestinal diseases with symptoms of diarrhoea (58, 126). One of the measures commonly taken in the past to improve the health of pigs in intensive farming conditions was the administration of subtherapeutic doses of antibiotics as feed additives (3, 32). The definitive withdrawal of chemotherapeutics from pig feeding systems in 2006 helped to mitigate the problem of bacterial drug resistance, but caused an increase in cases of diarrhoea and gastrointestinal inflammation in pigs, leading to a decrease in weight gains and an increase in mortality, thus increasing the cost of pig production (35). This has created the need for alternative dietary strategies aimed at maintaining a high level of animal health and production performance while at the same time obtaining high-quality food products that are safe for consumers and the environment (152, 160). Among the numerous compounds currently used as feed additives for pigs to improve nutrition efficiency, animal health status and condition, and productivity, the most commonly used are various types of probiotics (24, 26, 28).

Probiotics ensure microbial balance in the intestines, stimulate the development of enterocytes, regulate gastrointestinal motility, increase feed conversion by improving digestion and absorption, and take part in the production of numerous biologically active compounds, including vitamins (1, 3, 6, 11). The main beneficial effect of probiotics in the gastrointestinal tract of pigs is the prevention of colonization of the mucosa by pathogenic microbes (27, 104, 164). This reduces multiplication of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* and the occurrence of post-weaning colibacillosis induced by enterotoxic strains of *E. coli* (ETEC) (12). Independently of the direct effect of probiotics, they have stimulatory effects on the local immune mechanisms of the intestinal

mucosa (GALT) and on systemic immunity, thereby improving animal health (13, 47, 142-144). Current research results indicate that probiotics based on multiple strains of microbes are more beneficial than those produced from single strains, as they can act in various parts of the intestine, simultaneously presenting diverse mechanisms of action (122, 136, 156). Among commercially available multi-strain probiotic preparations, effective microorganisms (EMs) are increasingly used in the diet of pigs. Published research results indicate that EMs have a broad range of potential application in various branches of agriculture and industry, such as horticulture, composting, biodegradation, neutralization of harmful gases and odours, and controlling algae growth, as well as in household cleaning products (64, 85). They are also used in livestock farming, with effects manifested as increased weight gains, improved feed digestibility, increased production efficiency, improved health, and reduced mortality (60, 91-92, 140, 149, 153). Despite their evident production benefits, many mechanisms underlying the effective action of these preparations remain unexplained. This applies in particular to mechanisms responsible for modulating the local and systemic immune response, which are not well understood. The available literature also does not contain extensive studies on the effects of EMs in sows during pregnancy and lactation or their effect on the immunological quality of colostrum and milk.

These considerations were the inspiration for planning and implementing research aimed at evaluating the effectiveness of EMs as a dietary supplement for pigs at all stages of the production cycle. The evaluation was carried out by analysing selected indicators of performance and health and determining the effect of EMs used as a feed additive on selected parameters of the non-specific and specific immune response in pigs at all stages of production: sows, piglets, weaners and fatteners.

The study was conducted on a private pig farm with a closed production cycle. The farm had a foundation stock of 150 sows at the age of 2-4 years and body weight of 150-200 kg, as well as 3000 pigs in various production sectors: pre-weaning piglets, weaners, and fatteners.

The first stage of the research (paper no. 1) included 30 Polish Large White x Polish Landrace crossbred pigs at the age of 5 weeks with an initial body weight of 10 kg +/-0.3 kg. The animals were divided into two groups (I and II) of 15 pigs each. The pigs in group I, the control, received a standard diet without a probiotic supplement throughout the production period. The pigs in group II, the experimental group, received a diet supplemented with effective microorganisms in the form of the preparation EM Bokashi® (Greenland Technologia EM, Janowiec n/Wisłą, Poland) in amounts recommended by the manufacturer. The second stage of the research (paper no. 2) was conducted on 60 randomly selected crossbred sows (Polish Large White x Polish Landrace) divided into two groups of 30 sows each (groups I and II). The sows in group I (control) were fed standard feed without a probiotic supplement from insemination until the piglets were weaned. During the same period, the sows in group II (experimental) received feed supplemented with effective microorganisms in the form of EM Bokashi® in the amount of 10 kg/tonne. Stage 3 of the research (paper no. 3) was conducted on 60 randomly selected female piglets with a birth weight of 1.10-1.30 kg, divided into two groups of 30 piglets each. The pigs in group I (control) were fed standard feed without a probiotic supplement from 7 days of age to the end of the experiment, i.e. until they reached slaughter weight. During the same period, the pigs in group II (experimental) received feed supplemented with effective microorganisms in the form of EM Bokashi® in the amount of 10 kg/tonne of feed.

Health, rearing, and production parameters were assessed during all stages of the research. For immunological analyses, blood was collected from pigs from groups I and II at 60 and 114 days of gestation, at 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 63, 70, 98, 126 and 154 days after birth, and after the pigs reached a body weight of 30 kg, 60 kg, 90 kg, and 115 kg (slaughter weight). In addition, colostrum samples collected from the sows in groups I and II at 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144 and 168 hours after parturition were analysed. Analyses were also conducted on cultures of polymorphonuclear leukocytes of the colostrum and peripheral blood stimulated with concanavalin A.



The concentrations of cytokines and immunoglobulins were determined in the peripheral blood of pigs, in cultures of Con-A-stimulated and non-stimulated polymorphonuclear leukocytes of the peripheral blood, in the colostrum and milk, and in cultures of Con-A-stimulated polymorphonuclear leukocytes of the colostrum. Cytometric analysis of the expression of CD surface molecules in the peripheral blood cells of pigs was performed, as well as evaluation of phagocytosis and oxygen metabolism of granulocytes and monocytes (burst test). Statistical analysis of the results was performed.

The results indicate that the use of EM in sows improves feed conversion by increasing digestibility and nutrient bioavailability, which reduces weight loss in female pigs. Better nutrient utilization during pregnancy and lactation directly affects the quality of colostrum and milk. The high immune status of the colostrum and milk of sows whose diet was supplemented with EMs led to a significant reduction in piglet mortality in the first 7 days of life and in the percentage of piglets with diarrhoea. The immunomodulatory activity of EMs was found to reduce the potential for infections, especially in the gastrointestinal tract, due in part to the high concentrations of immunoglobulins and cytokines in the colostrum and milk, resulting in better production outcomes and reducing financial losses on pig farms. The results also demonstrate that the probiotic product EM Bokashi® significantly affects average daily gains in pigs throughout the production period, which is linked to improved nutrient digestibility. In addition, supplementation of pig feed with EM Bokashi®, containing a variety of beneficial microbes, ensures that these microbes act at multiple stages of the immune response, activating cellular and humoral immune mechanisms and maintaining the Th1/Th2 balance by modulating immune responses. By influencing the gut microbiota and local immune mechanisms (GALT), this preparation has a systemic effect on the production of pro- and anti-inflammatory cytokines, maintains intestinal and systemic homeostasis, and inhibits the development of gastrointestinal inflammation. There was also an increase in phagocytic activity and respiratory burst

in the pigs from the experimental group, which indicates that the probiotic induced stimulation of non-specific immune mechanisms increasing potential resistance to infection. The use of EM Bokashi® as a feed additive for sows increases the immune potential of the colostrum and milk through an increase in synthesis of pro- and anti-inflammatory cytokines taking part in modulation of the immune response and maintenance of the Th1/Th2 balance, which increases the passive immune potential of suckling piglets.