

**UNIVERZITET U BEOGRADU**  
**FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE**



**STAMEN B. RADULOVIĆ**

**ISPITIVANJE UTICAJA PRIRODNIH  
STIMULATORA RASTA NA  
ZDRAVSTVENO STANJE I  
PROIZVODNE REZULTATE PRASADI U  
ODGOJU**

**Doktorska disertacija**

Beograd, 2014.

**UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE**



**STAMEN B. RADULOVIĆ**

**EXAMINATION OF INFLUENCE OF  
NATURAL GROWTH PROMOTERS ON  
THE HEALTH STATUS AND  
PERFORMANCES OF REARING PIGS**

**Doctoral dissertation**

Belgrade, 2014.

## **Mentor:**

**dr Dragan Šefer**

Vanredni profesor

Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

Katedra za Ishranu i botaniku

## **Članovi Komisije:**

**dr Dejan Krnjajić**

Vanredni profesor

Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

Katedra za Mikrobiologiju

**dr Radmila Marković**

Docent

Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

Katedra za Ishranu i botaniku

**dr Dobrila Jakić-Dimić**

Naučni savetnik

Naučni institut za veterinarstvo Srbije, Beograd

**dr Vojin Ivetić**

Viši naučni saradnik

Naučni institut za veterinarstvo Srbije, Beograd

(.....)

datum odbrane doktorske disertacije

## ISPITIVANJE UTICAJA PRIRODNIH STIMULATORA RASTA NA ZDRAVSTVENO STANJE I PROIZVODNE REZULTATE PRASADI U ODGOJU

**Rezime:** U cilju ispitivanja uticaja različitih stimulatora rasta u ishrani prasadi na proizvodne rezultate i zdravstveno stanje organizovan je ogled po grupno-kontrolnom sistemu na farmi registrovanog gazdinstva u Malim Radincima. Ogled je trajao 40 dana, a podeljen je u dve faze od po 20 dana. Za ogled je korišćeno 48 prasadi, melezi švedskog landrasa i pietrena, odbijenih od krmače u starosti od 35 dana. Ispitivanja su izvedena na prasadima oba pola, prosečne telesne mase  $8,61 \pm 1,59$  kg koja su odmah nakon odbijanja raspoređena u jedan od četiri hranidbena tretmana. Kontrolna grupa prasadi hranjena je smešom bez stimulatora rasta, dok su ogledne grupe, po redosledu, dobijale hranu sa dodatkom preparata probiotika, prebiotika ili fitobiotika u količinama preporučenim od strane proizvođača.

Tokom ogleada praćeno je zdravstveno stanje i proizvodni rezultati prasadi. Na početku i kraju svake faze ogleada izvršeno je merenje telesne mase životinja, utrošak hrane kao i uzimanje uzoraka potpunih smeša za analizu a iz dobijenih podataka vršeno je izračunavanje ostalih proizvodnih rezultata. Na kraju druge faze ogleada izvršeno je planirano žrtvovanje po 6 jedinki iz svake grupe, a prilikom žrtvovanja uzeti su uzorci creva i crevnog sadržaja za fizičko-hemijska, mikrobiološka i histološka ispitivanja.

Tokom ogleada nije došlo do poremećaja zdravstvenog stanja i/ili ispoljavanja kliničkih znakova oboljenja. Kontrolna grupa prasadi hranjena smešama bez dodatog stimulatora rasta postgla je uobičajenu telesnu masu, dnevni prirast, konzumaciju i konverziju hrane za datu rasu, starost i uslove držanja. Korišćenjem stimulatora rasta postignuti su bolji proizvodni rezultati u odnosu na kontrolnu grupu, s tim da je upotreba probiotika rezultirala najboljim proizvodnim rezultatima zasnovanim na najvećoj postignutoj telesnoj masi ( $27,98 \pm 4,76$  kg), najvećem ostvarenom prosečnom dnevnom prirastu ( $0,49 \pm 0,09$  kg) i najboljoj konverziji hrane (1,959). Upotrebom stimulatora rasta smanjen je ukupan broj bakterija u ispitivanim delovima digestivnog trakta, čime je povećana dostupnost hranljivih materija domaćinu. Pozitivan uticaj dodatih stimulatora rasta na morfometrijske karakteristike sluznice creva ostvaren je povećanjem dužine i širine crevnih resica u jejunumu, kao i dubine kripte u cekumu

čime je povećan resorptivni kapacitet crevne sluznice. Najizraženija razlika u navedenim parametrima ostvarena između grupe koja je putem hrane dobijala preparat probiotika i kontrolne grupe prasadi, što je rezultiralo i statističkom značajnošću ( $p < 0,001$  i  $p < 0,01$ , retrospektivno).

Korišćenje probiotika, fitobiotika i prebiotika kao alternativnih mogućnosti u stimulaciji rasta i kontroli enteropatogenih bakterija ima svoje nutritivno, medicinsko i ekonomsko opravdanje.

**Ključne reči:** *prasad, stimulatori rasta, proizvodni rezultati, morfologija*

**Naučna oblast:** Veterinarstvo

**Uža naučna oblast:** Ishrane

**UDK broj:** 636.087.7+641.18:616-092.11+330.357:636.4+591.35

## **EXAMINATION OF THE INFLUENCE OF NATURAL GROWTH PROMOTERS ON THE HEALTH STATUS AND PERFORMANCES OF REARING PIGS**

**Summary:** In order to investigate the influence of different growth promoters in pigs nutrition on the performance and health status trial was organized by a group-control system on the registered farm in Mali Radinci. The experiment lasted 40 days and was divided into two phases, 20 days of each. For the experiment 48 piglets were used, Swedish Landrace and Pietrain, weaned at the age of 35 days. Examinations were carried out on pigs, with an average body weight of  $8.61 \pm 1.59$  kg, which were arranged immediately after weaning into the one of the four feeding treatments. The control group was fed a mixture without growth promoters, while the experimental groups, in order, had a diet containing product of probiotics, prebiotics or phytobiotics in the amounts recommended by the manufacturer.

During the experiment, health status and performances of pigs have been observed. At the beginning and at the end of each phase of the experiment, animal body

weight and feed consumption were evaluated, as well as sampling of complete mixtures for analysis and with obtained data was performed calculating of other production items. At the end of the second phase of the experiment planned sacrifice was carried out on the 6 animals in each group, and samples of intestine and intestinal content were taken for the physico-chemical, microbiological and histological examination.

During the experiment, there was no disturbance of health and manifestation of clinical signs of disease were not recorded. The control group of pigs fed a diet without added growth stimulators achieved normal body weight, daily gain, feed consumption and feed conversion for a given race, age and housing conditions. Using the growth stimulators led to the better performances compared to the control group, with the probiotics resulted in the best production results based on the maximum achieved body weight ( $27.98 \pm 4.76$  kg), the largest average daily gain ( $0.49 \pm 0.09$  kg) and the best feed conversion (1.959). The use of growth promoters reduced the total number of bacteria in the examined parts of the digestive tract, thus increasing the availability of nutrients to the host. The positive impact of added growth promoters on morphometric characteristics of the intestine mucosa was achieved by increasing the length and width of the villi in the jejunum and crypt depth in the cecum, which led to increased resorptive capacity of the intestinal mucosa. The most pronounced differences in these parameters were observed between the groups that received preparation of probiotic through the feed and control groups of pigs, and they were statistically significant ( $p < 0.001$  and  $p < 0.01$ , respectively).

The use of probiotics, phytobiotics and prebiotics, as alternative options in growth stimulation, as well as in the control of enteropathogenic bacteria has its nutritional, medical and economic justification.

**Key words:** *pigs, growth promoters, performance, morphology*

**Scientific field:** Veterinary medicine

**Specific scientific field:** Nutrition

**UDC:** 636.087.7+641.18:616-092.11+330.357:636.4+591.35

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b>	<b>1</b>
<b>2. PREGLED LITERATURE</b>	<b>3</b>
<b>2.1. Odbijanje prasadi</b>	<b>3</b>
<b>2.1.1. Značaj i strategije procesa odbijanja prasadi</b>	<b>3</b>
<b>2.1.2. Optimalno vreme za odbijanje prasadi</b>	<b>6</b>
<b>2.1.3. Ishrana odbijene prasadi</b>	<b>9</b>
<b>2.1.4. Negativni aspekti odbijanja prasadi</b>	<b>13</b>
<b>2.1.5. Uticaj procesa odbijanja prasadi na crevnu mikrobiotu</b>	<b>15</b>
<b>2.1.6. Uticaj procesa odbijanja prasadi na morfološke karakteristike digestivnog trakta</b>	<b>19</b>
<b>2.2. Pronutritivne materije u ishrani životinja</b>	<b>25</b>
<b>2.2.1. Antibiotici kao stimulatori rasta u ishrani životinja</b>	<b>27</b>
<b>2.2.2. Uloga, značaj i mehanizam dejstva probiotika</b>	<b>29</b>
<b>2.2.2.1 Efekti upotrebe probiotika kao stimulatora rasta u ishrani prasadi</b>	<b>35</b>
<b>2.2.3. Uloga, značaj i mehanizam dejstva prebiotika</b>	<b>39</b>
<b>2.2.3.1. Efekti upotrebe prebiotika kao stimulatora rasta u ishrani prasadi</b>	<b>45</b>
<b>2.2.4. Uloga, značaj i mehanizam dejstva fitobiotika</b>	<b>48</b>
<b>2.2.4.1. Efekti upotrebe fitobiotika kao stimulatora rasta u ishrani prasadi</b>	<b>54</b>
<b>3. CILJ I ZADATAK RADA</b>	<b>59</b>
<b>4. MATERIJAL I METOD RADA</b>	<b>61</b>
<b>4.1. Izbor materijala</b>	<b>61</b>
<b>4.2. Držanje i hranjenje prasadi</b>	<b>61</b>
<b>4.3. Formiranje ogleđa</b>	<b>62</b>
<b>4.4. Ishrana prasadi</b>	<b>62</b>
<b>4.5. Metode hemijske analize hrane</b>	<b>64</b>
<b>4.6. Zdravstveno stanje</b>	<b>65</b>
<b>4.7. Proizvodni rezultati</b>	<b>65</b>

4.8. Ispitivanje elektrohemijske reakcije himusa	66
4.9. Mikrobiološka ispitivanja	66
4.10. Histološka ispitivanja	66
4.11. Statistička obrada podataka	67
<b>5. DOBIJENI REZULTATI</b>	<b>68</b>
5.1. Hemijski sastav smeša	68
5.2. Zdravstveno stanje	69
5.3. Proizvodni rezultati	70
5.4. Rezultati ispitivanja elektrohemijske reakcije himusa	73
5.5. Rezultati mikrobioloških analiza	74
5.6. Rezultati morfometrijskih ispitivanja	76
<b>6. DISKUSIJA</b>	<b>79</b>
6.1. Hemijski sastav smeša	79
6.2. Zdravstveno stanje	80
6.3. Proizvodni rezultati	81
6.4. Ispitivanja elektrohemijske reakcije himusa	89
6.5. Mikrobiološka ispitivanja creva	91
6.6. Morfometrijska ispitivanja creva	96
<b>7. ZAKLJUČAK</b>	<b>104</b>
<b>8. SPISAK LITERATURE</b>	<b>106</b>
<b>9. PRILOG</b>	
<b>10. Biografija</b>	
<b>11. Izjava o autorstvu</b>	
<b>12. Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada</b>	
<b>13. Izjava o korišćenju</b>	



## 1. UVOD

Kontinuirani razvoj proizvodnje svinja u svetu (godišnji rast od 2,6 %) omogućen je napretkom nauke, a posebno razjašnjavanjem fizioloških i biohemijskih procesa u organizmu, boljim poznavanjem sastava i kvaliteta hrane za životinje, kao i implementacijom savremenih saznanja u tehnologiju proizvodnje.

Učešće troškova ishrane u ukupnim troškovima u svinjarskoj proizvodnji trebalo bi da iznosi 60-80% i ukoliko je njihovo učešće u ukupnim troškovima veće, utoliko se i proizvodnja smatra ekonomičnijom. Odgovarajućim izborom hraniva, njihovim optimalnim kombinovanjem i precizno formulisanim i prilagođenim obrokom moguće je uticati na zdravlje životinje i obezbediti visoku proizvodnju uz manju potrošnju hrane po jedinici proizvoda.

Najosetljiviju kategoriju svinja predstavljaju prasadi, koja imaju visoke zahteve u pogledu smeštaja i nege, ali i u pogledu ishrane. Iz tog razloga, danas ima mnogo nerešenih problema u odgoju prasadi koji se manifestuju gubicima (približno 8 do 20%), s tim da se najveći deo ovih gubitaka dešava u periodu sisanja i odbijanja prasadi od krmače. Navedeni period je kritičan u odgoju prasadi jer je praćen brojnim stresorima koji dovode do smanjenog unosa hrane, slabog intenziteta rasta, kao i povećane osetljivosti na crevne poremećaje i infekcije, što rezultuje nastankom proliva.

Pored osnovnih hraniva, sa ciljem poboljšanja kvaliteta hrane, a samim tim poboljšanja zdravstvenog stanja i proizvodnih rezultata životinja, u obroke se uključuje veliki broj dodataka hrani za životinje. U pitanju su vrlo raznovrsne materije koje ne smeju da budu škodljive a moraju da ispolje efikasnost u smislu namene.

Tokom poslednjih decenija, rešavanje brojnih problema vezanih za odgoj prasadi je uključivalo preventivnu upotrebu antibiotika kao dodataka hrani za životinje. Međutim, pored brojnih pozitivnih efekata upotrebe antibiotika, zabeleženo je stvaranje rezistentnih sojeva enterobakterija, pojava unakrsne rezistencije i rezidua antibiotika u namirnicama animalnog porekla, kao i moguće genotoksično delovanje, što je navelo Evropsku uniju da razmotri o njihovoj zabrani. U Regulativi Evropske unije (Regulation (EC) No 1831/2003) iznosi se da antibiotici, izuzev kokcidostatika i histomonostatika,

mogu biti u prometu i koristiti se kao dodaci hrani za životinje samo do 31. decembra 2005. godine, a da se od 1. januara 2006. godine navedene supstance brišu iz Registra.

Opisane promene strategije navele su industriju hrane za životinje da predloži alternativne supstance za kontrolu zdravstvenih poremećaja svinja. Posebnu pažnju naučne i stručne javnosti, a svakako i potrošača, izazvali su stimulatori rasta, a među njima probiotici, prebiotici i fitobiotici, koje Evropska Komisija (Regulation (EC) No 1831/2003) svrstava u grupu zootehničkih i senzornih aditiva.

Korišćenjem probiotika, prebiotika i fitobiotika postižu se slični efekti kao pri korišćenju antibiotika, s tim što ne ostavljaju rezidue, niti imaju karencu. Pozitivni efekti zasnivaju se na dobro poznatom značaju održavanja eubiotičkih odnosa, jer ravnoteža u mikropopulaciji digestivnog trakta omogućava efikasno varenje i resorpciju hranljivih materija povećavajući otpornost prema poremećajima izazvanim enteropatogenim bakterijama. Ishranom se može uticati putem tri načina na održavanje eubioze i to uključivanjem živih mikroorganizama koji nakon ingestije postaju metabolički aktivni (probiotici), uključivanjem hraniva koja sadrže nesvarljive sastojke i stimulišu rast i aktivnost poželjne mikroflore (prebiotici) ili upotrebom prirodnih dodataka sa jasno ispoljenim antibakterijskim dejstvom (fitobiotici). Navedeni dodaci omogućavaju stimulaciju rasta prasadi korišćenjem njihovih prirodnih fizioloških potencijala i mehanizama obezbeđujući uslove za ostvarenje genetski projektovanog obima proizvodnje.

Podaci o upotrebi različitih stimulatora rasta su nepotpuni i često vrlo kontradiktorni, a naročito oni koji se odnose na njihov uticaj na proizvodne rezultate u odgoju prasadi. S obzirom na aktuelnost i značaj navedene problematike, naučno opravdano i interesantno za praksu je da se ispituju mogućnosti i efekti upotrebe alternativnih stimulatora rasta na zdravstveno stanje i proizvodne rezultate prasadi u odgoju.

## **2. PREGLED LITERATURE**

U literaturi koja obrađuje problematiku upotrebe različitih stimulatora rasta u smešama za ishranu prasadi postoji relativno veliki broj podataka koji ovaj problem osvetljavaju sa različitih aspekata. U pregledu literature navedeni su samo oni podaci koji su definisani ciljem rada, a radi lakše preglednosti materije poglavlje je podeljeno u nekoliko delova.

### **2.1. Odbijanje prasadi**

#### **2.1.1. Strategije i značaj procesa odbijanja prasadi**

Odbijanje životinja se, obično, definiše kao "privikavanje mladih na gubitak majčinog mleka ili izazivanje prestanka sisanja" (Counsilman i Lim, 1985). Martin (1984) navodi da čin odbijanja predstavlja čitav niz nutritivnih, morfoloških i fizioloških promena, kao i promena u ponašanju, koje prate prelaz ka daljem razvoju, koji je nezavisan od prisustva roditelja i predlaže da se termin odbijanje odnosi na period kada se roditeljska briga prema potomstvu rapidno smanjuje. Trivers (1974) je predložio model u kome proces odbijanja predstavlja rezultat sukoba interesa između majke i potomstva, pošto mladi imaju koristi od roditeljske brige tokom perioda koji je duži od onog koji je optimalan za kondiciju majke.

Interesantno je pitanje kada proces odbijanja prasadi zapravo počinje. Jensen i Recon (1989) su utvrdili da je odbijanje prasadi postepen i neprekidan proces koji verovatno počinje veoma rano nakon prašenja. U ogledu koji su postavili Jensen i sar. (1991) sam akt sisanja je podeljen u 4 faze, a praćena je dužina trajanja svake od njih. Na osnovu dobijenih podataka autori su zaključili da su neki aspekti odbijanja uočeni već tokom prvih nekoliko dana posle porođaja. Iako je dobro poznato da se proizvodnja mleka kod krmača povećava do oko treće nedelje posle prašenja (English i sar, 1977), a da odbijanje u svom tradicionalnom značenju ne počinje pre isteka navedenog perioda,

određene promene ponašanja ipak usmeravaju prasad ka navedenom procesu već u najranijem postnatalnom dobu.

U intenzivnoj stočarskoj praksi, mladi se odvajaju od svojih majki u mnogo ranijem uzrastu nego prilikom odgoja u prirodi, što pored brojnih prednosti za proizvođače, za posledicu ima i nastanak brojnih zdravstvenih problema kod prasadi (Wood-Gush i Csermeli, 1981; Algers, 1984a, b). Poznavanje ponašanja i fizioloških osobnosti prasadi tokom prirodnog procesa odbijanja je neophodno za razvoj i implementaciju novih postupka u savremenoj proizvodnji koji bi, što je moguće više, trebalo da budu u skladu sa biološkim potrebama životinje.

U prirodi, odbijanje ne predstavlja nagli događaj, već proces koji se odvija tokom perioda od nekoliko nedelja. Prosečna starost prasadi u prirodi kada su potpuno odbijena od krmače je 17 nedelja (Jensen i Recen, 1989; Petersen, 1994) uz velike varijacije unutar legla (u intervalu od 15,6 do 19,5 nedelja). Proces odbijanja u prirodi se sastoji od tri različita, ali međusobno povezana razvojna dela: ponašanje, nutritivni i imunološki deo. Odgovarajućim razvojem svakog od njih utiče se na zdravlje praseta i njegovu sposobnost da funkcioniše nezavisno od majke i ostale prasadi iz legla.

Period u životu praseta pre odbijanja, u prirodi, može se podeliti i posmatrati kroz 4 faze (Brooks i Tsourgiannis, 2003). Tokom prvih 10 dana laktacije (interval 3–16 dana), prasad ostaju u leglu koje je pripremila krmača (faza sakrivanja) i koriste isključivo njeno mleko koje usmerava razvoj digestivnog trakta i obezbeđuje pasivnu imunološku zaštitu. U narednoj fazi (praćenje), tokom druge i treće nedelje, prasad prate krmaču tokom njene potrage za hranom, probaju hraniva koja krmača jede i time stimulišu razvoj digestivnih enzima, kao i razvoj aktivnog imuniteta. Tokom navedenog perioda pasivni imunitet opada, a aktivan imunitet tek počinje da se razvija. Period od četiri do osam nedelja starosti (faza učenja) karakteriše integracija prasadi sa jedinkama izvan sopstvenog legla i aktivno traganje za hranom, tako da se između 4. i 11. nedelje starosti povećava procenat vremena provedenog na ispaši od 7 do 56% (Petersen, 1994). Svinje su prvenstveno biljojedi (Baber i Coblenz, 1987) čiji obrok je sastavljen od 90% hrane biljnog porekla, od kojih 50 % čine semena različitih biljaka i voće (Spitz, 1986), a preostalih 10% uglavnom obuhvata insekte, mekušce i gliste. Shodno tome, u obroku divljeg praseta u momentu kada počne sa uzimanjem čvrste hrane sadržaj suve materije kreće se između 15 i 30%.

U prirodi, ovaj postepeni prelaz sa mlečne ishrane, preko mešovite, na ishranu u potpunosti bez mleka, stimuliše razvoj enzima i imunog sistema nezrelog gastrointestinalnog trakta (GIT), kao i mikrobne populacije u gastrointestinalnom traktu prasadi.

Pri komercijanom odgoju prasad se odbijaju u ranijem uzrastu nego što je slučaj u prirodi, čime se povećava indeks prašenja krmača. Skraćanjem perioda sisanja, krmače manje gube na kondiciji, skraćuje se servis period tako da se prvi estrus javlja već posle 5 dana za razliku od klasičnog odbijanja kada se estrus javlja posle 21. dana od odbijanja. Ranijim odvajanjem prasadi od krmače smanjuje se rizik prenosa bolesti, a prasadima se pruža mogućnost da ispolje veliki potencijal za rast, s obzirom da prasad koja sisaju zbog ograničenja u količini i sastavu mleka nisu u stanju da u potpunosti zadovolje genetski potencijal rasta. Procesom odbijanja prasad, po pravilu, ranije nauče da jedu ostalu hranu mimo majčinog mleka, podstičući razvoj gastrointestinalnog trakta i lučenje digestivnih enzima, posledično ostvarujući bolje proizvodne rezultate (Pluske i sar., 2003).

Iako mleko krmače obezbeđuje sve potrebne hranljive materije prasetu, nakon prve nedelje se javlja deficit u njihovoj količini. Navedeni deficit treba prihvatiti uslovno, pošto se prasad i bez prihranjivanja normalno razvijaju bez negativnih posledica uz nešto niži ostvareni prirast. Kovčin i sar. (1986) navode da deficit proteina u prvoj nedelji života iznosi 12, u drugoj 16 i u trećoj 24 g po prasetu, dnevno. Od treće nedelje javlja se i deficit u energiji, s tim da se i deficit u proteinima povećava. Iz tog razloga prihranjivanje prasadi počev od druge nedelje je opravdano i neophodno. Uobičajena praksa odgajivača svinja je prihranjivanje prasadi dodatnom hranom mimo majčinog mleka putem specijalno proizvedenih krmnih smeša (predstartera). Osnovna svrha navedene prakse je obezbeđivanje zadovoljavajućeg prirasta i telesne mase praseta prilikom odbijanja, kao i priprema digestivnog trakta na varenje kompleksnih ugljenih hidrata i proteina koji će biti osnova budućeg obroka (King i Pluske, 2003).

Na osnovu trenutno važećeg pravilnika o kvalitetu hrane za životinje u našoj zemlji (službeni glasnik RS broj 41/09, član 49) potpune smeše za prihranjivanje prasadi (predstarteri) moraju da sadrže najmanje 22% proteina, 7% masti i najviše 4 % celuloze i obezbeđivati 13,5 MJ/kg metaboličke energije. Prasad koja su naviknuta da tokom perioda sisanja unose i vare dovoljnu količinu predstartera lakše će podneti stres

izazvan odbijanjem i imaće kraći period u zastoju rasta koji je karakterističan za period posle odbijanja. Smatra se poželjnim, da u farmskim uslovima držanja, prasadi u vreme odbijanja konzumiraju 100-200 g hrane dnevno i na taj način suvom hranom zadovolje najmanje 50% svojih potreba u hranljivim materijama. Navedeni unos hrane je teško ostvariv u uslovima ranijeg odbijanja prasadi.

### **2.1.2. Optimalno vreme za odbijanje prasadi**

Skraćivanje perioda laktacije, pored napretka ostvarenog na polju ishrane i genetike, predstavlja jedan od najvažnijih faktora u poboljšanju produktivnosti u svinjarskoj industriji, ali uz varijabilne uspehe tokom proteklih decenija. Osnovni ograničavajući faktori u ovom postupku odnosili su se na nedostatak adekvatne hrane, kao i na nedovoljno visoke standarde smeštajnih i higijenskih uslova na farmama. Uporedo sa razvojem zadovoljavajućih rešenja, klasičan način odbijanja prasadi sa 8 nedelja ubrzo smenjuju nove strategije koje predlažu odbijanje pri ranijem uzrastu, dok pojedine zemlje (SAD) usvajaju tehnologiju odgoja prasadi rođenih pomoću hirurškog zahvata, (histerektomije) sa ciljem proizvodnje prasadi slobodnih od bolesti. Van der Heyde (1971a,b) navodi kao ključne promene u ishrani odbijene prasadi zamenu dotadašnjih obroka u tečnoj formi suvom peletiranom hranom u uzrastu prasadi od 5-7 dana, kao i odgoj prasadi nakon odbijanja u kaveznom sistemu čime se rešavaju neki od osnovnih dotadašnjih problema, s tim da se otvaraju i mogućnosti za nastanak novih. Jensen (1991) navodi da su poremećaji ponašanja česti, kao direktna posledica ranog odbijanja prasadi (odsustvo majke, nagle promene u ishrani, loši uslovi okruženja koje pružaju boksovi i kavezi malih dimenzija). Van Putten i Dammers (1976) su utvrdili da prasadi u kavezima znatno češće ispoljavaju znake abnormalnog ponašanja nego prasadi gajena zajedno sa krmačom u boksovima sa prostirkom (slamom). Shodno tome, Algiers (1984a) ukazuje da rano odbijena prasadi u kavezima imaju veću učestalost pojave griže u odnosu na konvencionalno gajenu.

Većina autora je saglasna da se drastičnim skraćivanjem perioda laktacije i odbijanjem prasadi u uzrastu pre 14. dana više ne postižu isti efekti kao i posle 14. dana, jer materica krmače nije u stanju da prihvati novu koncepciju pre 16-17. dana po partusu, koliko je potrebno za njenu involuciju. Pojava estrusa pre navedenog vremena

ne povećava indeks prašenja jer veliki broj krmača ostaje negravidan ili se oprasi manji broj prasadi (Te Brake, 1972; Krivec i sar., 1973).

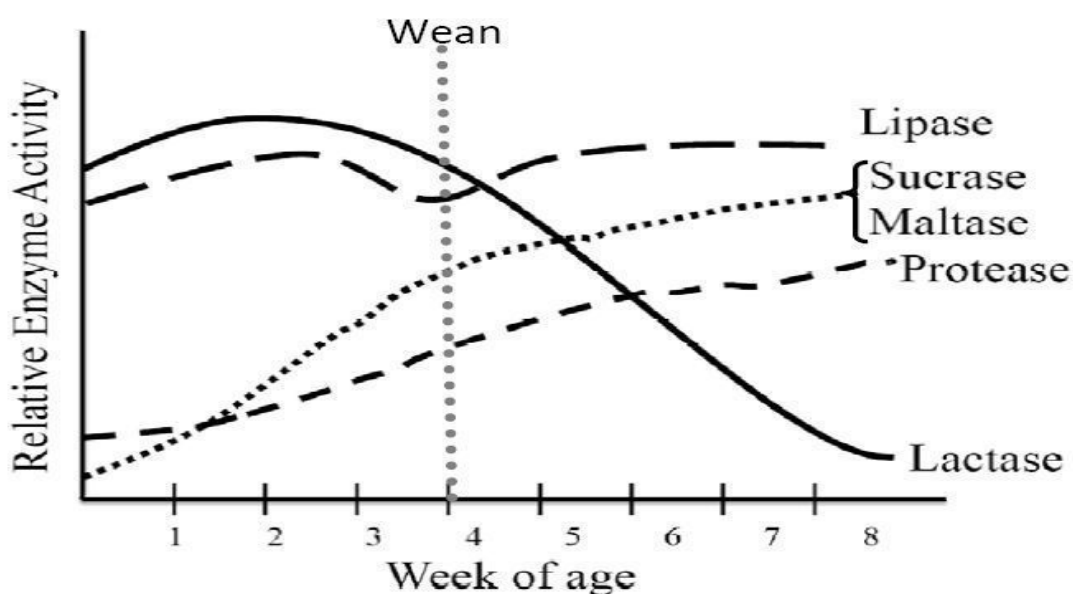
Te Brake (1976), procenjujući najprofitabilniji period trajanja laktacije u proizvodnji prasadi telesne težine do 20 kg, izračunao je da je optimalno vreme odbijanja sa 21-25 dana. Danski eksperimenti (Danielsen i Nielsen, 1979) su pokazali da je odbijanje sa 4 nedelje dalo najviše prasadi po krmači, kao i tokom cele godine. Novije strategije (od 1990-ih) u svinjarskoj industriji predlažu rano zalučenje (<21 dana starosti) prasadi, a u naporima da povećaju produktivnost i smanje izloženost patogenima poreklom od krmače, tek odbijena prasad se transportuju u drugo, izolovano mesto, što je opisano kao odvojeno rano odbijanje (segregated early weaning - SEV). Brown i sar. (2002a) i Dritz i sar. (1994, 1996) navode da izdvojena prasad ostvaruju bolje proizvodne rezultate u poređenju sa prasadima koja se odgajaju u konvencionalnom objektu pre svega kao posledica smanjenog prisustva patogena, ali i smanjenog utroška energije za razvoj imunog odgovora na izazov patogena. U 2000. godini više od 4% farmi u SAD je primenjivalo navedenu tehniku (NAHMS, 2000). Međutim, uprkos pozitivnim rezultatima, u praksi je uočena i ugroženost dobrobiti životinja ispoljena brojnim znakovima frustracije usled nedostatka željenog taktilnog kontakta sa krmačom (Weary i sar., 1999).

Rezultati do kojih su došli Blecha i sar. (1983), upotrebom fitohemaglutinin testa, ukazuju da odbijanje prasadi u uzrastu mlađem od 5 nedelja izaziva fiziološke promene štetne za celularni imuni odgovor, koje dalje potenciraju nastanak bolesti.

Ševković i sar. (1983) navode 4 moguća načina u odhranjivanju prasadi: klasičan način (najprirodniji, dojenje 8 nedelja), ranije zalučivanje (prasad se zalučuje između 35. i 42. dana), rano zalučivanje (prasad se zalučuje u vremenu od 14. do 28. dana) i veštačko odhranjivanje (podrazumeva ishranu prasadi od prvih dana života hranom mimo majčinog mleka).

Optimalno vreme za odbijanje prasadi uslovljeno je brojnim faktorima i zahtevima koji su često međusobno konfliktni i moraju biti razmotreni za svaki sistem i uslove odgoja posebno. Kao najvažniji faktori navode se: reproduktivne karakteristike krmače, utrošak hrane za krmaču i prasad, prirast koji prasad ostvaruju, kao i investicije u objekte i prateću opremu. Prilikom utvrđivanja optimalnog vremena za odbijanje prasadi neophodno je i poznavanje dinamike razvoja enzimskog sistema prasadi koji

uslovljava mogućnost korišćenja ostalih hranljivih materija mimo majčinog mleka. Tako se kompletan proteolitički sistem razvija od 14. dana i dostiže maksimum sa 28-35 dana. Lipolitički sistem se formira tokom treće i četvrte nedelje kada dostiže maksimum. Amilolitički sistem konstantno raste od 14. dana. Načelno govoreći, može se reći da se enzimski sistem prasadi formira tokom treće i četvrte nedelje života što određuje vreme za početak prihranjivanja kao i sam izbor hraniva (Ševković i sar., 1983). Do sličnih zaključaka su došli i drugi autori (Kelly i sar., 1991; Edmond i sar., 1991) koji navode da je ishrana prestarterom bez značaja ako se prasadi odbiju ranije, između 10 i 12 dana starosti.



**Šema 1.** Ilustracija razvoja digestivnih enzima kod prasadi (izvor: Manners i sar., 1976; Veum i Odle, 2001 i Lindemann i sar., 1986).

Uzimajući u obzir sve navedene faktore kao i dinamiku razvoja aktivnosti enzima i mikroflore digestivnog trakta u uslovima odgoja na farmama u našoj zemlji, Sinovec i sar. (1994b) navode, kao optimalno vreme zalučivanja prasadi uzrast između 33 i 37 dana, a u pojedinim slučajevima, čak i 42 dana. Navedene preporuke su u skladu sa praksom odbijanja prasadi koja se primenjuje u Švedskoj, koja je prva među zemljama Evropske unije donela odluku o zabrani upotrebe antibiotika kao dodataka hrani za životinje (Brooks i Tsourgiannis, 2003).



U Evropskoj uniji je trenutno na snazi Direktiva (Council Directive 2008/120/EC) doneta 18. decembra 2008. godine kojom se utvrđuju minimalni standardi koji moraju biti zadovoljeni prilikom gajenja svinja. Navedenom Direktivom se zabranjuje odbijanje prasadi od krmača u uzrastu manjem od 28 dana, osim ukoliko dobrobit ili zdravlje krmače ili praseta nisu ugroženi. Prasad mogu biti odbijena i do sedam dana ranije samo ukoliko se smeste u specijalizovane objekte koji su ispražnjeni i temeljno očišćeni i dezinfikovani pre uvođenja nove grupe. Navedeni objekti moraju biti odvojeni od objekta gde se čuvaju krmače, u cilju prevencije prenošenja bolesti na prasad, navodi se u Aneksu navedene Direktive (Pigs Directive, supra n.10. Annex I, Chapter II, para. C3).

### **2.1.3. Ishrana odbijene prasadi**

Nakon potpunog odbijanja prasadi od krmače i upotrebe predstartera dalje faze u ishrani prasadi podrazumevaju upotrebu potpunih smeša za ishranu do telesne mase od 15 kg. Navedene smeše se nazivaju starteri i obično sadrže između 20-22% proteina. Kada prasad dostignu telesnu masu od 15 kg prelazi se na smeše sa 18% proteina - smeše za porast (grover), kojima se prasad hrane dok ne postignu telesnu masu od 25 kg. Navedenim načinom ishrane, prasad koja su odbijena sa 35 dana starosti već sa 8 nedelja života postižu telesnu masu od 18-20 kg. U tabeli 1. su prikazani uslovi kvaliteta potpunih krmnih smeša za ishranu svinja, propisani trenutno važećim pravilnikom u Srbiji.

Tokach M.D i sar. (2003) predložili su višefazni koncept ishrane rano odbijene prasadi. Prva faza ishrane podrazumeva posebno formulisan obrok za prasad od odbijanja do 5 kg telesne mase i u formi je peleta. Glavni ciljevi pri formulisanju obroka u ovoj fazi, po redosledu važnosti su: 1) pravilan odabir hraniva kojima će se stimulisati unos hrane (riblje brašno, krvno brašno, sprejno osušena animalna plazma, sojina sačma i mast) 2) obezbeđivanje znatne količine visoko-dostupnih amino kiselina u pravilnom odnosu (koncept idealnog proteina) i 3) pripremanje enzimskog sistema prasadi da koriste obroke sa nižom cenom koštanja u narednim fazama. Druga faza, tzv. tranziciona, (od 5-7 kg) može biti u formi peleta ili brašna, s tim da je ista forma predložena i za naredne faze ishrane. Tranziciona faza predstavlja prirodni produžetak

prve faze i u njoj obrok sadrži većinu istih hraniva kao i u prvoj fazi. Međutim, unos hrane se naglo povećava kod prasadi sa dobrim zdravstvenim statusom.

**Tabela 1.** Uslovi kvaliteta potpunih krmnih smeša za ishranu svinja (izvor: Pravilnik o kvalitetu hrane za životinje, Službeni glasnik RS, broj 41/09, član 49).

<b>Hemijski sastav</b>	<b>Potpuna smeša za prihranjivanje prasadi</b>	<b>Potpuna smeša za prasid I do 15 kg</b>	<b>Potpuna smeša za prasid II (15- 25 kg)</b>
<b>Proteini, %, najmanje</b>	22	20	18
<b>Mast, %, najmanje</b>	7	5	Ne utvrđuje se
<b>Vlaga, %, najviše</b>	12	12	13.5
<b>Celuloza, %, najviše</b>	4	5	6
<b>Pepeo, %, najmanje</b>	8	8	8
<b>Kalcijum, %</b>	0,8-1,0	0,8-1,0	0,7-0,9
<b>Fosfor, %, najmanje</b>	0,65	0,60	0,60
<b>Natrijum, %</b>	0,15-0,25	0,15-0,25	0,15-0,25
<b>Cink, mg/kg, najmanje</b>	100	100	100
<b>Bakar, mg/kg, najmanje</b>	20	20	20
<b>Gvožđe, mg/kg, najmanje</b>	120	120	120
<b>Mangan, mg/kg, najmanje</b>	30	30	30
<b>Jod, mg/kg, najmanje</b>	0,50	0,50	0,50
<b>Selen, mg/kg, najmanje</b>	0,10	0,10	0,10
<b>Vitamin A, IJ/kg, najmanje</b>	15000	15000	15000
<b>Vitamin D3, IJ/kg, najmanje</b>	1500	1500	1500
<b>Vitamin E, IJ/kg, najmanje</b>	40	40	40
<b>Vitamin B<sub>12</sub>, IJ/kg, najmanje</b>	0,02	0,02	0,02
<b>Metabolička energija, računski, MJ/Kg, najmanje</b>	13,50	13,00	13,00
<b>Lizin, %, najmanje</b>	1,30	1,20	1,00
<b>Metionin+cistin, %, najmanje</b>	0,75	0,70	0,60

Primarni ciljevi prilikom formulisanja tranzicione ishrane su obezbeđivanje znatne količine visoko-dostupnih amino kiselina u odgovarajućem odnosu, kao i priprema prasadi da koriste jeftinije obroke u naknadnoj fazi. Izbor hraniva kojima se stimuliše unos hrane je važan, ali sada kao sekundarni cilj. Glavna razlika u odnosu na prvu fazu ishrane je i u sadržaju sprejno osušene animalne plazme (2 do 3 % u odnosu na prvobitnih 5 do 7 %), koja se dodaje u obrok prvenstveno da bi se povećao unos hrane. U trećoj fazi ishrane (od 7-11 kg), stimulisanje unosa hrane je manje važno jer su prasadi do telesne mase od 11 kg već unela 3 do 5 kg hrane. Glavni problem prilikom formulisanja ovakvog obroka je visok nivo amino kiselina potrebnih za maksimalnu sintezu proteina. Poslednja faza ishrane (od 11-25 kg) odlučene prasadi strateški je cilj svih prethodnih faza i podrazumeva kombinaciju različitih izvora proteina i ugljenih hidrata (uglavnom žitarice i sojina sačma) u cilju efikasne pripreme prasadi da koriste jednostavne i jeftinije obroke. Međutim, iako je obrok formulisan za ishranu prasadi u poslednjoj fazi najjeftiniji, ukupan unos hrane tokom ovog perioda je najveći, što rezultira i najvećim troškovima (50% troškova hrane koja se utroši od momenta odbijanja).

Sastav obroka za odbijenu prasadi ima centralnu ulogu u patogenezi bolesti digestivnog trakta, jer se ishranom utiče na crevnu morfologiju, digestivnu i apsorptivnu sposobnost, pokretljivost creva, vreme pasáže kao i selektivan rast mikroflora i procese fermentacije (Hopwood i Hampson, 2003). Iako je već dugo poznato da se promenom ishrane pri odbijanju može uticati na razvoj i pojavu crevnih oboljenja (Hampson, 1987) pravilan odabir najprihvatljivijih strategija, postupaka i rešenja i dalje predstavlja veliki izazov za nutricioniste širom sveta.

Uobičajena praksa u odgoju prasadi je ograničavanje unosa hrane tokom ranog perioda posle odbijanja kako bi se smanjila učestalost proliva kod prasadi. Postoje podaci da do digestivnih poremećaja češće dolazi ukoliko se odbijena prasadi hrane po volji, nego kada je ishrana ograničena (Stevens, 1963; Thomlinson, 1969; Arambavela i sar., 1975). Danielsen i sar. (1975) preporučuju da se unos hrane ograniči za 50% (u odnosu na unos pri *ad libitum* ishrani) tokom prve 2 nedelje posle odbijanja u cilju smanjenja učestalosti pojave proliva, dok Pastorelli i sar. (2012) ističu da je za navedene efekte, osim ograničenog unosa hrane, neophodno osigurati i dobre zoohigijenske uslove. Palmer i Hulland (1965) su, takođe, utvrdili da se broj bakterija hemolitičke *E.*

*coli* u fecesu ranoodlučene prasadi može smanjiti ograničenim unosom hrane. Dve metode se najčešće koriste u ograničavanju unosa hrane kod prasadi u komercijalnim uslovima: ograničavanje vremena pristupa hranilicama ili ograničavanje količine hrane koja se nudi dnevno. Ove metode se koriste jer su jednostavne za implementaciju i ne zahtevaju poseban rad. U ogledu Ball i Aherne (1982) dokazana je prednost ograničavanja u količini hrane u odnosu na vremensko ograničavanje, a kao razlog se navodi neredovan i veći unos hrane, kao i sklonost prasadi da unesu veću količinu hrane kada se hranilica prvi put napuni. Veliki pojedinačni obroci obično rezultiraju privremenim zastojeom u gastrointestinalnom traktu, praćeno akumulacijom tečnosti i ubrzanom peristaltičkom aktivnošću što dovodi do smanjene svarljivosti i povećane pasaže crevnog sadržaja (Porter i Rolls, 1971; Ruckebusch i Bueno, 1976).

Prasad nisu u mogućnosti da u potpunosti svare čvrstu hranu u periodu neposredno nakon odbijanja što dovodi do prelaska nesvarene hrane u debela creva gde biva podvrgnuta procesima fermentacije. Prisustvo nesvarene hrane povećava osmolaritet crevnog sadržaja (Etheridge i sar., 1984) i doprinosi prilivu vode u lumen creva, predisponirajući nastanak dijareje (Etheridge i sar., 1984). Korišćenje hrane sa većom količinom neskrobnih polisaharida (NSP) ili materija sa jakim kapacitetom za vezivanje vode (gume i pektini) potencira opisani problem. Hopwood i Hampson (2003) su dokazali da se upotrebom obroka na bazi kuvanog pirinča navedeni problemi mogu rešiti, a kao razloge navode visoku svarljivost, nisku viskoznost i neznatnu količinu NSP u ovom hranivu. U suprotnosti sa iznetim, pojedini autori navode da veća količina dijetetskih vlakana u ishrani takođe može pružiti određeni stepen zaštite od nastanka dijareje (Bertschinger i Eggenberger, 1978; Bolduan i sar., 1988; Aumaitre i sar., 1995).

Visok nivo proteina u ishrani predisponira nastanak kolibaciloze posle odbijanja, usled njihovog uticaja na povećanje pH vrednosti u želucu što omogućava *E. Coli* da kolonizuje tanka creva (Prohaszka i Baron, 1980). Izvor proteina koji se koriste u formulaciji obroka takođe se dovodi u vezi sa nastankom crevnih poremećaja. Obroci koji sadrže veći broj hraniva, kao izvora proteina, mogu uticati na povećanu pojavu dijareje u poređenju sa obrocima sa manjim brojem upotrebljenih hraniva (Okai i sar., 1976; Ball i Aherne, 1982; Etheridge i sar., 1984). Višak proteina u crevima se razlaže putem mikroorganizama i može doprineti nastanku proteolitičke dijareje, nevezano od

prisustva *E. coli*, proizvodnjom štetnih jedinjenja koji iritiraju sluznicu i indukuju nastanak dijareje (Nollet i sar., 1999).

Bez obzira na fazni sistem koji se primenjuje, pravilnim izborom hraniva mora se formulirati obrok koji će obezbediti prihvatljiv ukus za prasad kako bi se donekle ublažio zastoj u rastu koji karakteriše period neposredno nakon odbijanja. Obrok mora biti prilagođen dinamici razvoja enzimskog sistema, razvoju sluznice gastrointestinalnog trakta, kao i uspostavljenoj mikrobioti kako bi se ostvarili željeni proizvodni rezultati.

Podaci izneti u NRC (1988) koji se odnose na očekivani dnevni unos hrane za prasad telesne mase od 10-20 kg iznose 950 g, dok očekivani dnevni prirast i konverzija hrane iznose 450 g i 2,11, navedenim redosledom. Potrebe prasadi u suvoj materiji (Sinovec i Ševković, 2008) u uzrastu od 35 dana iznose 0,2-0,4 kg dnevno a za uzrast od 42, 56 i 80 dana iznose 0,4-0,6 kg, 0,6-0,8 kg i 0,8-1,0 kg, retrospektivno.

#### **2.1.4. Negativni aspekti odbijanja prasadi**

Praksa savremene industrijske proizvodnje svinja je usvojila rano i naglo odbijanje prasadi. U momentu odbijanja, prase je pod uticajem složenih društvenih promena, uključujući odvajanje od majke, odvajanje od prasadi iz legla i kontakt sa novim jedinkama, kao i drastičnim hranidbenim promenama koje podrazumevaju prelazak sa mlečne hrane u tečnom obliku na suhu hranu kompleksnog sastava (Fraser i sar., 1998). Kao rezultat navedenih promena, odbijena prasad prestaju da jedu ili unose nedovoljnu količinu hrane (Le Dividich i Herpin, 1994) pri čemu dolazi do izraženih promena u crevnoj strukturi uz promene funkcionalne sposobnosti (Hampson, 1986; Pluske i sar., 1997) što za posledicu ima zastoj u rastu (McCracken i sar., 1995, 1999). Anoreksija, uporedo sa iscrpljivanjem crevnog supstrata koji je dostupan za mikrobiološku fermentaciju, dovodi i do promena u crevnoj mikrobioti, koja tokom prve nedelje posle odbijanja, postaje izuzetno nestabilna, (Vallgren i Melin, 2001), a prase podložno razvoju brojnih crevnih oboljenja koji dovode do velikih gubitaka u odgoju. U tabeli 2. Lallès i sar. (2004) sumirali su najvažnije promene koje se dešavaju prilikom odbijanja prasadi.

**Tabela 2.** Odbijanje mlade prasadi, indukovani crevni poremećaji i glavni faktori rizika (izvor: Lallès i sar., 2004).

---

**Odbijanje = nezrelost + stres****- Nezrelost životinja za:**

- ponašanje (uopšteno i ishranu)
- funkciju creva (sekrecija, motilitet, probava, apsorpcija, odbrana, itd)
- imunološki sistem (crevni i uopšte)

**- Psihološki stres:**

- naglo odvajanje od majke i mešanje sa prasadma iz drugih legala
- novo okruženje (boks, zgrada, farma, itd.)

**- Hranidbeni stres:**

- povlačenje mleka (tečno, veoma ukusno i svarljivo, itd)
- pristup suvoj hrani (čvrsta, manje prihvatljiva i svarljiva)
- odvojeni pristup vodi za piće

**Indukovani crevni poremećaji****- Promene u strukturi i funkciji creva:**

- Morfologija - atrofija crevnih resica praćena hiperplazijom kripti
- Smanjena aktivnost crevnih enzima za varenje, poremećaj apsorpcije i sekrecije

**- Udruženi crevni patogeni**

- bakterije (*E. coli*, enterotoksigene ili enteropatogene) i virusi: rotavirus

**Glavni faktori rizika****- Faktori ishrane**

- nedovoljan ili neredovan unos hrane uz prisustvo antinutritivnih faktora (antitripsinski faktor, lektini, antigeni, itd.)
- kompleksan obrok niske svarljivosti
- visok nivo proteina (+ visok puferski kapacitet)

**-Faktori odgajanja**

- velika veličina legla / mala težina pri odbijanju
  - visoka gustina naseljenosti prasadi posle odbijanja uz nizak nivo higijene
  - neprilagođeni uslovi sredine (niska temperatura, loš kvalitet vazduha, itd.)
-

### 2.1.5. Uticaj procesa odbijanja prasadi na crevnu mikrobiotu

Uspostavljanje stabilne mikrobiote u crevima prasadi je složen proces koji počinje kolonizacijom creva novorođene prasadi različitim bakterijskim vrstama, pri čemu pojedine vrste postaju dominantne. Opisani proces se nastavlja uporedo sa rastom prasadi rezultujući konačno formiranjem karakteristične i dinamične bakterijske zajednice koja odlikuje svaku individuu (Rolfe i sar., 1996; Zoetendal i sar., 2001).

Značaj uspostavljanja stabilne mikrobne zajednice u crevima prasadi ogleda se u brojnim korisnim efektima i simbiotskom odnosu koji se ostvaruje sa domaćinom. Mikrobiota formira glavnu barijeru protiv patogena i ima važan uticaj na morfologiju creva (Coates i sar., 1963), razvoj imuniteta (Pabst i sar., 1988), kao i varenje prisutnih hranljivih materija (Wostmann, 1996). Prisutna mikrobiota sprečava kolonizaciju dolazećih bakterija procesom nazvanim kolonizaciona rezistencija što predstavlja prvu liniju odbrane od invazije egzogenih, potencijalno patogenih mikroorganizama ili autohtonih oportunističkih (Van der Waaij i sar., 1989; Rolfe i sar., 1996; Hooper i sar., 1998). Navedeni proces podrazumeva nekoliko različitih, složenih interaktivnih mehanizama bakterija i domaćina. Faktori od strane domaćina, uključeni u kolonizacionu rezistenciju su raznovrsni i podrazumevaju peristaltičke pokrete, sekreciju različitih enzima za varenje i elektrolita, sekreciju sluzi, deskvamaciju epitelnih ćelija, kao i prisustvo limfnog tkiva i lučenje sekretornih IgA (Stewart i sar., 1993). Sa druge strane, autohtona mikrobiota sprečava bakterijsku kolonizaciju putem borbe/kompeticije za receptore na epitelnim ćelijama (Blomberg i sar., 1993; Bernet i sar., 1994), ali i kompeticije za hranljive materije (Stewart i sar., 1999), kao i proizvodnjom antimikrobnih jedinjenja kao što su bakteriocini (Brook, 1999). Opisanim faktorima se stvara restriktivno okruženje koje je nepovoljno za rast mnogih crevnih patogena (Fons i sar., 2000; Lievin i sar., 2000). Vezivanje bakterija za sluznicu digestivnog trakta je ključna tačka koja definiše sastav autohtone mikrobiote, a samim tim i različite korisne funkcije posredovane bakterijama. Dve glavne komponente od suštinske važnosti u navedenom procesu su glikokonjugati na enterocitima creva i adezini na bakterijama.

Da bi kolonizovala gastrointestinalni trakt, bakterijska populacija mora da se umnožava stepenom koji je jednak ili veći od stepena njihovog ispiranja ili eliminacije u

crevnim nišama, ili da se veže za zid creva kako bi se održala permanentna kolonizacija (Mackie i sar., 1999). Kao posledica navedenih faktora nastaju razlike u mikrobioti prasadi, kako kvantitativne tako i kvalitativne, duž celog gastrointestinalnog trakta (Berg, 1996; Simpson i sar., 1999), sa najvećim brojem bakterija ( $10^{11}$ - $10^{12}$  CFU/g crevnog sadržaja) u cekumu i kolonu gde je opisano više od 500 različitih bakterijskih vrsta (Ewing i Cole, 1994; Van Kessel i sar., 2004). Uz navedene razlike opisana je i horizontalna stratifikacija u lumenu, sluzi i prostorima kripi, sa karakterističnom populacijom unutar svakog odeljka (Lee, 1984; Simpson i sar., 1999).

$10^3$ - $10^5$ CFU/g digesta	$10^8$ CFU/g digesta	$10^{11}$ - $10^{12}$ CFU/g digesta
<b>STOMACH &amp; DUODENUM</b>	<b>ILEUM</b>	<b>COLON</b>
<i>Lactobacillus</i> <i>Streptococcus</i> <i>Enterobacteria</i> <i>Clostridium</i> <i>Eubacterium</i> <i>Bifidobacterium</i>	<i>Lactobacillus</i> <i>Streptococcus</i> <i>Clostridium</i> <i>Enterobacteria</i> <i>Bacillus</i> <i>Bacteroides</i>	<i>Bacteroides sp (30%)</i> <i>Eubacterium</i> <i>Bifidobacterium</i> <i>Ruminococcus</i> <i>Clostridium</i>

Šema 2. Bakterijske vrste koje žive u gastrointestinalnom traktu prasadi (izvor: Bederska i Piesyka, 2011).

U trenutku samog rođenja, u digestivnom traktu praseta nema mikroorganizama, ali već nakon pucanja fetalne membrane, prase biva izloženo njihovom uticaju. Za kratko vreme, putem kontakta sa vaginom, fecesom i kožom majke, ali i okruženjem, počinje gastrointestinalna kolonizacija creva praseta (Conway, 1997). Katouli i sar. (1997) dokazali su da postoji velika sličnost između mikrobiote prasadi i njihovih majki u ranijim fazama života, potvrđujući time da su krmače početni izvor za uspostavljanje crevne mikrobiote prasadi. Konkretno, majčin izmet može biti ključni faktor u opisanoj kolonizaciji creva i budućem razvoju mikrobiote, jer je potvrđeno da prasad mogu konzumirati i do 85 g izmeta dnevno (Sansom i Gleed, 1981). Međutim, u periodu od



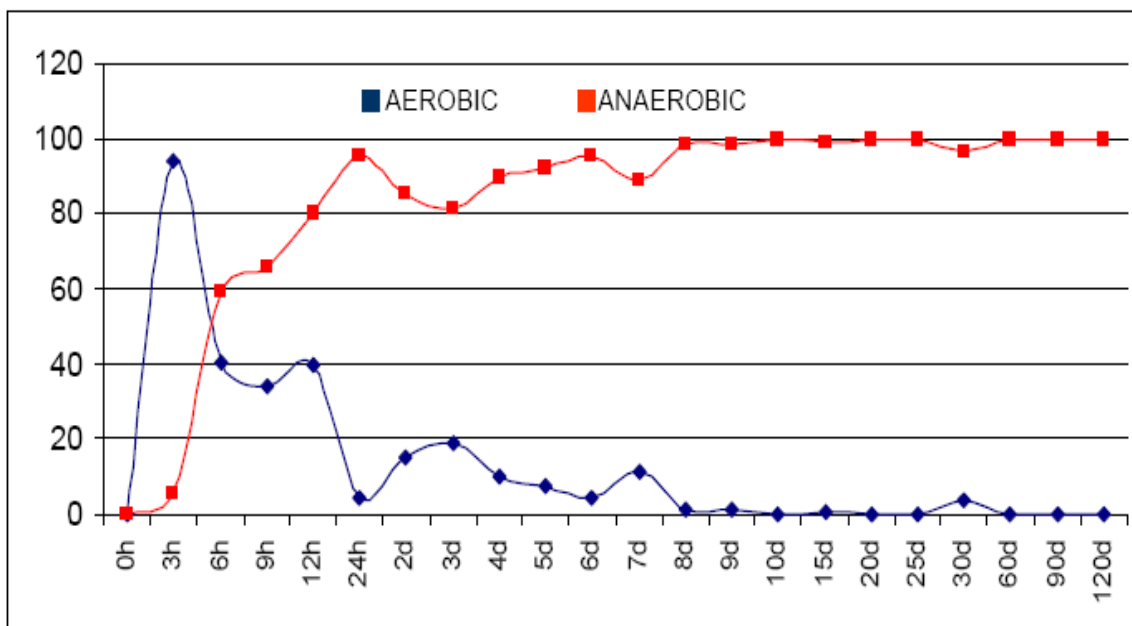
svega nekoliko dana, sastav mikrobiote se menja i postaje različit u odnosu na krmaču, a time i karakterističan za svaku jedinku (Katouli i sar., 1997).

Prve bakterije koje se detektuju u digestivnom traktu prasadi su veoma raznovrsne i odražavaju mikrobnu populaciju majke i okruženja (Ewing i Cole, 1994). Naredne dane karakteriše pojednostavljen mikrobiotski profil, koji vremenom postaje sve složeniji, povećavajući svoju različitost kako životinja raste (Conwey, 1994; Favier i sar., 2002; Inoue i sar., 2005). U radu Swords i sar. (1993) ispitivana je evolucija procesa razvoja mikrobiote prasadi tokom prva četiri meseca života i zaključeno je da uspostavljanje mikrobiote tipične za odrasle predstavlja veliki i složen proces sa tri različite, jasno izražene faze.

Prva faza odgovara prvoj nedelji života, a aerobi i fakultativni anaerobi poreklom od krmače i/ili okruženja već tri sata nakon rođenja postaju dominantne bakterijske grupe, čineći 80% ukupne mikroflore. Proces kolonizacije creva dalje teče izuzetno brzo i dvanaest sati nakon rođenja, ukupan broj bakterija u distalnom kolonu dostiže  $10^9$  CFU/g sadržaja kolona (Swords i sar., 1993; Jensen i sar., 1998). Prvi kolonizatori menjaju sredinu gastrointestinalnog trakta (potrošnjom molekularnog kiseonika i smanjenjem redoks potencijala), čineći ga povoljnijim za sledeću kolonizaciju anaerobima. U navedenom procesu, pored uticaja sredine u crevima, opisana je značajna uloga imunoglobulina poreklom iz kolostruma (Brandtzaeg, 2002). Aerotolerantne bakterije postepeno bivaju zamenjene striktnim anaerobima tako da se 48 h nakon rođenja mikrobiota prasadi sastoji od 90% anaerobnih bakterija (Swords i sar., 1993). Na kraju prve nedelje života laktobacili i streptokoke postaju dominantne bakterije i održavaju se dalje tokom celog perioda sisanja sa prosečnim brojem od  $10^7$ - $10^9$  CFU/g crevnog sadržaja (Swords i sar., 1993; Ewing i Cole, 1994).

Druga faza u razvoju mikrobiote prasadi se odnosi na period tokom sledećih nedelja života do trenutka prestanka sisanja. Raznovrsnost anaerobnih bakterija se povećava tokom navedenog perioda (Inoue i sar., 2005) uz smanjenje broja aerobnih i povećanje broja anaerobnih bakterija. Slično kao i tokom prve faze, laktobacili i streptokoke predstavljaju dominantne bakterije i dobro su prilagođene korišćenju substrata iz mlečne hrane. U navedenom periodu, *Clostridium*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Propionibacterium* i *Streptococcus spp.*

su uobičajeni članovi mikrobne populacije creva (Radecki i Jokohama, 1991; Swords i sar., 1993).



**Šema 3.** Prisustvo aerobnih i anaerobnih bakterija u fecesu praseta od rođenja do 120. dana života (izvor: Swords i sar., 1993).

Treća faza procesa razvoja stabilne mikrobiote prasadi predstavlja period od trenutka odbijanja do konačne adaptacije na ishranu suvim obrokom. Većina autora navodi uvođenje čvrste hrane kompleksnog hemijskog sastva sa ugljenim hidratima, kao glavnim izvorom energije umesto masti, kao ključni faktor u promeni mikrobiote (Mathew i sar, 1996; Jensen, 1998; Konstantinov i sar., 2004a). Posle odbijanja dolazi do smanjenja broja ukupnih bakterija (Franklin i sar., 2002), sa značajnim promenama u njihovom međusobnom odnosu. Tokom ove faze dolazi do potiskivanja Gram-pozitivnih anaeroba od strane pripadnika Gram-negativnih bakterija prevashodno roda *Bacteroides* koje predstavljaju dominantnu bakterijsku populaciju kod odraslih svinja (Swords i sar., 1993). Izneti podaci su u skladu sa podacima koje je izneo Jensen (1998), utvrdivši da neposredno posle odbijanja glavni deo bakterija iz debelog creva čine Gram-negativne bakterije. Utvrđeno je i smanjenje populacije laktobacila paralelno sa povećanjem enterobakterija kao posledica uobičajenog načina odbijanja (Mathew i sar., 1993, 1996; Jensen i sar., 1998; Frenklin i sar., 2002). Činjenica je da je naglo

odbijanje povezano sa višestrukim padom (približno 100 puta) broja laktobacila u crevima, kao i višestrukim povećanjem (približno 50 puta) broja *Escherichie coli* (Huis in't Veld i Havennar, 1993). Najvažnija posledica navedenih promena mikrobiote u periodu neposredno nakon odbijanja je da prasadi postaju podložnija dominaciji patogenih bakterija koje predstavljaju potencijalne izazivače bolesti (Hoopvud i Hampson, 2003). Jensen (1998) je, ispitujući uticaj procesa odbijanja prasadi na mikrobnu populaciju digestivnog trakta, zaključio da je mikrobiota prasadi nestabilna tokom prve tri nedelje nakon odbijanja da bi se nakon tog perioda fermentativni kapacitet debelih creva u potpunosti razvio. Da li će promene mikroflora pri odbijanju rezultirati pojavom bolesti zavisi od prirode, broja i aktivnosti prisutnih bakterija, a posebno od postojanja niza faktora vezanih za ishranu (Madec i sar., 1998).

#### **2.1.6. Uticaj procesa odbijanja prasadi na morfološke karakteristike digestivnog trakta**

Epitel sluzokože creva predstavlja delikatnu vezu između spoljašnje i unutrašnje sredine, a njegova osnovna funkcija se odnosi na varenje i apsorpciju hranljivih materija. U isto vreme, predstavlja i fizičku i imunološku barijeru protiv štetnih materija, uključujući bakterije, viruse, parazite i alergene (Kato i Oven, 1994). Kapacitet creva prasadi da u potpunosti ostvari opisane funkcije nije konačan već se menja i prilagođava brojnim faktorima koji utiču na njegov razvoj, uključujući ishranu, mikrobnu kolonizaciju, stres, odgoj i okruženje (Henning, 1987; Lebenthal, 1989; Mosenthin R., 1998).

Sluzokoža creva je u potpunosti prilagođena funkciji koju obavlja. U tankom crevu, kao glavnom mestu razlaganja i apsorpcije hranljivih sastojaka, apsorpciona površina je povećana formiranjem kružnih nabora (*plicae circulares*), crevnih resica i mikroresica na površini enterocita. Na mikroresicama se nalazi glikokaliks (modifikacija površine ćelije) čije komponente pomažu u apsorpciji kao i vezivanju i razlaganju hranljivih sastojaka. Elektronskom mikroskopijom uočava se da aktin (konstituent mikroresice) i glikokaliks vezuju velike količine boje, pa se čitava struktura vidi kao četkasti pokrov na površini epitela (Mosenthin, 1998). Prema Buddie i Bolton

(1992), tanko crevo praseta u uzrastu od 10 dana ima ukupnu resorptivnu površinu od 114 m<sup>2</sup>.

Epitel formira i brojne uvrata sve do *lamina muscularis mucosae* i obrazuje Liberkinijeve (Liberkühn) kripte. Epitel kriпти grade matične, apsorpcione, peharaste, endokrine, M i Panetove ćelije. Matične ćelije se nalaze pri dnu kriпти i teško ih je identifikovati. Od njih nastaju intermedijerne ćelije sa osobinama i apsorpcionih i peharastih ćelija. Navedene ćelije zadržavaju sposobnost deobe tako da će se od njih razviti enterociti i peharaste ćelije. Kako se odvijaju procesi deobe i diferencijacije, novonastale ćelije se pomeraju ka gornjem delu kriпти i na kraju obnavljaju odbačene ćelije crevnih resica. Obnova oba tipa ćelija odvija se tokom 5-6 dana (Naftalin, 1995; Cécile-Crosnier, 2006).

Sluznica u debelom crevu, zajedno sa delom podsluznice, formira nabore, ali bez crevnih resica. U epitelu se nalazi veći broj peharastih ćelija, koje direktan kontakt sa fecesom mehanički podstiče na lučenje sluzi, koja ima zaštitnu ulogu. Liberkinijeve kripte su prisutne celom dužinom, sve do završnih delova rektuma, ali se sastoje isključivo od mukoznih (peharastih) ćelija koje luče sluz i obilje bikarbonata, neutrališući niže masne kiseline koje nastaju mikrobnom fermentacijom. Način obnavljanja epitela (matične i nediferencirane ćelije) je veoma sličan procesu koji se odigrava u tankom crevu (Stevanović, 2004; Geibel, 2005; Pantić, 1990).

Interakcijom ishrane, genetike, endogenih regulatornih mehanizama i životne sredine usmerava se funkcionalni razvoj organskih sistema, uključujući i razvoj gastrointestinalnog trakta čime se značajno utiče i na kasniju produktivnost prasadi (Adeola i King, 2006). Rast životinje zavisi velikim delom od sposobnosti njenog gastrointestinalnog trakta za varenje i asimilaciju makromolekula unetih u organizam, a svako smanjenje ovih aktivnosti za posledicu ima mogućnost usporavanja rasta. Postnatalni razvoj gastrointestinalnog trakta, prvo pojavljivanje i razvoj crevnih digestivnih enzima, kao i kapacitet creva da apsorbuje hranljive materije su među najvažnijim faktorima koji omogućavaju životinjama da iskoriste makromolekule koje unesu u organizam (King i sar., 2000). Hidrolaze i molekuli prenosioci hranljivih materija, smešteni na četkastom pokrovu enterocita, imaju značajnu ulogu u završnoj fazi varenja i asimilaciji hranljivih materija, što dominantno utiče na proizvodne rezultate prasadi (Adeola i King, 2006).

Kao posledica drastičnih promena u hranidbenim navikama prasadi prilikom odbijanja, ali i brojnim drugim stresorima koji prate navedeni proces, nastupajući period u trajanju od 7-14 dana karakteriše nizak unos hrane sa posledičim zastojem u rastu (Smith i Lucas, 1956; Liebbrandt i Ewan, 1972; Lecce i sar., 1979; Lalles i sar., 2007; Pluske i sar., 1997). Prema podacima do kojih su došli Bruininx i sar. (2001) približno 50% prasadi konzumira ponuđeni obrok tokom prvih 24 h nakon odbijanja, dok je potrebno čak 50 h da bi to učinilo 95% od ukupno ispitivanih prasadi. Lalles i sar. (2007) navode da prasadi uspevaju da zadovolje potrebe u energiji za održavanje života tek nakon 3 dana posle odbijanja, dok je za potpun unos energije iz perioda pre odbijanja potrebno 8-14 dana.

Uspešno prilagođavanje opisanim promenama zahteva i duboko mikrobiološko, morfološko i enzimsko prilagođavanje gastrointestinalnog trakta. Iz tog razloga, proces odbijanja se odlikuje prolaznim skraćenjem dužine crevnih resica, povećanjem dubine kripti, kao i ukupnim smanjenjem sposobnosti creva za varenje i apsorpciju hranljivih materija, što predstavlja predisponirajući faktor za nastanak malapsorpcije i dijareje (Marion i sar., 2002).

Uprkos značajnom broju istraživanja koja su sprovedena u ovoj oblasti, mnoga pitanja i dalje ostaju otvorena u smislu precizne etiologije navedenih promena u crevnoj strukturi i funkciji posle odbijanja. Pluske i sar. (1997) klasifikovali su glavne faktore koji doprinose ovim promenama i podelili ih na: 1) enteropatogene bakterije i njihove interakcije u tankom crevu, 2) smanjenu mogućnost adaptacije na stresore pri odbijanju, 3) prestanak konzumacije krmačinog mleka pri odbijanju, 4) promene u načinu ishrane u vezi sa odbijanjem i 5) citokine kao regulatore crevnog rasta.

Iako se brojni faktori mogu razmatrati kao uzrok navedenih promena, sve je više dokaza da je količina konzumirane hrane jedan od navažnijih (van Beers-Schreurs i sar., 1998; McCracken i sar., 1995; Pluske i sar., 1996). Nedostatak hranljivih materija u lumenu creva izazvan gladovanjem (McNeill i Hamilton, 1971; Altman, 1972) ili intravenskom ishranom (Goodlad i sar., 1992) utiče na dužinu trajanja ćelijskog ciklusa u Lieberkinijevim kriptama i na taj način dovodi do atrofije crevnih resica i smanjenja proizvodnje ćelija kripti (Al-Dewachi i sar., 1975). Iz tog razloga luminalna ishrana ima važnu ulogu u očuvanju integriteta strukture i funkcije creva nakon odbijanja. Prvi istraživači koji su uspeli da prepoznaju malu konzumaciju hrane u periodu neposredno

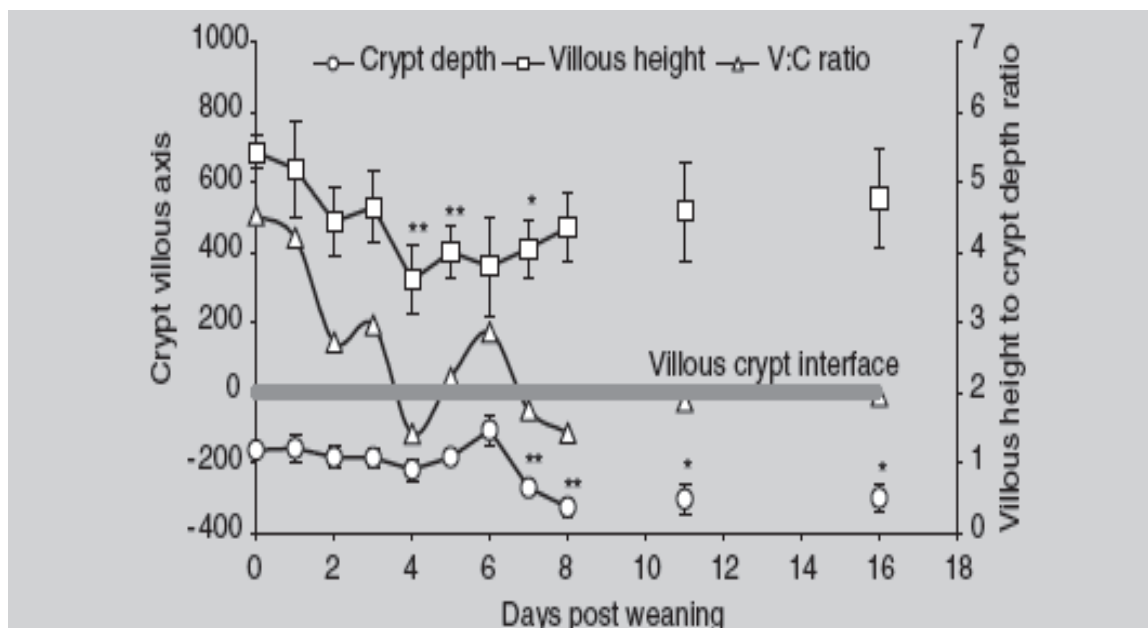
posle odbijanja kao odgovornu za promene u strukturi i funkciji creva kod prasadi bili su Kelly i sar. (1984) i Mc-Cracken i Keli (1984).

Među najvažnije faktore poreklom iz hrane, koji utiču na promene u dužini resica nakon odbijanja navode se prestanak konzumacije mleka krmače, a samim tim u mleku prisutnih faktora rasta (Kelly D, 1994) i glutamina, kao glavnog supstrata za razvoj creva (Wu i sar., 1996), ali i prolazna preosetljivost na antigene komponente prisutne u hrani (Dréau i sar., 1994; Li i sar., 1990). Julia Marion i sar. (2002) navode da je niska energetska vrednost obroka glavni faktor za smanjenje dužine resica, kao i za brzinu njihovog oporavka. Iz tog razloga predlažu da prelaz od sisanja ka odbijanju bude ravnomerniji tako da se održi kontinuitet u snabdevanju hranom (obezbeđivanjem hrane u tečnom obliku) čime se mogu smanjiti promene crevne strukture posle odbijanja.

Beers-Schreurs i sar. (1995) dokazali su da smanjeni unos hrane ili energije, nezavisno od tipa ishrane, predstavlja glavni faktor koji izaziva atrofiju resica u periodu posle odbijanja. Pluske i sar. (1996) dokazali su da je kod prasadi koja su konzumirala kravlje mleko, u količini koja obezbeđuje 2,5 puta više energije od potreba za održavanje života, dužina resica pre i posle odbijanja bila slična. Navedeni rezultati predstavljaju ohrabrujući podatak da, ukoliko se uspešno održava adekvatan unos hrane posle odbijanja, tipična atrofija resica može biti izbegnuta.

M.A.M. Spreeuwenberg i sar. (2001) ukazuju na smanjenu mogućnost sluzokože creva da održi funkciju zaštitne barijere tokom prvih 4 dana posle odbijanja. Kao glavne uzroke, autori navode stres i gladovanje, odnosno smanjeni unos energije i osnovnih hranljivih materija. Kao posledica navedenih faktora dolazi do povećanja paracelularnog transporta (prolazak materija između enterocita kroz tesne veze) čime se olakšava prolaz alergena, bakterija i toksina u sistemsku cirkulaciju.

Miller i Slade (2003) šematskim putem su (Šema 4.) predstavili promene crevne strukture prasadi nakon odbijanja, objedinivši podatke do kojih su prethodno došli brojni autori (Hampson, 1986; Miller i sar., 1986; Kelly i sar., 1991; Pluske i sar., 1991; Makkink i sar., 1994; Pluske i sar., 1996; Jiang i sar., 2000).



Šema 4. Promene crevne strukture prasadi nakon odbijanja (izvor: Miller i Slade, 2003)

Analizom iznetih podataka uočava se smanjenje dužine resica počevši od 0. dana (dan odbijanja) koje je najizraženije 4. dana ( $p < 0,05$ ), kada je dužina resica smanjena za 50%. Dužina resica se postepeno „oporavlja” do 8. dana i nakon toga stabilizuje na vrednost od oko 70% izmerene početne vrednosti. Hampson (1986) iznosi da je navedena atrofija resica rezultat smanjenja broja enterocita, a ne rezultat kontrakcije resica.

Pluske i sar. (1997) navode da atrofiju crevnih resica posle odbijanja izaziva ili povećan stepen gubitka ćelija ili smanjenje stepena obnove ćelija. Ako je razlog skraćanja crevnih resica povećani gubitak ćelija, onda se opisani fenomen dovodi u vezu sa povećanom proizvodnjom ćelija kripti, a samim tim i sa povećanjem dubine kripti. Međutim, atrofija crevnih resica može nastati i zbog smanjenog obnavljanja ćelija kao rezultat smanjene deobe ćelija u kriptama (npr. tokom gladovanja).

Hampson (1986) je dokazao da je nakon odbijanja u uzrastu od 21 dana, u roku od 24 časa dužina crevnih resica smanjena na približno 75% od vrednosti pre zalučenja (694 u odnosu na 940  $\mu\text{m}$ ). Naknadno smanjenje dužine crevnih resica u tankom crevu je manje izraženo, ali dužina nastavlja da opada sve do petog dana po odbijanju, kada je vrednost dužine crevnih resica na većini mesta duž crevnog trakta na približno 50% od početne vrednosti utvrđene na odbijanju.

Hall i Byrn (1989) su kao razlog za atrofiju crevnih resica naveli usporenu proizvodnju novih ćelija u kriptama, a ne ubrzani gubitak zrelih enterocita sa površine resica, što je rezultat smanjenog unosa energije i/ili proteina.

Dubina kripti tokom perioda od prvih nekoliko dana nakon odbijanja varira neznatno sve do 6. dana, nakon čega se brzo i značajno povećava ( $P < 0,01$ ) u narednim danima, dostižući vrednosti koje su dvostruko veće u odnosu na početne (0. dan). Povećanje dubine kripti se inicira odbijanjem prasadi ali nije zabeležen uticaj uzrasta pri kom se prasadi odbijaju (14, 21, 28 ili 35 dana) na navedene promene (Miller i Slade, 2003). Povećanje dubine kripti u rasponu od 10 do 50% su uočili i Hampson (1986), Tang i sar. (1999) i Zijlstra i sar. (1996), ali u periodu tokom prvih 4-5 dana posle odbijanja, dok je u studiji koju su sproveli Spreuvenberg i sar. (2001) uočen samo marginalni efekat odbijanja na dubinu kripti. Međutim, dubina kripti koja je utvrđena kod prasadi odbijenih u higijenski kontrolisanom okruženju bila je manja u odnosu na vrednosti koje su utvrđene kod prasadi odbijene u konvencionalnom okruženju, ukazujući na zavisnost obnavljanja crevnog epitela od izlaganja patogenima (Marion i sar., 2002). Slične zaključke iznosi i Abrams (1977) koji je dokazao da su kraće resice i dublje kripte bile izazvane prisutnom bakterijskom florom u upoređenju sa životinjama slobodnim od bolesti (germ-free). Povećan stepen obnavljanja crevnog epitela, kao odgovor na invaziju patogena koji štete epitelnim ćelijama, predstavlja ključnu ulogu u odbrani creva domaćina (Gaskins, 1997).

Rastojanje od baze kripe do vrha crevne resice (Enterocyte Migration Distance – EMD) predstavlja put u migraciji enterocita tokom procesa njihovog sazrevanja. Izmerene vrednosti navedenog rastojanja se ne menjaju tokom vremena, uz jedinu zabeleženu značajnu promenu (smanjenje) samo na 5. danu nakon odbijanja. Mehanizmi koji regulišu strukturne promene u crevima prasadi u periodu posle odbijanja su usmereni ka ponovnom uspostavljanju EMD vrednosti koje odlikuju prasadi na sisi. Primarni način za ostvarenje datog procesa je produbljivanje kripti (Miller i Slade, 2003). Ubrzana migracija epitelnih ćelija duž EMD za posledicu ima veće učešće nezrelih ćelija na vrhu crevne resice što smanjuje aktivnosti enzima četkastog pokrova (Tang i sar., 1999; Cera i sar., 1988).

Uporedo sa smanjenjem dužine crevnih resica tokom perioda sisanja, uočava se i povećanje njihove širine (Cera i sar., 1988). Navedene promene se nastavljaju i nakon



odbijanja i konačno dovode do promene oblika resica u formu koja se u literaturi opisuje kao oblik lista (Cera i sar., 1988; Kelly i sar., 1992). Negativan efekat odbijanja na morfometrijske karakteristike crevnih resica u vidu atrofije resica u izvesnoj meri biva kompenzovan povećanjem dubine kripte (održavanje EMD) i povećanjem širine crevnih resica. Hampson (1986) je zaključio da navedeni proces predstavlja održavanje ravnoteže, između proizvodnje ćelija u kriptama i gubitka ćelija resica, koje je počelo petog dana posle odbijanja i traje najmanje pet nedelja. Navedene promene se manifestuju i izmenama u obliku resica, od dugačkih poput prstiju (opisanih u novorođenih i prasadi na sisi), do širokih resica nalik listu, krilima ili jeziku. Međutim, promene strukture crevnih resica nakon odbijanja rezultuju značajnim gubitkom njihove apikalne površine što je povezano sa smanjenjem zrelosti i funkcionalnosti enterocita (Miller i Slade, 2003) pošto su epitelne ćelije blizu vrha resice najzrelije a samim tim imaju najveći digestivni i apsorpcioni kapacitet (Aitken, 1984).

## 2.2. Pronutritivne materije u ishrani životinja

Da bi se postiglo bolje iskorišćavanje hrane, duža održivost, lakša manipulacija, a u krajnjem ishodu povećanje proizvodnje i poboljšanje kvaliteta namirnica animalnog porekla, pored osnovnih hraniva u smeše se dodaje veliki broj aditiva koji imaju različite namene. Dodaci (aditivi) su supstance koje, dodate obroku u malim količinama, potenciraju korisne i suprimiraju štetne efekte. Za potrošače termin „aditiv“ često izaziva nezdravu i nebezbednu impresiju, tako da je bilo neophodno uvođenje adekvatnijeg termina: pronutritivne materije se definišu kao mikroingredijenti koji, uneti oralnim putem u relativno malim količinama, poboljšavaju hranljivu vrednost obroka za životinje (Sinovec, 2000).

Dodaci hrani za životinje, u smislu trenutno važećeg Pravilnika o kvalitetu hrane za životinje, (službeni glasnik RS 41/09, član 74) su klasifikovani na sledeći način:

- 1) Vitamini i provitamini
- 2) Mikroelementi i minerali
- 3) Nепroteinska azotna jedinjenja
- 4) Aminokiseline

- 5) Stimulatori rasta
- 6) Kokcidiostatici
- 7) Ostali dozvoljeni dodaci

Pod stimulatorima rasta koji se koriste u proizvodnji smeša, u skladu sa važećim Pravilnikom (član 88), podrazumevaju se: probiotici, prebiotici, fitobiotici i drugi dopušteni stimulatori rasta, a prema uputstvu proizvođača mogu se dodavati i kokcidiostatici, živi mikroorganizmi (bakterije, kvasci i gljivice) i druge dozvoljene organske materije. Pravilnikom su definisane i nedozvoljene štetne materije (član 98), gde se navodi da hrana za životinje ne sme da sadrži hormone, sedative i tireostatike koji mogu imati stimulativni efekat. Smeše, takođe, ne smeju da sadrže antibiotike i sulfonamide.

Unutar Evropske unije, Evropska Komisija (European Commission) definiše dodatke hrani za životinje kao proizvode koji se koriste u ishrani životinja u svrhu poboljšanja kvaliteta hraniva i kvaliteta hrane životinjskog porekla, ili sa ciljem da poboljšaju performanse i zdravlje životinja, pre svega, obezbeđujući povećanu svarljivost hranljivih materija. Na osnovu podele Evropske Komisije, aditivi se mogu svrstati u sledeće kategorije:

- 1) Tehnološki aditivi (konzervansi, antioksidansi, emulgatori, agensi za stabilizaciju, regulatori kiselost, silažni aditivi)
- 2) Senzorni aditivi (arome, boje)
- 3) Nutritivni dodaci (vitamini, minerali, aminokiseline, mikroelementi)
- 4) Zootehnički aditivi (poboljšivači svarljivosti, stabilizatori crevne flore)
- 5) Kokcidiostatici i histomonostatici

U želji da modifikuje i pojednostavi postojeće zakonodavstvo u vezi dodataka hrani za životinje, Evropska Komisija je donela Uredbu "European Parliament and Council Regulation (EC) No 1831/2003" kojom se uspostavljaju nova pravila za dobijanje dozvole, nadzor i označavanje aditiva. Prema ovoj Uredbi, dodaci hrani za životinje ne mogu biti stavljeni u promet, osim ako nije dato ovlašćenje nakon naučne evaluacije koja dokazuje da aditiv nema štetnih efekata na zdravlje ljudi i životinja, kao i na životnu sredinu. Ovlašćenja se daju za određene životinjske vrste i uslove upotrebe u trajanju od deset godina. Evropska agencija za bezbednost hrane (European Food Safety Authority - EFSA) je odgovorna za sprovođenje procene podataka iz

dostavljenih zahteva za ovlašćenja. Nakon dobijenog povoljnog mišljenja od EFSA, Komisija priprema nacrt Uredbe za izdavanje odobrenja u skladu sa procedurom Stalnog Odbora odgovornog za lanac hrane i zdravlje životinja (Standing Committee on the Food Chain and Animal Health - Animal Nutrition).

### **2.2.1. Antibiotici kao stimulatori rasta u ishrani životinja**

Posebna pažnja naučne i stručne javnosti, a svakako i potrošača, oduvek je bila usmerena ka pronalaženju adekvatnih nutritivnih strategija kojima bi se moglo uticati na poboljšanje proizvodnih rezultata životinja uz istovremeno pojeftinjenje proizvodnje. Među brojnim jedinjenjima, antibiotici predstavljaju najstarije i u prošlosti najčešće korišćene stimulatore rasta. Za stimulisanje rasta antibiotici su se koristili u malim količinama, a pozitivan efekat se postizao prvenstveno kod životinja u toku rasta. Korišćenjem antibiotika kao stimulatora rasta postizao se veći prirast, bolja konverzija hrane i niži troškovi lečenja. Upotrebom antibiotika kao stimulatora rasta u ishrani prasadi zabeleženo je povećanje proizvodnih rezultata od 4-5%, a u tovu svinja 1,5-2% (Sigvard i Elwinger, 1998).

Pored pozitivnih, navode se i mogući negativni, pa i štetni efekti upotrebe antibiotika, kao što su stvaranje rezistentnih sojeva enterobakterija, koje, dalje, predstavljaju ozbiljan problem pri terapiji obolelih životinja, ali i ljudi. Problem rezistentnih sojeva se usložnjava i pojavom unakrsne rezistencije koja je posledica adaptivne sposobnosti mikroorganizama i mutagenih efekata antibiotika. Sledeći, čest, a sigurno značajniji problem jeste prisustvo rezidua antibiotika u namirnicama animalnog porekla, kao i moguće genotoksično delovanje antibiotika i njihovih rezidua (Sinovec, 2000).

U Velikoj Britaniji, Swann Committee je 1969. godine preporučio da antibiotici koji se koriste u humanoj terapiji ne treba da budu korišćeni kao antibiotici koji se dodaju u hranu za životinje (npr. tetraciklini). Švedska je vodeća zemlja u zabrani antibiotika kao promotera rasta u ishrani životinja u Evropi i već 1986. godine je zabranila njihovu upotrebu. Od tog vremena, korišćenje antibiotika je dozvoljeno samo za lečenje ili sprečavanje bolesti, pod uslovom da je izdat veterinarski recept za njegovu upotrebu. Iskustvo Švedske u gajenju životinja bez upotrebe antibiotika u hrani

pokazalo je da se u profesionalnim uslovima proizvodnje, mogu postići odlični proizvodni rezultati bez upotrebe antibiotika. Mortalitet posle odbijanja prasadi je smanjen za 0,9%, a prosečna telesna masa od 25 kg je postignuta za 1-2 dana ranije. Međutim, tokom prve godine posle zabrane, terapijska upotreba antibiotika beleži povećanje, naročito u odgoju prasadi. Poboljšanjem uslova menadžmenta i higijenskih standarda postepeno se smanjuje korišćenje antibiotika tako da je 1998. godine samo 15% prasadi tretirano antibioticima u periodu odgoja (Wierup, 1998; Metzler i sar., 2005).

Uspešna zabrana upotrebe antibiotika u Švedskoj i nov pristup u uzgoju životinja nisu imali veći odjek i uticaj na druge evropske zemlje sve do početka 90-ih godina kada je počeo da jača pokret potrošača i „konzumerizam” kao pravac razmišljanja i marketinga. Naučni odbor EU (Scientific Steering Committee) je 1999. godine izvršio skrining upotrebe antimikrobnih materija u EU i ograničio upotrebu antibiotika u ishrani životinja. Osnovni cilj je bio da se minimalizuje rizik od razvoja rezistentnih bakterija, kao i da se očuva efikasnost određenih antibiotika koji se koriste u humanoj medicini. Ovom zabranom obuhvaćeni su bacitracin, tylosin, spiramycin, virginiamycin, olaquinox i carbadox, dok je upotreba avoparcina već bila zabranjena 1997. godine. Metzler i sar. (2005) iznose da su 2005. godine samo četiri antimikrobna promotera rasta i dalje korišćena u EU i to: flavofosfolipol, salinomycin natrijum, avilamicin i monensin natrijum.

Scientific Steering Committee je u svom mišljenju od 28. maja 1999. godine izneo:

*"U vezi sa upotrebom antibiotika kao promotera rasta, korišćenje agenasa iz klasa koje se koriste ili mogu da se koriste u humanoj ili veterinarskoj medicini (odnosno gde postoji rizik za unakrsnu rezistenciju na lekove koji se koriste za lečenje bakterijskih infekcija) treba početi što pre ukidati po fazama i na kraju u potpunosti ukinuti".*

U regulativi (Regulation EC No 1831/2003 of the European Parliament and of the Council) od 22. septembra 2003. godine o aditivima koji se koriste u ishrani životinja iznosi se da antibiotici, izuzev kokcidostatika i histomonostatika, mogu biti u

prometu i koristiti se kao aditivi samo do 31. decembra 2005. godine, a da se od 1. januara 2006. godine, te supstance brišu iz Registra.

Shodno navedenim promenama strategija u ishrani, javio se veliki interes za razvijanje odgovarajućih alternativnih rešenja, koja će, pre svega, podržati funkciju autohtone mikroflore u gastrointestinalnom traktu u kontroli patogenih bakterija. Poslednju deceniju karakteriše uvođenje alternativnih mogućnosti i rešenja u kontroli enteropatogenih bakterija i stimulaciji rasta životinja u proizvodnji. Novu generaciju stimulatora rasta predstavljaju probiotici, prebiotici i fitobiotici, čijom upotrebom se postižu slični efekti kao pri korišćenju antibiotika, s tim što ne ostavljaju rezidue, niti imaju karencu. Pozitivni efekti se zasnivaju na dobro poznatom značaju održavanja eubiotičkih odnosa u digestivnom traktu domaćina. Upotrebom stimulatora rasta moguće je postići određen stepen kontrole i modifikacije crevne populacije, što je od posebne važnosti tokom perioda odgoja prasadi kada su podvrgnuta brojnim stresorima. Održavanjem ravnoteže u mikropopulaciji digestivnog trakta, kao i očuvanjem intaktnosti sluznice povećava se otpornost prema poremećajima izazvanim enteropatogenim bakterijama. Navedeni dodaci ostvaruju efekat stimulatora rasta korišćenjem fizioloških mehanizama životinja omogućavajući im da u potpunosti ispolje genetski potencijal proizvodnih svojstava.

Korišćenjem alternativnih stimulatora rasta postižu se korisni efekti kod domaćina popravljajući preživljavanje i implantaciju poželjne mikroflore, selektivno stimulišući rast i/ili aktivnost jedne ili ograničenog broja vrsta bakterija. Na taj način ostvaruje se i posredan uticaj na morfološke osobine sluznice digestivnog trakta, što je osnovni preduslov za pravilno varenje i apsorpciju hranljivih materija.

### **2.2.2. Uloga, značaj i mehanizam dejstva probiotika**

Termin probiotik ("za život", suprotno od značenja antibiotik) potiče iz grčkog jezika i relativno je nov, a odnosi se na blagotvorne efekte bakterija na zdravlje ljudi i životinja. Dobitnik Nobelove nagrade, Eli Metchnikoff, je prvi upotrebio ovaj termin u svojoj studiji "Produžavanje života", u kojoj je izneo ideju da mikroorganizmi mogu imati blagotvorne efekte na ljudsko zdravlje, a posebno na poremećaje digestivnog trakta. Metchnikoff je utvrdio da korišćenje jogurta koji sadrži laktobacile

(*Lactobacillus bulgaricus*) rezultira smanjenjem broja bakterija koje proizvode toksine u crevima i da se navedenim načinom utiče na dugovečnost domaćina. Zapažanja do kojih je došao Metchnikoff su bazirana na prethodnim rezultatima bugarskog mikrobiologa Stamena Grigorova (1878-1945), koji je ukazao na značaj bugarskog jogurta i laktobacila *Lactobacillus bulgaricus*, danas poznatog kao *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*, u dugovečnosti bugarskih farmera (Hume, 2011).

Lilly i Stillwell (1965) su okarakterisali probiotike kao mikroorganizme i supstance koje doprinose održavanju intestinalne mikrobne ravnoteže, odnosno eubioze. Sličnu definiciju iznosi i Parker (1974) koji je prvi upotrebio termin probiotik u smislu kojim se koristi danas. Međutim, korišćenje reči supstanca, u prethodnim definicijama probiotika, imalo je široku konotaciju kojom su ubuhvaćeni i antibiotici. Fuller (1989) je pokušao da unapredi prethodne definicije navodeći da su probiotici živi mikrobni dodaci hrani koji blagotvorno deluju na životinju domaćina tako što održavaju ravnotežu crevnih mikroorganizama. Havenaar i sar. (1992) su proširili definiciju probiotika opisujući ih kao održive mono ili mešovite kulture mikroorganizama koje primenjene na životinje ili čoveka, blagotvorno utiču na domaćina poboljšavajući svojstva autohtone mikroflore.

Danas je univerzalno značenje izraza "probiotik" definisano od strane Svetske zdravstvene organizacije (WHO) i Organizacije za hranu i poljoprivredu (FAO) Sjedinjenih Američkih Država, koji definišu probiotik kao žive mikroorganizme koji, upotrebljeni u adekvatnim količinama, ispoljavaju blagotvorno dejstvo na zdravlje organizma domaćina (Corcionivoschi i sar., 2010).

Da bi ispoljili svoju efikasnost i ostvarili pozitivan uticaj na zdravlje domaćina, probiotske bakterije moraju ispuniti brojne kriterijume koji zahtevaju da: a) budu pripremljene na način koji im omogućava da ostanu održive i stabilne tokom upotrebe i skladištenja, b) imaju sposobnost umnožavanja i opstanka u crevnom traktu, c) ostvare direktne i indirektne pozitivne efekte na domaćina (poboljšana crevna flora, redukovanje patogena), d) poseduju jaku adhezivnu sposobnost, e) njihova bezbednost u upotrebi bude evidentna (Fuller, 1989; Brown, 2011).

Da bi se obezbedila optimalna funkcionalnost probiotskih sojeva, od ključnog značaja je njihova vitalnost. Nakon ingestije, probiotske bakterije moraju da prežive tri neizbežne fiziološke prepreke: lizozim pljuvačke, kiselu sredinu želuca, kao i uticaj

žučnih kiselina u dvanaestopalačnom crevu (Saarela i sar., 2009). Iz navedenih razloga, sa ciljem obezbeđivanja opstanka tokom prolaska kroz gastrointestinalni trakt, probiotski sojevi se testiraju u pogledu otpornosti na nizak pH, žučne kiseline i enzime za varenje. Održivost i stvarna aktivnost probiotskih bakterija u crevnom traktu direktno utiče na krajnji efekat probiotika, s tim da nijedan od do sada poznatih probiotika ne kolonizuje permanentno creva domaćina (Corcionivoschi i sar., 2010; Ohashi i Ushida, 2009).

Ohashi i Ushida (2009), kao i Ohashi i sar. (2004) su dokazali da se probiotska bakterija *L. casei Shirota* ne može detektovati u fecesu tretiranih svinja 2 nedelje nakon poslednje primene. Da bi se održao stabilan i visok nivo probiotskih bakterija u gastrointestinalnom traktu, jedini mogući način je njihova češća primena tokom ispitivanog perioda. U slučaju upotrebe probiotske bakterije *L. casei Shirota* neophodna je primena četiri doze svakih 6 sati da bi se održao maksimalan nivo u cekumu, a navedeni autori su zaključili da navedeni režim važi i za upotrebu drugih probiotskih bakterija.

U cilju pronalaženja adekvatnih vrsta i sojeva probiotskih bakterija ili njihovih mešavina koje će biti apsolutno bezbedne za upotrebu, a istovremeno u stanju da ostvare predviđene funkcije, istraživanja su usmerena u tri pravca: korišćenje monokultura (zaštitne vrste i sojevi bakterija), definisanih (zaštitne i pomažuće vrste i sojevi) i nedefinisanih kultura (zaštitne, pomažuće i neutralne vrste i sojevi). Uprkos pozitivnim efektima i činjenici da sporedni efekti nisu uočeni prilikom korišćenja nedefinisanih kultura postoji opravdana zabrinutost za bezbednost korišćenja ovih kultura, s obzirom na mogućnost transmisije patogenih bakterija na koje su osetljivi ljudi i/ili životinje (Stavric i D'Aoust, 1993). Zbog toga su istraživanja usmerena na razvoj monokultura ili definisanih kultura.

Uočeno je da se aplikacijom čistih kultura streptokoka, laktobacila, bakteroida ili bifidobakterija postiže protektivni efekat u nekim slučajevima, dok u pojedinim slučajevima on izostaje (Medeiros i sar., 2004), ili se, čak potencira razvoj enteropatogenih bakterija (Impey i sar., 1982; Spring, 1995). Smatra se da neke čiste kulture mogu da remete ekološku ravnotežu intestinalne mikroflore, kao i da isključuju korisne bakterije, čime intestinalna mikroflora postaje manje kompleksna i konkurentna u odnosu na enteropatogene agense.

Definisane kulture se dobijaju izolovanjem i mešanjem čistih bakterijskih kultura iz cecalnog i fekalnog sadržaja odraslih životinja, pri čemu je neophodno zadržati sličan odnos dominantnih mikroorganizama kao u crevima odraslih, zdravih životinja. Definisane kulture razvijene su tako da sadrže veliki broj bakterijskih sojeva iz različitih rodova (Stavric, 1992; Stavric i D'Aoust, 1993; Gleeson i sar., 1989; Nisbet i sar., 1993; Corrier i sar., 1994).

Najčešće korišćene probiotske bakterije predstavljaju različiti sojevi mlečnokiselinskih bakterija, kao što su *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* i *Streptococcus*. Navedene bakterije su otporne na dejstvo želudačne kiseline i efekte žučnih soli, a lako se pripajaju na sluzokožu kolona i na taj način naseljavaju digestivni trakt (Jin i sar., 1998). Navedene bakterije pokazuju vrlo izraženu *in vitro* inhibiciju *Salmonella tiphimurium*, *Staphilococcus aureus*, *Escherichia coli* i *Clostridium perfringens* (Fioramonti i sar., 2003).

Bederska i Pieszka (2011) navode sledeće mehanizme kojima probiotske bakterije ostvaruju blagotvorno dejstvo na organizam životinja:

- 1) Smanjenje pH crevnog sadržaja putem proizvodnje organskih kiselina (mlečna, sirćetna, propionska i buterna)
- 2) Normalizacija korisne crevne mikroflore i sprečavanje razvoja patogene mikroflore
- 3) Pобољшanje varenja i apsorpcije hranljivih materija
- 4) Snižavanje nivoa toksičnih metaboličkih proizvoda u digestivnom traktu i u krvi, što smanjuje pojavu dijareje
- 5) Proizvodnja prirodnih antibiotskih supstanci, poznatih kao bakteriocini, koje ispoljavaju baktericidno ili bakteriostatsko dejstvo na patogene mikroorganizme
- 6) Povećanje otpornosti na bakterijske infekcije i unapređenje zdravlja
- 7) Povećanje aktivnosti nekih crevnih enzima (laktaza, saharaza, maltaza) i na taj način povećanje svarljivosti hrane
- 8) Podsticanje opšteg imuniteta organizma, kao i lokalnog imuniteta unutar gastrointestinalne sluznice
- 9) Smanjenje nivoa triglicerida i holesterola u krvi i tkivima



Ng i sar. (2009) su dokazali pozitivan uticaj probiotskih bakterija na očuvanje čvrstih (tight junction) veza u sluznici creva, dok Erdal i Eraslan (2012) navode njihov pozitivan uticaj na lučenje sluzi. Na ovaj način probiotske bakterije obezbeđuju integritet i doprinose jačanju epitelne barijere.

Interakcija probiotskih bakterija i epitelnih ćelija preko Toll-like receptora (TLR-2 i TLR-4) rezultira proizvodnjom zaštitnih citokina koji poboljšavaju regeneraciju ćelija epitela i inhibiraju epitelnu apoptozu (Rakoff-Nahoum i sar., 2004; Ng i sar., 2009). Probiotici imaju važnu ulogu u podsticanju aktivnosti citotoksičnih limfocita i sprečavanju razvoja malignih tumora (Saad i sar., 2013; Arunachalam i sar., 2000; Gill i sar., 2001).

Probiotici pokazuju mogućnost poboljšanja humoralnog i ćelijskog imunskog odgovora u borbi protiv patogena i na taj način pozitivno deluju na zdravlje domaćina (Brown, 2011). Novija istraživanja (Brito-Bermudez i sar., 2012) usmeravaju pažnju na imunomodulatorni efekat probiotika uticajem na TLR proteine (transmembranski proteini lokalizovani na brojnim imunim ćelijama) ali i NLR proteine (intracelularni nukleotid vezujući proteini). Probiotici stimulišu sistemsku, ali i lokalnu proizvodnju IgA u sluznici creva, čime poboljšavaju funkciju imunološke barijere. Za navedene imunomodulatorne efekte odgovorne su komponente ćelijskog zida probiotskih bakterija, a pre svega lipoteična kiselina i peptideglukani (Ohashi i Ushida, 2009).

Najvažnija funkcija, sadržana i u samoj definiciji probiotika, jeste modulacija mikrobiološke populacije u digestivnom traktu domaćina. Dobro funkcionisanje digestivnog trakta je jedan od osnovnih preduslova za dobro zdravlje životinje, kao i za postizanje optimalnih proizvodnih rezultata. Probiotiske bakterije menjaju uslove u crevima onemogućavajući patogenim bakterijama da prežive. Navedeni uticaj može se ostvariti putem dva osnovna mehanizma, i to antagonističkom aktivnošću prema patogenim bakterijama i konkurentskim isključivanjem.

Antagonistička aktivnost probiotskih bakterija ostvaruje se zahvaljujući proizvodnji baktericidnih supstanci kao što su bakteriocini i njima slične supstance, organske kiseline i vodonik peroksid (Gilland i Speck, 1977). Mehanizam antibakterijskog dejstva bakteriocina se bazira na dezintegraciji (formiranjem pora) ili inhibiciji sinteze ćelijskog zida bakterija (Hassan i sar., 2012) Dokazano je da *Lactobacillus acidophilus* proizvodi acidofilin, laktocidin i acidolin, dok *L. plantarum*

proizvodi laktolin (Vila i sar., 2010). Laktocidin ispoljava inhibitornu aktivnost protiv različitih vrsta bakterija uključujući i *Proteus spp.*, *Salmonella spp.*, *E. coli* i *Staphylococcus spp.* (Vincent i sar., 1959). Bifidocin je bakteriocin koga proizvodi *Bifidobacterium bifidum* sa dokazanim inhibitornim efektom na rast brojnih Gram-pozitivnih bakterija (Makras i sar., 2006; Yildirim i sar., 1999). Kao rezultat ćelijskog metabolizma i fermentacije, probiotske bakterije proizvode određene organske i isparljive masne kiseline (VFA) i na taj način formiraju nizak pH creva koji onemogućava opstanak brojnih patogenih bakterija (Marteu i sar., 2004; Chichlovski i sar., 2007). Sorrels i Speck (1970), kao i Herrick (1972) su dokazali inhibitorni efekat sirćetne i mlečne kiseline na rast mnogih Gram-negativnih bakterija. Pojedini sojevi *Lactobacillus* i *Pediococcus* proizvode u *in vitro* uslovima velike količine vodonik peroksida (Juven i sar., 1988) koji ispoljava inhibitorni efekat na rast i razvoj *E. coli* 0157: H7 (Brashears i sar., 1998).

Greenberg (1969) je prvi upotrebio termin "konkurentno isključivnje" za model u kojem se jedna vrsta bakterije takmiči za receptore u crevnom traktu sa drugim bakterijskim vrstama. Konkurentsko isključivanje (*CE- competitive exclusion*) predstavlja kompleks međusobnog delovanja mikroorganizama, hranljivih sastojaka i faktora domaćina, koji selektivno sprečava specifične grupe ili rodove/vrste/sojeve mikroorganizama da nasele digestivni trakt (Stavric i sar., 1985; Blakenship i sar., 1990). Konkurentsko isključivanje podrazumeva stvaranje uslova sredine koji selektivno favorizuju "korisne" bakterije (normalna intestinalna mikroflora) i koče razvoj "loših" (patogenih) bakterija.

S obzirom na kompleksnost opisanih odnosa još uvek nije detaljno razjašnjena većina mehanizama koji su uključeni u CE, niti se znaju tačne funkcije svake pojedinačne bakterijske vrste u crevu. Do sada je opisano nekoliko mehanizama probiotika koji su uključeni u sprečavanje štetnog dejstva crevnih patogena, kao što su kompeticija za hranljive materije, inhibicija interakcije između patogena i crevne sluznice, agregacija sa patogenima, proizvodnja antimikrobnih supstanci, stimulacija imuniteta sluznice, kao i stvaranje neadekvatnog okruženja/uslova za rast patogena (Steer i sar., 2000; Rolfe, 1991). Probiotiske bakterije se takmiče sa patogenim bakterijama za hranljive materije i sprečavaju ih da se domognu energije neophodne za njihov rast i proliferaciju u crevnom okruženju (Cummings i Macfarlane, 1997)

Kompeticija za mesto pripajanja između autohtonih bakterija i egzogenog patogena rezultira konkurentnim isključivanjem patogenih bakterija (Ohashi i Ushida, 2009). Sherman i sar. (2005) su zaključili da se *Lactobacillus rhamnosus* i *Lactobacillus acidophilus* pripajaju na epitelne ćelije sluzokože creva u *in vitro* uslovima i na taj način onemogućavaju naknadno vezivanje patogena. Takođe, utvrđeno je da pomenuti probiotski sojevi bakterija mogu i ukloniti prethodno vezane patogene (Lee i sar., 2003).

Konkurentsko isključivanje se odnosi i na fizičko blokiranje kolonizacije patogenih bakterija putem probiotskih bakterija koje su već okupirale njihova predilekciona mesta kao što su crevne resice, peharaste ćelije i kripte (Chichlovski i sar., 2007). Da bi opstala, kasnija populacija mora biti sposobnija da se utemelji ili održi u datoj sredini ili mora da proizvodi inhibitorna jedinjenja protiv konkurentne vrste (Bailey, 1987).

Sposobnost adherencije probiotskih bakterija za epitelne ćelije sluzokože creva se smatra veoma važnom osobinom za ostvarenje mehanizma konkurentskog isključivanja. Probiotske bakterije, koje imaju veliku sposobnost adherencije na crevnu površinu, pokazuju i izraženiji uticaj na sprečavanje adherencije patogenih bakterija. Osim toga, adherencija probiotskih bakterija je povezana i sa njihovim pozitivnim uticajem na imunitet domaćina (Ohashi i Ushida, 2009). Probiotske bakterije poput *Lactobacillus plantarum* provociraju i sekreciju sluzi od strane peharastih ćelija, čime se, takođe, sprečava adherencija enteropatogenih bakterija poput *E. coli* za crevni zid (Fooks i Gibson, 2002).

#### **2.2.2.1. Efekti upotrebe probiotika kao stimulatora rasta u ishrani prasadi**

Melanie i sar. (2010), proučavajući uticaj probiotika (*Saccharomyces cerevisiae* ssp. *boulardi* i *Pediococcus acidilactici*) na proizvodne rezultate prasadi, tokom devetonedelnog perioda ishrane, utvrdili su značajno poboljšanje ( $p < 0,05$ ) konverzije hrane uz smanjenje broja *E. coli* i koliformnih bakterija u fecesu, što je rezultiralo boljim sastavom bakterijske populacije (veći broj laktobacila u odnosu na koliforme). Upotrebom navedenih probiotskih bakterija nije zabeležen uticaj na morfometrijske

karakteristike sluznice tankog creva niti na nivo kortizola, što su autori objasnili dobrom zdravstvenom stanju tretirane prasadi.

U ogledu Zani i sar. (1998) upotrebom probiotskog preparata, baziranog na sporama *Bacillus cereus*, uočen je inhibitorski efekat na rast *E.coli*, dok prisustvo rotavirusa nije bilo pod uticajem tretmana. Konverzija hrane tokom ogleda (10-60 dana) bila je poboljšana u grupi prasadi koja je dobijala probiotik (1,904) u odnosu na kontrolnu grupu (2,099). Takođe, upotrebom probiotika smanjena je za 10% ukupna konzumacija hrane. Izneti rezultati su u skladu sa podacima do kojih su došli Roth i Kirchgessner (1988) nakon upotrebe drugog probiotskog preparata na bazi *Bacillus-a* (Toyocerin).

Takahashi i sar. (2007) utvrdili su da se korišćenjem probiotske bakterije *Lactobacillus plantarum* značajno povećava broj laktobacila već 7. dana nakon primene tretmana.

Ushakova i sar. (2006) su nakon dodavanja probiotskog proizvoda na bazi *B. subtilis* u obrok za ishranu prasadi zabeležili povećanje dnevnog prirasta za 19%, kao i smanjenje unosa hrane za 10%. Svarljivost proteina i masti je povećana za 3-4%, a celuloze za 12%.

U ogledu Hoang i sar. (2010) upotrebom tri probiotska preparata na bazi različitih sojeva mlečnokiselinskih bakterija (*Enterococcus faecium*, *Lactobacillus acidophilus*, *Pediococcus pentosaceus* i *Lactobacillus plantarum*) ostvareno je značajno ( $p < 0,05$ ) povećanje prosečnog dnevnog unosa hrane, prirasta, kao i poboljšanje konverzije tokom prve dve nedelje nakon odbijanja prasadi, s tim da su opisani efekti tokom naredne tri nedelje izostali.

U Izveštaju Evropske Komisije, (SCAN, 2000) navodi se da je upotrebom probiotskog preparata Bioplus 2B u ishrani prasadi zabeleženo povećanje prosečnog dnevnog prirasta do 18,2%, kao i poboljšanje konverzije hrane do 9,3%.

U ogledu koji su postavili Cui i sar. (2013) grupa prasadi sa dodatkom probiotika (*B. subtilis*), tokom perioda ishrane od 10 do 110 kg telesne mase, je postigla značajno veći ( $P < 0,05$ ) prosečni dnevni prirast, kao i veći dnevni unos hrane, odnosno bolju ( $p < 0,05$ ) konverziju hrane.

Chen i sar. (2005) su upotrebom kompleksnog probiotika (*Lactobacillus acidophilus*, *Saccharomices cerevisiae* i *Bacillus subtilis*) tokom eksperimentalnog

perioda u trajanju od 6 nedelja, dokazali značajno povećanje prirasta, s tim da konzumacija hrane i konverzija nisu bili pod uticajem tretmana. Dobijeni podaci su u saglasnosti sa rezultatima Spriet i sar. (1987) koji su koristili probiotski proizvod na bazi *Bacillus*-a u ishrani prasadi.

Kornegay i Risley (1996) su ispitivali efekat dva proizvoda i to Biomate (*Bacillus subtilis* i *Bacillus licheniformis*) i Peletmate (*Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* i *Bacillus pumilus*) u ishrani svinja. Ukupan broj koliforma je smanjen upotrebom preparata Peletmate, dok je broj laktobacila povećan upotrebom preparata Biomate, što ukazuje na njihove različite efekte. Svarljivost suve materije, celuloze, pepela, kao i azota nije bila pod uticajem navedenih tretmana.

Hoang i sar., (2011) navode da upotrebom probiotskih kultura *Bacillus* i *Saccharomyces*, pojedinačno ili istovremeno, nije ostvaren uticaj na prosečan dnevni unos hrane, prirast i konverziju tokom perioda porasta i tova svinja. Autori navode da je kod odraslih jedinki crevna mikroflora stabilnija, svarljivost hranljivih materija bolja, a imuni status na višem nivou u odnosu na mlade jedinice, čime se može objasniti izostanak pozitivnog učinka upotrebljenih probiotskih kultura. Upotrebom probiotske bakterije *Bacillus spp.* nije utvrđen uticaj na broj mlečnokiselinskih bakterija i *E.coli* u fecesu svinja tokom oba posmatrana perioda. Međutim, istovremenom upotrebom probiotskih kultura *Bacillus* i *Saccharomyces* uočeno je povećanje broja mlečnokiselinskih bakterija, kao i smanjenje *E.coli* tokom perioda rasta. Takođe, istovremenom upotrebom probiotskih kultura *Bacillus* i *Saccharomyces* maksimalno je povećana svarljivost celuloze, dok je opisan efekat izostao prilikom samostalne upotrebe kulture *Bacillus*-a.

Probiotske bakterije *L. acidophilus* i *P. Acidilactici* su nedovoljno kolonizovale digestivni trakt prasadi u ogledu Wang i sar. (2012), ali je zabeležena modulacija crevne mikrobiote (redukcija fekalnih koliforma), kao i povećanje prosečnog dnevnog prirasta. Na osnovu iznetih rezultata autori su zaključili da probiotska bakterija *L. acidophilus* može poboljšati proizvode rezultate prasadi, ali da je neophodna njena duža primena.

Upotrebom žive kulture *Saccharomyces cerevisiae* u ishrani prasadi, Marinho i sar. (2007) su uočili drastično smanjenje koncentracije kratkolančanih masnih kiselina (SCFA), kao i molarne koncentracije buterne kiseline u kolonu tretiranih prasadi. Navedeni rezultati ukazuju na smanjenje mikrobiološke aktivnosti u debelom crevu.

Izneti podaci nisu u skladu sa podacima Mathew i sar. (1998) koji nisu utvrdili uticaj dodavanja navedenog probiotika na koncentraciju SCFA.

Bontempo i sar. (2006) su upotrebom probiotika (*Saccharomyces cerevisiae ssp. Boulardi*) takom četvoronedeljnog perioda ishrane utvrdili povećanje ( $p < 0,001$ ) telesne mase, prosečnog dnevnog prirasta, kao i poboljšanje konverzije hrane (1,4 kg utrošene hrane po jedinici prirasta) u odnosu na kontrolnu grupu (1,6 kg utrošene hrane po jedinici prirasta) prasadi. Histometrijskom analizom je dokazana veća dužina resica ( $p < 0,01$ ) kao i dubina kripte u ileumu u grupi prasadi koja su putem hrane dobijala probiotik. U navedenoj grupi prasadi uočena je i veća količina kiselih glikokonjugata u odnosu na kontrolnu grupu, čime je omogućena veća otpornost na bakterijske infekcije. Pored navedenih histoloških promena sluznice koje su doprinele poboljšanju proizvodnih rezultata, autori navode i mogućnost sinteze antimikrobnih faktora i povećano oslobađanje poliamina kao posledicu primenjenog probiotika.

Enrique i sar. (2005) su uočili statistički značajno smanjenje dužine crevnih resica u jejunumu prasadi koja su dobijala Bioplus 2B tokom 7 dana, da bi se nakon 14 dana uočilo oporavljanje resica čija se dužina više nije statistički značajno razlikovala u odnosu na kontrolnu grupu. Slične rezultate koji ukazuju na povećanje dužine crevnih resica prilikom upotrebe probiotika izneli su Giancamillo i sar. (2008) pri upotrebi *Pediococcus acidilactici*, odnosno, Choi i sar. (2011) pri upotrebi *Lactobacillus acidophilus*, *Saccharomyces cerevisiae* i *B. subtilis*.

Upotrebom probiotskog preparata Bioplus 2B (*Bacillus licheniformis* i *Bacillus subtilis*) Ahrens i sar. (1992) su zabeležili povećanje prosečnog dnevnog prirasta za 13% u odnosu na kontrolnu grupu prasadi. U ogledu Kyriakis i sar. (1999) ispitivana je efikasnost probiotika, koji sadrži održive spore *Bacillus licheniformis*, u kontroli dijareje posle odbijanja prasadi u farmi niskog higijenskog i zdravstvenog statusa. Rezultati su pokazali da su sve grupe sa dodatkom probiotika ispoljile smanjenu pojavu dijareje. Smrtnost kod prasadi koja su putem hrane dobijala probiotik bila je znatno niža ( $p < 0,05$ ) u odnosu na kontrolnu grupu.

Link i sar. (2007) su upotrebom probiotika Bioplus 2B u ishrani gravidnih krmača ukazali na mogućnost povećanja ukupnog sadržaja masti i holesterola, kao i posledičnog povećanja dnevnog prirasta prasadi tokom perioda sisanja. Autori navode da probiotski sojevi iz upotrebljenog preparata poseduju mogućnost proizvodnje enzima

(proteaza, amilaza i katalaza) čime se objašnjava poboljšanje prosečnog dnevnog prirasta kod mladih životinja.

U okviru specijalističkog rada na Katedri za ishranu i botaniku Fakulteta Veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, Labus (2011) je upotrebom probitskog preparata BioPlus 2B u ishrani suprasnih/dojnih krmača dokazala statistički značajno povećanje ( $p < 0,01$ ) broja odlučene prasadi u odnosu na kontrolnu grupu. Prosečna telesna masa prasadi na odbijanju u grupi koja je putem hrane dobijala probiotik ( $7,33 \pm 0,19$  kg) bila je statistički značajno veća ( $p < 0,01$ ) u odnosu na kontrolnu grupu ( $7,06 \pm 0,13$  kg) prasadi.

Bula i sar. (2012) su upotrebom probiotika BioPlus 2B u ishrani krmača, tokom perioda laktacije, ostvarili značajno veću težinu odlučenog legla, dok se broj odlučene prasadi po leglu nije bitno razlikovao između kontrolne i grupe prasadi sa dodatkom navedenog probiotika. U slično postavljenom ogledu Degola i Sanita (2012) upotrebom istog probiotika, BioPlus 2B, broj odlučene prasadi je porastao za 7,5%, a masa celog legla je značajno povećana ( $p < 0,05$ ) u odnosu na kontrolnu grupu prasadi.

### **2.2.3. Uloga, značaj i mehanizam dejstva prebiotika**

Gibson i Roberfroid (1995) su prvi uveli pojam prebiotika kao dodataka hrani i predložili definiciju, kao i jasne kriterijume kojim ih opisuju. Prema navedenim autorima prebiotici predstavljaju nesvarljive sastojke hrane koji povoljno deluju na domaćina selektivno stimulišući rast i/ili aktivnost jedne ili ograničenog broja vrsta bakterija u kolonu, čime poboljšavaju zdravstveno stanje domaćina. Da bi se određeni sastojak hrane mogao nazvati prebiotik, prema navedenim autorima, on mora ispuniti osnovne kriterijume: a) ne sme biti hidrolizovan niti apsorbovan u gornjim partijama digestivnog trakta, b) mora da predstavlja selektivan supstrat za jednu ili ograničen broj poželjnih vrsta bakterija u kolonu i da stimuliše njihov rast i/ili ih metabolički aktivira, c) mora da bude sposoban da menja mikrofloru kolona u smislu poželjnijeg (zdravijeg) sastava, d) mora da indukuje lokalne ili sistemske efekte koji su korisni za domaćina.

Velika zainteresovanost, kao i brojne studije istraživača tokom narednih godina, na polju ispitivanja mogućnosti upotrebe prebiotika, pre svega kao funkcionalne hrane, nametnula je potrebu za redefinisanjem i uspostavljanjem dodatnih kriterijuma koje

prebiotici moraju ispuniti. Gibson i sar. (2004) i Roberfroid (2007) su preformulisali prethodnu definiciju i izneli da prebiotici predstavljaju selektivno fermentisane ingredijente koji omogućavaju specifične promene u sastavu i/ili aktivnosti gastrointestinalne mikrobiote kojima se pozitivno utiče na zdravlje i blagostanje domaćina. Navedeni autori su redefinisali i kriterijume za kvalifikaciju prebiotika: a) rezistentnost na kiselu sredinu želuca, hidrolitički enzimski sistem sisara, kao i na apsorpciju u gastrointestinalnom traktu, b) mogućnost fermentacije od strane crevne mikroflore, c) selektivna stimulacija rasta i/ili aktivnosti crevnih bakterija koje pozitivno utiču na zdravlje i blagostanje domaćina. Roberfroid (2007) je istakao da se rezistencija ne odnosi na potpunu nesvarljivost, ali da bi značajan deo unetog prebiotika trebalo da bude dostupan u debelom crevu kao supstrat za proces bakterijske fermentacije.

Među brojnim sastojcima hrane, nesvarljivi ugljeni hidrati (oligo i polisaharidi), pojedini peptidi i proteini, kao i određeni lipidi predstavljaju, za sada, kandidate za prebiotike. Zbog svoje hemijske strukture nabrojane komponente hrane ne podležu enzimskoj hidrolizi, niti se resorbuju u prednjim partijama digestivnog trakta, tako da se mogu nazvati “kolonalna hrana”, odnosno hrana, koja dospevši u zadnje partije digestivnog trakta, služi kao supstrat za prisutne bakterije, indirektno obezbeđujući domaćina energijom, metaboličkim supstratima i esencijalnim mikroingredijentima (Gibson i Roberfroid, 1995).

Gibson i Roberfroid (1995) navode da, za sada, jedino nesvarljivi ugljeni hidrati mogu da zadovolje sve navedene kriterijume prebiotika. Nesvarljivi ugljeni hidrati obuhvataju različita jedinjenja kao što su nesvarljivi škrob, neskrobni polisaharidi (polisaharidi ćelijskog zida, hemiceluloza, pektini, gume) i nesvarljivi oligosaharidi (Delzenne i Roberfroid, 1994). Međutim, iako se svi nabrojani ugljeni hidrati mogu svrstati u kategoriju kolonalne hrane, ne mogu svi zadovoljiti stroge kriterijume prebiotika jer su intestinalni fermentativni procesi za većinu navedenih jedinjenja nespecifični. Budući da stimulišu rast i/ili aktivnost različitih vrsta bakterija, uključujući i nepoželjne vrste, većina navedenih sastojaka ne pokazuje selektivnost kao jedan od glavnih kriterijuma klasifikacije prebiotika (Drasar i sar., 1976; Maczulak i sar., 1993; Salyers i sar., 1982; Wang i Gibson, 1993).



Među nesvarljivim ugljenim hidratima najveći značaj imaju pojedini oligosaharidi (Flickinger, 2003). Oligosaharidi se sastoje od 2-10 monosaharida međusobno povezanih glukozidnim vezama koje se formiraju između hemiacetal grupe (ili hemiketal grupe) jednog šećera i hidroksilne grupe drugog šećera. Najzastupljeniji oligosaharidi u ishrani životinja su frukto-oligosaharidi dobijeni iz pšenice i zrnevlja leptirnjača i manan-oligosaharidi poreklom iz ćelijskog zida kvasca, dok se u humanoj medicini značajnije količine oligosaharida mogu obezbediti putem banane, artičoke, crnog i belog luka, paradajza, meda itd. (Van Loo i sar., 1995; Mul i Perry, 1994).

Korisni efekti oligosaharida na zdravlje domaćina se ostvaruju pozitivnim uticajem na rast korisne mikroflore creva, inhibiranjem crevne kolonizacije patogenim bakterijama, adsorbovanjem mikroorganizama i njihovih toksina, stimulisanjem imunog sistema, kao i pozitivnim uticajem na telesni metabolizam. Bakterije mlečne kiseline i bifidobakterije, koje se smatraju članovima poželjne mikroflore u digestivnom traktu, za potrebe svog metabolizma koriste ugljene hidrate poreklom iz prebiotika. Međutim, patogene bakterije (*E. coli*, *Salmonella spp.*), kao i mnoge druge Gram-negativne bakterije ne poseduju navedene sposobnosti i bivaju eliminisane iz crevne mikropopulacije putem poželjne bakterijske flore koja ima sposobnost intenzivnijeg umnožavanja (Bederska i Pieszka, 2011).

Navedena selektivnost u korišćenju dostupnog crevnog supstrata (prebiotika) u kaudalnim partijama digestivnog trakta je opisana kod *Bifidobacteria* prilikom upotrebe frukto-oligosaharida i inulina (Hidaka i sar., 1986; Gibson i sar., 1995; Gibson i Roberfroid, 1995), transgalakto-oligosaharida (Tanaka i sar., 1983; Ito i sar., 1993; Rowland i Tanaka, 1993), kao i oligosaharida poreklom iz soje (Hayakawa i sar., 1990; Saito i sar., 1992).

Saad i sar. (2013) navode da se oligosaharidi intenzivno koriste u proizvodnji hrane i pića (bezalkoholni napici i konditorski proizvodi) zbog mogućnosti modifikacije viskoziteta, osobina emulgatora, sposobnosti formiranja gela i bojenja hrane. Pored navedenih osobina, dokazano je da poseduju nisku kalorijsku vrednost, kao i nizak glikemijski indeks.

Gibson i Roberfroid (1995) su izneli da, među svim nesvarljivim ugljenim hidratima koji ispunjavaju kriterijume kolonalne hrane, jedino frukto-oligosaharidi ispunjavaju i kriterijume prebiotika. Ostala jedinjenja za koje samo ekperimentalni

podaci samo ukazuju da bi mogla biti klasifikovana kao prebiotici su transgalakto-oligosaharidi i oligosaharidi poreklom iz soje.

Frukto-oligosaharidi (FOS), predstavljaju kratko i srednjelančane polimere D-fruktoze, koji ne mogu biti razloženi digestivnim enzimima sisara (Rumessen i sar., 1990; Dorshov i Levitt, 1986), što im omogućava pasažu do kaudalnih partija digestivnog trakta u nepromenjenom obliku. U zavisnosti od dužine lanca i stepena polimerizacije, frukto-oligosaharidi mogu biti u formi oligofruktoze ili inulina. Inulin se dobija ekstrakcijom, putem tople vode, iz korena cikoriije, dok se oligofruktoza dobija delimičnom enzimskom hidrolizom inulina pod strogo kontrolisanim uslovima. FOS se mogu definisati kao prebiotici i zbog svoje sposobnosti da stimulišu rast bakterija koje unapređuju zdravlje domaćina, kao što su mlečnokiselinske bakterije, laktobacili i bifidobakterije (Kaplan i Hutkins, 2000;. Bird i sar, 2009). Bifidobakterije poseduju enzim  $\beta$ -fruktozidazu, zbog čega, za potrebe svog metabolizma, mogu da koriste FOS. Daljim rastom i umnožavanjem, bifidobakterije stvaraju nepogodnu sredinu (smanjuju pH vrednost proizvodeći sirćetnu i mlečnu kiselinu i proizvode supstance slične bakteriocinima) za rast brojnih patogena (Wang i Gibson, 1993), čime ostvaruju lokalni efekat u crevima domaćina. Vezivanjem FOS-a sa pojedinim patogenim bakterijama indirektno se menja mikroflora digestivnog trakta u smislu smanjenja broja nepoželjnih vrsta bakterija, što je našlo primenu i u kontroli dijereje kod ljudi (Spiegel i sar., 1994). Sistemski efekat FOS-a se ispoljava u smanjenju krvnog pritiska, resorpcije ugljenih hidrata i lipida, što za posledicu ima normalizaciju koncentracije glukoze i serumskih lipida u krvi (Yamashita, 1984). Navedeni efekti se ostvaruju nakon proizvodnje i resorpcije SCFA, nastalih tokom procesa fermentacije FOS-a od strane bifidobakterija (Demigne i sar., 1986).

Prema Izveštaju Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO, 2007), na svetskom tržištu je prisutno više od 400 prebiotskih proizvoda a samo vrednost tržišta prebiotika u Evropi iznosi više od 87 miliona € uz predviđeni rast do 179,7 milliona € u 2010. godini. U navedenom izveštaju, kao uobičajeno korišćeni prebiotici navode se: inulin, frukto-oligosaharidi (FOS), galakto-oligosaharidi (GOS), oligosaharidi poreklom iz soje, ksilo-oligosaharidi, pirodekstrini, izomalto-oligosaharidi i laktuloza. Pored navedenih, postoji i veliki broj novih prebiotskih proizvoda (gluko-

oligosaharidi, levani, rezistenti skrob, itd.), čija je efikasnost ispitivana u različitom stepenu, u *in vitro* modelima, kao i na životinjama, ali retko u ishrani ljudi.

Grela, (2006) navodi da su u ishrani životinja najčešće korišćeni prebiotici manan - (MOS), frukto - (FOS) i transgalakto - (TOS) oligosaharidi.

Manan-oligosaharidi (MOS) predstavljaju polimere manoze, koja se uglavnom nalazi u ćelijskom zidu kvasca i biljaka, s tim da manani poreklom od kvasca imaju bolju sposobnost vezivanja *E. coli* i *Salmonella* (Newman, 2006). Ćelijski zid kvasca je izgrađen od kovalentno povezanih kompleksa (1-3)- $\beta$ -D-glukana, (1-6)- $\beta$ -D-glukana, i hitina, dok se amorfna komponenta matriksa, kao i fibrilarni sloj koji se nalazi na površini ćelijskog zida kvasca sastoji od mananoproteina (Kogan i Kocher, 2007). Brady i sar. (1994) navode da kvasac sadrži približno 7,8% MOS-a, dok su White i sar. (2002) utvrdili sadržaj MOS-a od 5,2%. Kada se kvasac upotrebljava u obroku u količini od 3% obezbediće nivo MOS-a od približno 0,16%, što je i najčešće korišćena doza u brojnim ogledima ishrane. Za rigidnost ćelijskog zida, njegovu morfologiju i oblik odgovorni su  $\beta$ -D-glukani i hitin, dok su mananoprotein i njegov ugljenohidratni deo  $\alpha$ -D-manan odgovorni za prepoznavanje i interakciju sa okruženjem, kao i za imunološku specifičnost kvasca (Ruiz-Herera, 1992). Navedeni, polisaharidni konstituenti ćelijskog zida kvasca ( $\beta$ -D-glukani i  $\alpha$ -D-mannani) imaju sposobnost modulacije imunog sistema brojnih organizama, putem specifičnih interakcija sa različitim imunokompetentnim ćelijama (Medzhitov i Janeway, 2000). Lyons i Bourne (1995) navode da manan oligosaharidi, poreklom iz ćelijskog zida kvasca, stimulišu lokalni imuni sistem domaćina povećanjem aktivnosti makrofaga i T-limfocita. Povećanje imunološkog odgovora se ogleda u stimulisanju fagocitoze (Kokoshis i sar., 1978; Cotter i sar., 2002), oslobađanju arahidonske kiseline (Kennedy i sar., 1995), leukotriena (Petersen i sar., 1994), interleukina (Adachi i sar., 1994; Flory i sar., 1995), interferona (Sakurai i sar., 1995) i tumor nekroze faktora (Jouault i sar., 1995; Ohno i sar., 1995; Okazaki i sar., 1995). Oligosaharidi koji sadrže manozu mogu da utiču na imuni sistem i stimulacijom jetre da luči manozo-vezujuće proteine koji se vezuju za kapsulu bakterija i pokreću mehanizam reakcije vezivanja komplementa (Janeway, 1993).

MOS je prvi put predstavljen kao dodatak hrani za životinje 1993. godine (Hooge, 2003), a posebnu pažnju je izazvala činjenica da ne može biti razložen putem

digestivnih enzima, odnosno da može proći neoštećen kroz digestivni trakt (Newman, 1994). Tokom prolaska kroz digestivni trakt MOS stvara kompleks manan-bakterija koji nerazgrađen prolazi u kaudalne partije i izbacuje se u spoljnu sredinu. Princip dejstva manana bazira se na kompatibilnosti strukture manozama i lektina koji se nalaze na bakterijskim pilama i fimbrijama. Na površini bakterija koje ujedno i preovlađuju u patologiji digestivnog trakta monogastričnih životinja (*E. coli*, *Salmonella*, *Clostridium*, *Vibrio*) nalaze se lektini preko kojih se bakterije pripajaju za površinu mukoze epitelnih ćelija creva koje na svojoj površini poseduju polisaharidnu strukturu koja konformacijski odgovara lektinima (Sharon i Lis, 1993). Dodavanjem manan-oligosaharida dolazi do stvaranja kompleksa manan-bakterija, čime se onemogućava adhezija patogena za crevni zid. Prisutni patogeni će zatim biti „isprani“ iz crevnog trakta, čime će se onemogućiti njihova kolonizacija (Newman, 1994). Uzimajući u obzir činjenicu da bakterije poseduju i druge mehanizme adhezije za epitelne ćelije creva koji su rezistentni na opisanu inhibiciju manozama, veliki broj sojeva *E. coli* (66%) i *Salmonella* (53%) poseduju adhezine osteljive na manozu. U brojnim ogledima je dokazano da *E. coli*, koja ima manozo-specifične adhezivne proteine, poput lektina, neće adherirati na ćelije sisara kada je manozama prisutna (Salit i Gotschlich, 1977; Ofek i Beachei, 1978). Manan-oligosaharidi izolovani iz ćelijskog zida *S. cerevisiae* ostvaruju pozitivan efekat na sastav crevne mikroflore (Lyons i Bourne, 1995), suprimirajući rast *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Clostridium botulinum* i *C. sporogenes*, a stimulišući rast *B. longum*, *L. casei*, *L. acidophilus* i *L. Delbruckei* (Vondruskova i sar., 2010).

MOS, ne samo da suprimira vezivanje patogena za zid creva, već i eliminiše one koji su već kolonizovani u digestivnom traktu (Newman, 1994). Pluske i sar. (1997) navode da patogeni dovode do nastanka bolesti samo kada su kolonizovali i inficirali epitelne ćelije u crevima. Smanjena kolonizacija patogena rezultira zdravim gastrointestinalnim traktom i poboljšanom svarljivosti hranljivih materija što za posledicu ima poboljšanje proizvodnih rezultata životinja. Pored toga, nevezan patogen može da se koristi kao oslabljen antigen, koji u kontaktu sa imunim ćelijama, pokreće imunološku reakciju (Kocher, 2004).

### 2.2.3.1. Efekti upotrebe prebiotika kao stimulatora rasta u ishrani prasadi

Shen i sar. (2009) su, ispitujući efekte prebiotika (fermentisana kultura kvasca) u ishrani odbijene prasadi, utvrdili povećanje ( $p < 0,01$ ) prosečnog dnevnog unosa hrane, kao i ostvarenog dnevnog prirasta ( $p < 0,05$ ) pri upotrebljenoj količini od 5 g/kg hrane, dok je navedeni efekat izostao prilikom upotrebe 2,5 g, 10,0 g i 20,0 g/kg hrane. Konverzija hrane nije bila pod uticajem tretmana. Autori su zabeležili povećanje dužine crevnih resica u jejunumu kao i veću svarljivost suve materije i proteina u grupi prasadi koja je dobijala prebiotik. Suprotno navedenim rezultatima, Van der Peet-Schvering i sar. (2007) nisu utvrdili pozitivan efekat dodavanja kulture kvasca na dužinu crevnih resica i dubinu kripti u jejunumu.

Upotrebom prebiotika (pivarski kvasac sa 5,2% manan oligosaharida) White i sar. (2002) su zabeležili smanjen unos hrane, kao i posledično niži ostvaren dnevni prirast u odnosu na kontrolnu grupu prasadi. Dužina crevnih resica i dubina kripti u dvanaestopalačnom crevu nisu bili pod uticajem prebiotika. Na kraju eksperimentalnog perioda (28. dan) broj laktobacila u fecesu prasadi koja su dobijala prebiotik bio je veći ( $p < 0,05$ ) u odnosu na kontrolnu grupu.

U istraživačkim centrima Veterinarskog i Poljoprivrednog fakulteta na Tajlandu, Poeikhampha i sar. (2011) izveli su ogled kojim su dokazali da je upotreba MOS-a rezultirala povećanjem krajnje telesne mase, prosečnog dnevnog prirasta i poboljšanjem konverzije hrane u odnosu na kontrolnu grupu prasadi, s tim da nije utvrđena razlika u konzumaciji hrane. Ukupan broj mlečnokiselinskih bakterija, kao i *E.coli* u ispitivanim segmentima digestivnog trakta (cekum i rektum) nije bio pod uticajem MOS-a. Upotreba navedenog prebiotika uticala je na povećanje buterne kiseline i ukupnih SCFA u cekumu, kao i dubine kripti u jejunumu ( $p < 0,05$ ).

Tokom dvonedeljnog perioda, nakon odbijanja, prasad koja su putem hrane dobijala MOS (0,2%), a zatim veštački inficirana virusom PRRS-a (reproduktivni i respiratorni sindrom svinja) ostvarila su bolju konverziju hrane, uz povećanje broja leukocita i smanjenje rektalne temperature i medijatora zapaljenske reakcije (Tung, 2010). Dobijeni rezultati ukazuju na imunomodulatorni efekat MOS-a koji štiti organizam tokom akutne faze virusne infekcije.

Ispitujući efekat MOS-a na proizvodne rezultate prasadi u periodu odgoja, Rozeboom i sar. (2005) su dokazali značajno ( $p < 0,05$ ) povećanje prosečnog dnevnog prirasta, kao i povećanje unosa hrane u grupi koja je putem hrane dobijala navedeni prebiotik.

Miguel i sar. (2004), procenjujući efekat MOS-a, utvrdili su veći unos hrane kod prasadi koja su odbijena pri ranijem (17-18 dana) uzrastu u odnosu na kasnije odbijenu prasadi (24-28 dana starosti). Najveći dnevni prirast ostvarila su prasadi tokom prve dve nedelje nakon odbijanja, dok je u kasnijem periodu ishrane razlika u odnosu na kontrolu bila slabije izražena (2,12% u odnosu na prvobitnih 8,47%).

U ogledu Zhao i sar. (2012) ispitivan je uticaj dva prebiotska preparata (BioMos-izvor manan oligosaharida i Fruktan-fruktozni polimer) u ishrani odbijene prasadi. U prvoj fazi ogleda (0 do 14. dan), prasadi koja su obrokom dobijala samo manan- oligosaharid ili istovremeno manan-oligosaharid i fruktan ostvarila su veći dnevni prirast i unos hrane u odnosu na kontrolnu grupu, dok je tokom druge faze ogleda (15 do 28. dan) navedeni efekat izostao. Korišćenjem samo manan-oligosaharida ili istovremenim dodatkom fruktana povećana je svarljivost azota i suve materije hrane. Upotrebom manan-oligosaharida značajno ( $p < 0,05$ ) je smanjena pojava dijareje u poređenju sa kontrolnom grupom prasadi.

Mikkelsen i Jensen (2004) su izveli eksperiment sa ciljem utvrđivanja uticaja prebiotika frukto-oligosaharida (FOS) i transgalakto-oligosaharida (TOS) na mikrobnu populaciju i njihovu aktivnost u gastrointestinalnom traktu odbijene prasadi, starih 4 nedelje. Upotreba navedenih preparata prebiotika nije uticala na broj anaerobnih bakterija, laktobacila i enterobakterija, dok je broj kvasca značajno povećan u distalnom tankom crevu, cekumu i kolonu prasadi hranjenih sa dodatkom FOS ( $P < 0,05$ ), s tim da su navedene razlike bile izraženije u grupi sa dodatim TOS ( $p < 0,01$ ).

Tokom ogleda Hung (2009) nije zabeležio uticaj različitih količina upotrebljenog MOS-a (0,1%, 0,2% i 0,4%) na prosečan dnevni unos hrane, prirast i konverziju. Na kraju prve faze ogleda (14. dan) prasadi koja su obrokom dobijala antibiotik ostvarila su veću ( $p < 0,05$ ) telesnu masu u odnosu na prasadi koja su dobijala MOS, s tim da nisu utvrđene značajne razlike u ostalim proizvodnim rezultatima.

Yin i sar. (2008) su ispitivali efekte korišćenja dva različita prebiotska proizvoda u ishrani rano odbijene prasadi i to: GMOS (galakto-manan-oligosaharid, 0,2%) i COS

(hitozan, 0,025%). Na kraju prve nedelje oglada nije zabeležena razlika u proizvodnim rezultatima među ispitivanim grupama, dok je na kraju druge nedelje upotreba prebiotika rezultirala značajnim ( $p < 0,05$ ) povećanjem prosečnog dnevnog prirasta, kao i poboljšanjem konverzije, s tim da nije utvrđena razlika u konzumaciji hrane. Kod prasadi koja su dobijala navedene preparate zabeležena je veća serumska koncentracija citokina (IL-1 $\beta$ , IL-2 i IL-6) i imunoglobulina (IgA, IgG i IgM) u odnosu na kontrolnu grupu, što ukazuje na imunomodulatorni efekat korišćenih prebiotskih preparata.

Tang i sar. (2005) navode da se upotrebom hitozana i/ili galakto-manan-oligosaharida u ishrani rano odbijene prasadi mogu poboljšati proizvodni rezultati, a ostvareni efekat objašnjavaju pre svega povećanjem koncentracije faktora rasta IGF-1.

Upotrebom različitih količina hito-oligosaharida (0, 2,5 i 5,0 g/kg hrane) Chen i sar. (2009) su dokazali pozitivan uticaj navedenog prebiotika na proizvodne rezultate prasadi tokom druge faze oglada (15-25. dan), ali i tokom celokupnog trajanja oglada u vidu dozno zavisnog, linearnog povećanja prosečnog dnevnog unosa hrane, kao i prosečnog dnevnog prirasta, pri čemu konverzija hrane nije bila pod uticajem tretmana. Tokom oglada, upotrebom prebiotika je povećana svarljivost azota i suve materije hrane.

Rossi i sar. (2008) su izveli ogled u cilju procene upotrebe gluko-oligosaharida (GOS), kao alternativnog stimulatora rasta u ishrani prasadi. Upotrebom navedenog prebiotika ostvaren je veći prosečan dnevni prirast tokom poslednje faze oglada (period od 57 do 77. dana oglada). Prasad koja su tokom prvih 14 dana oglada putem obroka dobijala antibiotik, a zatim GOS, imala su veću dužinu resica u ileumu u odnosu na prasad koja su dobijala samo GOS tokom celokupnog perioda ishrane. Nivo proteina koji učestvuju u zapaljenskoj reakciji ( $\beta$ -1 globulin i haptoglobulin) je smanjen kod prasadi koja su tokom oglada dobijala GOS bez prethodne upotrebe antibiotika.

Sweeney i sar. (2011) su procenjivali mogućnost upotrebe dva polisaharida poreklom iz morske trave, fukoidan (240 mg/kg hrane) i laminarin (300 mg/kg hrane), u ishrani odbijene prasadi. Tokom oglada, upotrebom navedenih dodataka, nisu zabeležene razlike u prosečnom dnevnom unosu hrane, prirastu kao i konverziji u odnosu na kontrolnu grupu. Dodatkom fukoidana značajno je povećan ( $p < 0,05$ ) broj laktobacila u cekumu, kao i količina buterne kiseline ( $p < 0,05$ ) u cekumu i kolonu. Međutim, upotreba laminarina, kao i fukoidana rezultirala je povećanim brojem

*Salmonella Typhimurium* u fecesu tretiranih prasadi. Izneti rezultati su u skladu sa podacima koje su izneli Lynch i sar. (2010).

Walsh i sar. (2013) su korišćenjem različitih količina laminarina u ishrani prasadi, utvrdili da upotreba 300 mg/kg hrane rezultira većim prosečnim dnevnim prirastom ( $p < 0,05$ ), kao i boljom konverzijom hrane u odnosu na kontrolnu grupu prasadi bez dodatog laminarina u hranu.

#### **2.2.4. Uloga, značaj i mehanizam dejstva fitobiotika**

Fitogeni dodaci hrani za životinje (fitobiotici ili biljne droge) se definišu kao jedinjenja biljnog porekla koja se koriste u ishrani životinja sa ciljem unapređenja njihove produktivnosti putem poboljšanja proizvodnih rezultata životinja, svojstava hrane, kao i kvaliteta namirnica animalnog porekla. Navedena definicija je izvedena na osnovu načina upotrebe, s tim da se prilikom klasifikacije širokog spektra fitogenih jedinjenja mogu koristiti i drugi termini kao što su bilje, začini, esencijalna ulja i uljane smole (Windisch, 2008).

Prema trenutno važećoj regulativi Evropske unije (EC No 1831/2003) o dodacima hrani za životinje fitobiotici su u Registru (European Union Register of Feed Additives), svrstani u drugu kategoriju dodataka, kao senzorni aditivi. U navedenoj regulativi senzorni aditivi su definisani kao supstance koje nakon dodavanja u hranu za životinje poboljšavaju ili menjaju njena organoleptička svojstva, ili vizuelne karakteristike namirnica animalnog porekla koje se koriste u ishrani ljudi. Senzorni aditivi su podeljeni u dve grupe (boje i arome). Arome su definisane kao supstance koje nakon dodavanja u hraniva/sirovine poboljšavaju njihov miris i ukusnost (palatabilitet). Pod pojmom aroma su obuhvćena prirodna ili njima odgovarajuća sintetska jedinjenja, kao i prirodni proizvodi biljnog porekla (esencijalna ulja, ekstrakti, tinkture i uljane smole).

EFSA (2009) navodi da fitobiotici, kao i svi drugi dodaci hrani za životinje biljnog porekla, pripadaju i podležu regulativi o senzornim aditivima-aromama. Agencija za bezbednost hrane i lekova (FDA, 2013) je veliki broj esencijalnih ulja, uljanih smola, kao i prirodnih ekstrakata označila kao supstance koje su generalno prihvaćene kao bezbedne za upotrebu (Substances generally recognized as safe-GRAS).



Na osnovu Pravilnika o kvalitetu hrane za životinje, (službeni glasnik RS broj 41/09, član 88) fitobiotici se svrstavaju u kategoriju stimulatora rasta.

Biljni ekstrakti predstavljaju jedan od najstarijih dodataka hrani poznatih čovečanstvu. Hiljadama godina lekovito bilje i začini su korišćeni kao arome, ali i kao supstance, koje zbog svojih antimikrobnih osobina, učestvuju u očuvanju hrane. Identifikacijom njihovih aktivnih principa koji predstavljaju nosioce navedenih efekata ali i pronalaženjem novih tehnoloških rešenja u proizvodnji (inkapsulacija) biljni ekstrakti dobijaju sve značajniju ulogu i kao dodaci u ishrani životinja.

U biljkama se tokom sekundarnog metabolizma odigravaju procesi katabolizma i/ili transformacije molekula šećera, aminokiselina ili masnih kiselina (rezultat primarnih metaboličkih procesa), pri čemu se nastala jedinjenja definišu kao sekundarni metaboliti. Navedena jedinjenja upotpunjuju funkcionisanje biljnog organizma u kome nastaju tako što sprečavaju infekcije tkiva bakterijama, gljivama ili virusima (fitoaleksinska funkcija), štite biljku od prekomerne doze ultraljubičastog zračenja, prekomerne transpiracije i brojnih drugih nepovoljnih ekoloških faktora (Kovačević, 2004). Veruje se da je većina od 100.000 poznatih sekundarnih metabolita uključena upravo u sisteme hemijske odbrane biljaka i smatra se da nastaju kao odgovor biljaka na interakcije sa predatorima tokom miliona godina evolucije. Određeni broj sekundarnih metabolita ispoljava i farmakološke aktivnosti.

U osnovne grupe sekundarnih metabolita spadaju alkaloidi, heterozidi, saponozidi, tanini i terpenoidi. U okviru terpenoida, isparljivi mono i seskviterpeni čine osnovu esencijalnih ulja, dok su najčešće u manjim količinama, zastupljeni i aromatični, fenilpropanski sastojci. Van de Braak i sar. (1999) navode da je poznato preko 3.000 vrsta esencijalnih ulja (EO), od kojih su 300 komercijalno važni i koriste se u industriji kao aromatične materije.

Esencijalna ulja ili aromatične biljne esencije (EO) predstavljaju isparljive i mirisne supstance, uljane konzistencije, proizvedene od strane biljaka. Ona su uglavnom tečne konzistencije i različite boje u rasponu od blede žute do smaragdno zelene, odnosno plave do tamno braon ili crvene (Balz, 1999). Esencijalna ulja se sintetišu u većini biljnih organa, a deponuju se u sekretornim ćelijama, šupljinama, kanalima, epidermalnim ćelijama ili žlezdanim dlačicama (Bakkali i sar., 2008). Različiti delovi

biljaka, u kojima su smeštena esencijalna ulja su obično prijatnog mirisa (Lis - Balchin, 1997).

U upotrebi je nekoliko tehnika za izdvajanje EO iz različitih delova aromatičnih biljaka, od kojih se najčešće koriste destilacija vodom ili parom, ekstrakcija rastvaračima pod pritiskom, kao i super i subkritična ekstrakcija vodom. Destilacija, kao metod za izdvajanje EO je poznata više od 2000 godina i korišćena je u Egiptu, Indiji i Persiji, dok je prvi pisani dokument o njihovom dobijanju u XIII veku izneo katalonski fizičar Valanova (Bakkali i sar., 2008).

Paracelsus von Hohenheim je upotrebio prvi put termin " Esencijalno ulje " u XVI veku, koji se odnosio na efikasnu komponentu leka kao " *Quinta essentia* " (Guenther, 1948). Prva referenca o upotrebi EO u terapijske svrhe je pronađena u Eberovim papirusima (1550. godine p.n.e.), gde je detaljno navedeno više od 800 lekova i tretmana na bazi EO. Zbog svoje sposobnosti da inhibira rast bakterija, mirisna smola, često pomešana sa medom i drugim biljkama, je predstavljala najvažniji sastojak. Prvi eksperiment o baktericidnim svojstvima EO je sproveden od strane De la Croix 1881 (Boyle, 1955). Međutim, tokom vremena upotreba EO u veterinarskoj i humanoj medicini se postepeno smanjivala, dok je njihova upotreba kao aromatičnih materija povećavana (Burt, 2004).

Esencijalna ulja se sastoje od velikog broja (20-60) pojedinačnih komponenti, zastupljenih u različitim koncentracijama, pri čemu dominantne (2-3 komponente) predstavljaju i do 85% EO. Glavne komponente (aktivni principi) određuju biološka/antibakterijska svojstva esencijalnih ulja, ali i prisustvo ostalih manje zastupljenih komponenata ima udela u ispoljavanju navedenih aktivnosti (Bakkali i sar., 2008; Burt, 2004). Sastav EO u biljkama nije konstantan, s obzirom na to da postoje razlike između geografskih regiona ili vremenu ubiranja biljaka (Cosentino i sar., 1999; Marino i sar., 1999; Juliano i sar., 2000; Faleiro i sar., 2002). Podaci (McGimpsey i sar., 1994; Marino i sar., 1999) ukazuju da EO dobijena nakon ubiranja biljaka leti, neposredno nakon cvetanja imaju snažnije antimikrobno dejstvo, dok Delaquis i sar. (2002) navode značajan uticaj dela biljke iz kojeg se EO ekstrahuju. Može se zaključiti da ista biljna vrsta može proizvesti slično esencijalno ulje, međutim, sa različitim hemijskim sastavom, što dovodi do razlika u terapijskoj aktivnosti.

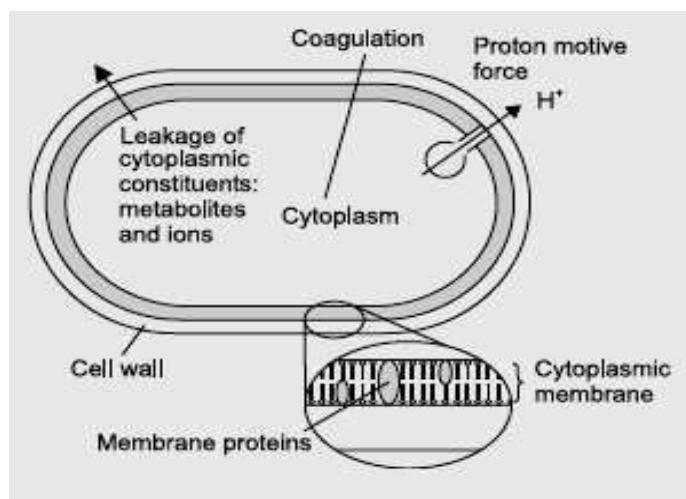
Brojni autori su u prošlosti isptivali antimikrobna svojstva esencijalnih ulja ali su tek tokom poslednjih decenija identifikovani aktivni principi, kao i odnosi između njihove antimikrobne aktivnosti, procentualne zastupljenosti, hemijske strukture, funkcionalnih grupa i konfiguracije (Dorman i Deans, 2000). Esencijalna ulja koja sadrže, kao glavne komponente, aldehide ili fenole (cinamaldehyd, citral, karvakrol, timol, eugenol) pokazuju najveću antibakterijsku aktivnost, dok EO koja sadrže terpeneske alkohole poseduju nešto manju aktivnost. Ostala EO, koja sadrže ketone ili estre, kao što su  $\beta$ -mircen,  $\alpha$ -tujon ili geranil acetat, ispoljavaju znatno slabiju aktivnost, dok su ulja sa terpenskim ugljovodonicima obično neaktivna (Dormans i Deans, 2000; Inouye i sar., 2001; Ait-Ouazzou i sar., 2011). Friedman i sar., (2002) su ispitivali antimikrobno dejstvo 96 esencijalnih ulja i njihova 23 konstituenta i utvrdili da su cinamaldehyd, timol, karvakrol i eugenol ispoljili najsnažniju antibakterijsku aktivnost prema sojevima *E. coli*, *Salmonella enterica* i *L. monocitogenes*.

U ispoljavanju antibakterijske aktivnosti esencijalnih ulja Shapiro i Guggenheim (1998a, b) su utvrdili značajnu ulogu veličine i oblika molekula, kao i rastvorljivosti u vodi. Juliani i sar. (2009) su ukazali na značaj hemijske strukture esencijalnih ulja i utvrdili da je antimikrobna aktivnost eugenola veća u odnosu na aktivnost metil-eugenola. Fenoli koji sadrže izopropil grupu u para-položaju, kao što su karvakrol i timol, generalno ispoljavaju snažnu antimikrobnu aktivnost. Pozicije određenih grupa u okviru iste familije jedinjenja su takođe važne i doprinose razlikama u antimikrobnoj aktivnosti. Između ispitivanih izomera 2-terc-butil-4-metil-fenol, 2-terc-butil-5-metil-fenol, kao i 2-terc-butil-6-metil-fenol, samo prva dva izomera koja imaju metil grupu na meta- ili para-poziciji benzenovog prstena ispoljavaju antibakterijsku aktivnost. Strukturne karakteristike, poput prisustva aromatičnog prstena (timol i karvakrol), hidroksilne grupe (timol, karvakrol i eugenol) ili " velikih " grupa kao što su terc-butil ili izopropil menjaju polaritet i topografiju molekula i posledično menjaju afinitet vezivanja aktivnih principa EO za bakterije.

Budući da su esencijalna ulja sastavljena od velikog broja sastojaka, pretpostavlja se da njihova antimikrobna aktivnost nije vezana za specifičan mehanizam delovanja već je usmerena ka nekoliko različitih ciljeva u mikrobnjoj ćeliji (Skandamis i sar., 2001; Carson i sar., 2002). Načini delovanja EO su degradacija ćelijskog zida,

oštećenje citoplazmatske membrane, oštećenje membranskih proteina, gubitak sadržaja ćelije, koagulacija citoplazme i iscrpljivanje protonskog gradijenta (Burt, 2004).

Iako antimikrobna svojstva esencijalnih ulja i njihovih aktivnih principa predstavljaju predmet istraživanja brojnih autora, precizni mehanizmi dejstva još uvek nisu u potpunosti proučeni (Lambert i sar., 2001).



**Šema 5.** Lokacije i mehanizmi delovanja EO u bakterijskoj ćeliji (izvor: Burt, 2004).

Većina autora smatra da EO ostvaruju antibakterijsko dejstvo putem dva različita mehanizma: prvi je u vezi sa njihovom hidrofobnošću koja im omogućava da se utisnu u fosfolipidni dvosloj ćelijske membrane, dok se drugi odnosi na inhibiciju bakterijskih enzima i receptora putem vezivanja na specifičnim mestima. Zahvaljujući hidrofobnoj strukturi, EO su u stanju da destabilizuju i promene permeabilnost bakterijske membrane (Knobloch i sar., 1989.; Sikkema i sar., 1994; Oosterhaven i sar., 1995; Ultee i sar., 2000, 2002). Navedene promene dovode do izlaska jona iz unutrašnjosti ćelije u spoljašnju sredinu (Oosterhaven i sar., 1995; Gustafson i sar., 1998; Helander i sar., 1998; Cox i sar., 2000; Lambert i sar., 2001), kao i do promene protonskog gradijenta i pražnjenja intracelularnih rezervi ATP-a (Ultee i sar., 1999; Sikkema i sar., 1995; Davidson, 1997). Izlazak jona je obično povezan sa izlaskom i drugih citoplazmatskih konstituenata, što bakterijska ćelija do određenog momenta može tolerisati bez gubitka vitalnosti, ali ako je navedeni izlazak povećan dolazi do smrti ćelije. Ultee i sar. (2002), objašnjavajući opisani mehanizam dejstva EO, navode primer karvakrola kao transmembranskog nosača monovalentnih katjona. Karvakrol u

nedisosovanom stanju prolazi kroz citoplazmatsku membranu i disosuje, otpuštajući proton u citoplazmu, nakon čega, kao nedisosovani molekul, vezuje jon kalijuma ili bilo koji drugi katjon i ponovo se vraća natrag kroz citoplazmatsku membranu ka spoljašnjoj sredini.

Knobloch i sar. (1989) ističu mogućnost dejstva EO na proteine vezane za citoplazmatsku membranu putem ometanja odnosa lipid-protein ili direktnog vezivanja za hidrofobni deo proteina (Juven i sar., 1994; Sikkema i sar., 1995). Juven i sar. (1994) su ukazali na značaj pH vrednosti sredine na sposobnost vezivanja EO za proteine. Ispitujući inhibitornu aktivnost timola na rast *S. typhimurium* i *S. aureus*, navedeni autori su dokazali da je pri nižoj pH vrednosti (pH 5,5) timol manje disosovan, a iz tog razloga hidrofobniji što utiče na bolje vezivanje za hidrofobne delove proteina, kao i bolju rastvorljivost u lipidnoj fazi. Conner i Beuchat (1984) navode da EO mogu delovati i na ćelijske enzime koji regulišu sintezu strukturnih delova ili učestvuju u regulaciji energetske procesa. Navedena zapažanja su potvrdili Gill i Holley (2006) dokazavši inhibitorni uticaj karvakrola na aktivnost ATP-aze u ćelijama *E.coli* i *Listeria monocytogenes*.

Mogućnost prolaska određene supstance kroz ćelijsku membranu zavisi od njene hidrofobnosti, kao i sastava same membrane (Sikkema i sar., 1995). Lambert i sar. (2001) navode da je odbijanje ili mogućnost prijanjanja i prolaska esencijalnih ulja kroz ćelijsku membranu od ključnog značaja u određivanju njihove efikasnosti protiv različitih bakterija, posebno kada se ispituju bakterije sa različitim bojenjem po Gramu. Većina autora je saglasna da je antibakterijska aktivnost EO izraženija prema Gram-pozitivnim nego Gram-negativnim bakterijama zbog prisustva spoljašnje membrane koja okružuje ćelijski zid Gram-negativnih bakterija i ograničava difuziju hidrofobnih jedinjenja kroz prisutne lipopolisaharide. Najotporniju Gram-negativnu bakteriju na dejstvo EO predstavlja *Pseudomonas aeruginosa* (Burt, 2004). Za razliku od mnogih antibiotika, hidrofobni sastojci esencijalnih ulja su sposobni da pristupe i periplazmi Gram-negativnih bakterija putem porina, proteina spoljašnje membrane (Helander i sar., 1998), zbog čega *Aeromonas Hydrophila* (Gram-negativna) predstavlja najosetljiviju bakterijsku vrstu (Burt, 2004).

Si i sar. (2006) su dokazali da *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus* i *Bifidobacterium spp.* pokazuju manju osetljivost na dejstvo karvakrola,

timola i eugenola u poređenju sa patogenim bakterijama (*E.coli* i *S. typhimurium*). Do sličnih rezultata su došli Lee i Ahn (1998), kao i Manzanila (2005), koji je u ogledu na prasadima dokazao pozitivan uticaj biljnih ekstrakata (karvakrol i cinamaldehyd) na broj i odnos laktobacila i enterobakterija u jejunumu. Dobijeni rezultati ukazuju na mogućnost upotrebe esencijalnih ulja u održavanju poželjne crevne flore, odnosno eubioze.

Pored dokazanog antibakterijskog dejstava, biljni ekstrakti ispoljavaju kokcidiostatske, antihelmintričke i antivirusne efekte. Brojna istraživanja su ukazala na njihov antikancerogeni i izražen antioksidativni efekat (Bakkali i sar., 2008; Wenk., 2003; Windisch i sar., 2008).

Biljni ekstrakti putem specifične arome pozitivno deluju na lučenje digestivnih sokova (Platel i Srinivasan, 2000; Wenk, 2003) i vreme pasaže crevnog digesta (Manzanila i sar., 2004). Upotrebom fitobiotika ostvaruje se stimulatívni uticaj na endokrini sistem i utiče na intermedijarni metabolizam hranljivih materija (Wenk, 2003).

#### **2.2.4.1 Efekti upotrebe fitobiotika kao stimulatora rasta u ishrani prasadi**

Kommerer i sar. (2006), upotrebom 0,1% fitobiotika u hrani za prasad (esencijalna ulja anisa, citrusa i origana), nisu utvrdili razlike tokom petonedeljnog perioda ishrane u prosečnom dnevnom unosu hrane i dnevnom prirastu u odnosu na kontrolnu grupu. Dodavanje fitobiotika je rezultiralo značajnim ( $p < 0,05$ ) smanjenjem konverzije hrane na kraju druge faze ogleda (14-28. dan), dok je navedeni efekat izostao tokom ostalih faza. Korišćenjem skale po Quigley (2004) za definisanje konzistencije fecesa (1. vodenast, 2. normalan i 3. čvrsti feces) utvrđena je vrednost od 1,76 za kontrolnu i 1,80 za grupu koja je putem hrane dobijala fitobiotik, s tim da razlike nisu bile statistički značajne. Navedeni autori, u drugom eksperimentu, koristeći istovremeno fitobiotik i organske kiseline (Biotronic) nisu utvrdili razlike u proizvodnim rezultatima i pojavi dijareje u odnosu na kontrolnu grupu prasadi.

Upotrebom fitobiotika (esencijalna ulja iz grčkog semena, karanfilića i cimeta) u ishrani ranoodbijene prasadi, Cho i sar. (2006) zabeležili su povećanje ( $p < 0,05$ ) prosečnog dnevnog unosa hrane, kao i dnevnog prirasta i svarljivosti suve materije u

odnosu na kontrolnu grupu. Konverzija hrane nije bila pod uticajem tretmana. Upotrebom fitobiotika nisu uočene značajne razlike u konzistenciji fecesa u odnosu na kontrolnu grupu, što je objašnjeno dobrim zoohigijenskim uslovima u odgajalištu. Rezultati koji su se odnosili na broj eritrocita, limfocita, kao i količinu ukupnih proteina i albumina nisu se statistički razlikovali među grupama.

U ogledu koji su sproveli Halas i sar. (2011), upotrebom fitobiotika u ishrani prasadi (esencijalna ulja poreklom iz origana, karanfilića i cimeta) nije utvrđena razlika u prosečnom dnevnom unosu hrane, dnevnom prirastu, kao i konverziji u odnosu na kontrolnu grupu. Navedene rezultate autori objašnjavaju visokim standardom ekoloških uslova i opšte higijene smeštaja tokom ogleada, navodeći da je efekat fitobiotika kao stimulatora rasta neznatan kada su ispunjene performanse životinja već blizu maksimalnog genetskog potencijala. Na osnovu imunoloških ispitivanja (LST-lymphocyte stimulation assays) autori su dokazali poboljšanje nespecifičnog imunog odgovora pri upotrebi fitobiotika.

Namkung i sar. (2004) su, nakon tronedeljne primene fitobiotika u ishrani prasadi, dokazali negativan uticaj na prosečan dnevni unos hrane i dnevni prirast koji je bio značajno ( $p < 0,05$ ) niži u odnosu na kontrolnu grupu prasadi. Autori su navedene efekte objasnili izraženim mirisom korišćenog preparata, koji je negativno uticao na konzumaciju hrane. Sa druge strane, upotreba fitobiotika rezultirala je značajnim ( $p < 0,05$ ) smanjenjem broja koliformnih bakterija u fecesu. Dužina crevnih resica, dubina kripte u dvanaestopalačnom crevu, kao i pH vrednost fecesa i ilealnog digesta nisu bili pod uticajem tretmana.

U ogledu koji su izveli Maenner i sar. (2011), sa 2 različita komercijalna fitogena proizvoda (EOM-M na bazi mentola i EOM-C na bazi cinamaldehida), nije zabeležen uticaj primenjenih tretmana na prosečan dnevni unos hrane i dnevni prirast prasadi. U grupi prasadi koja je putem hrane dobijala EOM-M značajno ( $p < 0,05$ ) je poboljšana konverzija hrane, kao i svarljivost proteina i većine aminokiselina. Mortalitet životinja, pojava proliva, kao i ispitivana gastrointestinalna mikrobiota (*Lactobacillus* spp., *Enterococcus* spp., *Clostridium coccooides*, *Clostridium leptum* i *Escherichia coli*) nisu bili pod uticajem korišćenih preparata.

Upotrebom različitih doza (0, 0,40 i 0,80 g/kg TM) biljnog preparata (biljke iz tradicionalne korejanske medicine), kao i tri različita nivoa proteina (17,30, 17,90 i

18,50%) u ishrani prasadi, Park i sar. (2000) su utvrdili najveći prosečan unos hrane, kao i najveći dnevni prirast u grupi koja je putem hrane dobijala najveću količinu proteina i preparata. Najniža konverzija ostvarena je pri upotrebi hrane sa najvećom količinom proteina i umerenom količinom (0,40 g/kg TM) biljnog preparata.

Li i sar. (2012) su, koristeći različite količine (50, 100 i 150 g /t hrane) fitobiotika Enviva EO 101 (timol i cinamaldehyd, utvrdili značajno ( $p < 0,05$ ) povećanje prosečnog dnevnog unosa hrane i prirasta, nezavisno od upotrebljene doze preparata, dok je konverzija hrane značajno povećana ( $p < 0,05$ ) samo pri upotrebi najveće doze (150 g/tona hrane) preparata. Pojava proliva je značajno ( $p < 0,05$ ) smanjena u odnosu na kontrolnu grupu, nezavisno od upotrebljene doze. Dodavanje fitobiotika rezultiralo je značajnim ( $p < 0,05$ ) povećanjem broja laktobacila, kao i smanjenjem broja *E.coli* u fecesu. Ispitivanjem imunoloških parametara utvrđeno je značajno ( $p < 0,05$ ) povećanje nivoa IgA i IgM, kao i albumina u krvnom serumu tretiranih prasadi.

Pengfei i sar. (2012) upotrebom 0,01% fitobiotika u ishrani prasadi (timol i cinamaldehyd) nisu utvrdili razlike u proizvodnim rezultatima tokom prve faze ogleada (0-7. dan), s tim da je tokom druge faze (7-35. dan) značajno ( $p < 0,05$ ) povećan prosečan dnevni prirast u odnosu na kontrolnu grupu. Prosečan dnevni unos hrane, kao i konverzija nisu bili pod uticajem tretmana tokom ogleada. Korišćenje fitobiotika rezultiralo je značajnim povećanjem ( $p < 0,05$ ) svarljivosti suve materije i proteina. Dužina crevnih resica, kao i dubina kripte u duodenumu, jejunumu i ileumu nisu promenjeni upotrebom fitobiotika. Broj *E.coli* je značajno ( $p < 0,05$ ) smanjen u cekumu, kolonu i rektumu, kao i pojava dijareje kod prasadi koja su putem hrane dobijala fitobiotik.

U svom ogledu, Zhou i sar. (2007) su utvrdili najniže koncentracije (200, 400 i 400 mg/L) cinamaldehyda, timola i karvakrola, čijom pojedinačnom upotrebom je ostvaren značajan inhibitorski efekat na rast *Salmonella typhimurium*. Prilikom istovremene upotrebe navedenih aktivnih principa, (cinamaldehyd/timol, cinamaldehyd/karvakrol i timol/karvakrol) autori su dokazali sinergistički efekat u odnosu na pojedinačnu upotrebu. Korišćenjem cinamaldehyda omogućeno je snižavanje navedenih koncentracija timola i karvakrola na nivo od 100 mg/kg.

Michiels i sar. (2009) su tokom *in vitro* eksperimenta, simulirajući uslove koji vladaju u različitim delovima gastrointestinalnog trakta prasadi, dokazali jasan



selektivni antibakterijski efekat cinamaldehida na crevnu mikrobiotu jejunuma. Upotreba cinamaldehida je rezultirala značajnim smanjenjem broja koliforma u jejunumu, dok je uticaj na broj laktobacila bio neznatan. Upotrebom karvakrola i timola nije zabeležen selektivan antibakterijski efekat i značajno je smanjen broj koliforma, kao i laktobacila u jejunumu.

Odnos između laktobacila i enterobakterija se tradicionalno smatra odnosom poželjnih ili nepoželjnih bakterija kod svinja, pri čemu se povećanje odnosa vezuje za veću rezistenciju prema crevnim poremećajima (Ewing i Cole, 1994). Castillo (2006) je u svom ogledu dokazao da ukupan broj mikroorganizama u ispitivanim delovima gastrointestinalnog trakta prasadi (jejunum, cekum i kolon) nije bio pod uticajem fitobiotika (karvakrol i cinamaldehyd), s tim da je u cekumu utvrđeno povećanje broja laktobacila u odnosu na broj enterobakterija, dok je u jejunumu navedeni efekat izostao.

Na Fakultetu Veterinarske medicine Univerziteta u Bolonji, Grilli (2007) je upotrebom mikroinkapsuliranog timola u ishrani prasadi, tokom 42 dana ogleda, zabeležio značajno ( $p < 0,05$ ) povećanje unosa hrane tokom svih posmatranih faza ogleda (0-21., 21-42. i 0-42. dana). Dodavanje timola nije uticalo na ostvaren prosečan dnevni prirast i konverziju hrane. Tokom ogleda nije utvrđena razlika u dužini resica, dubini kripti, kao i crevnoj mikrobioti u ispitivanim delovima jejunuma, cekuma i kolonona u odnosu na kontrolnu grupu prasadi.

U ogledu Michiels i sar. (2012) uključivanjem uobičajene količine timola (125 i 500 mg/kg hrane) u obrok za odbijenu prasadi nisu utvrdili razliku u prosečnom dnevnom unosu i palatabilitetu hrane, dok je upotrebom veće količine (2000 mg/kg hrane), gotovo u potpunosti, prestao unos hrane. Korišćenjem dva dodatka, kao korigensa ukusa (zaslađivač, sa ili bez arome karamele) delimično je ublažen negativan efekat dodavanja velike količine timola. Upotrebom dodatka bez arome karamele prihvatljivost hrane je bila veća, dok je, u drugom eksperimentu, upotrebom kamfora kao korigensa ukusa navedeni efekat izostao.

Schone i sar. (2006), ispitujući efekte esencijalnih ulja dobijenih iz semena morača (*Foeniculi Aetheroleum*) i kima (*Carvi Aetheroleum*) u ishrani prasadi, utvrdili su negativan efekat tretmana na konzumaciju hrane, što je rezultiralo nižim prirastom (10%) u odnosu na kontrolnu grupu.

U svom ogledu Janz i sar. (2007) su upotrebom 0,05% esencijalnih ulja ili uljanih smola (poreklom od ruzmarina, belog luka, origana ili đumbira) u tovu svinja utvrdili najbolje proizvodne rezultate (najveći ukupan unos hrane, kao i prosečan dnevni prirast) pri upotrebi esencijalnog ulja poreklom iz luka. Konverzija hrane nije bila pod uticajem navedenih dodataka.

### 3. CILJ I ZADATAK RADA

U cilju izučavanja postavljenog radnog zadatka, ispitivanja su bila usmerena na to da se omogući detaljniji uvid u zdravstveno stanje i proizvodne rezultate prasadi hranjenih smešama sa različitim stimulatorima rasta. Radni zadatak je zahtevao proučavanje sledećih pitanja:

- da se utvrde efekti korišćenja alternativnih stimulatora rasta na proizvodne rezultate,
- da se ispita mikrobiota pojedinih segmenata digestivnog trakta i utvrdi uticaj korišćenih stimulatora rasta,
- da se ispita elektrohemijska reakcija pojedinih segmenata digestivnog trakta i utvrdi uticaj korišćenih stimulatora rasta,
- da se histološkom analizom ispita eventualni uticaj korišćenih stimulatora rasta na morfološke karakteristike pojedinih segmenata digestivnog trakta,
- da se ispita da li, i u kom odnosu stoje proizvodni rezultati sa rezultatima morfoloških i mikrobioloških ispitivanja i
- da se ispitaju mogućnost i opravdanost upotrebe alternativnih stimulatora rasta.

Da bi se dobili naučno validni rezultati, primenljivi u praksi, organizovan je ogled ishrane prasadi po grupno-kontrolnom sistemu, a efekti su ispitivani u zavisnosti od vrste pojedinih stimulatora rasta u smešama. Pri tome su praćeni i obrađeni sledeći parametri:

1. Zdravstveno stanje i mortalitet;
2. Proizvodni rezultati:
  - a. prirast (ukupni i dnevni)
  - b. konzumacija hrane (ukupna i dnevna)
  - c. konverzija hrane

3. Elektrohemijska reakcija tankog creva (jejunum) i debelog creva (cekum);
  
4. Bakterijska flora tankog creva (jejunum) i debelog creva (cekum):
  - a. Prosečan ukupan broj bakterija
  - b. Identifikacija vrste bakterija
  
5. Histološke karakteristike tankog creva (jejunum) i debelog creva (cekum):
  - a. Dužina resica
  - b. Širina resica
  - c. Dubina kripti

Svi dobijeni rezultati i podaci su obrađeni i statistički analizirani u cilju izvođenja relevantnih zaključaka, a prikazani su u vidu tabela, grafikona i slika.

## 4. MATERIJAL I METOD RADA

Ispitivanje uticaja korišćenja različitih stimulatora rasta u ishrani prasadi na zdravstveno stanje, proizvodne rezultate, mikrobiološke i morfološke karakteristike creva izvršeno je ogledom ishrane, a radi bolje preglednosti materija je podeljena na podpoglavlja. Prilikom postavljanja plana oglada i izbora metoda uzeti su u obzir cilj i zadaci rada, kao i poznati podaci iz literature o primeni različitih stimulatora rasta.

### 4.1. Izbor materijala

U cilju ispitivanja uticaja različitih stimulatora rasta u ishrani prasadi na proizvodne rezultate i zdravstveno stanje organizovan je ogled po grupno-kontrolnom sistemu na farmi registrovanog gazdinstva u Malim Radincima u trajanju od 40 dana. Za ogled je korišćeno 48 prasadi, melezi švedskog landrasa i pietrena, odbijenih od krmače u starosti od 35 dana. Ispitivanja su izvedena na prasadima oba pola, prosečne telesne mase  $8,61 \pm 1,59$  kg koja su odmah nakon odbijanja raspoređena u jedan od četiri hranidbena tretmana.

### 4.2. Držanje i hranjenje prasadi

U toku oglada korišćena je tehnologija držanja i ishrane prasadi koja je uobičajena na farmi u redovnoj proizvodnji uz minimalne modifikacije koje je zahtevalo izvođenje oglada. Postupak sa prasadima tokom oglada u pogledu primene preventivnih mera, smeštaja, nege i načina hranjenja i pojenja bio je prilagođen podnom načinu uzgoja. Pre postavljanja oglada izvršena je priprema prostorije u kojoj će ogled biti izveden. Po obavljenom mehaničkom čišćenju i sanitarnom pranju, izvršena je dezinfekcija opreme i poda biodegradibilnim sredstvom sa širokim spektrom dejstva. Hranilice su punjene ručno tako da u svakoj od njih bude dovoljno hrane, a pojilice su bile automatske. Hranjenje i napajanje je bilo po volji (*ad libitum*). U toku oglada

zoo higijenski i mikroklimatski uslovi su u potpunosti odgovarali tehnološkim normativima za ovu kategoriju prasadi.

### **4.3. Formiranje ogleda**

Prilikom formiranja ogleda izvršen je pojedinačan klinički pregled prasadi tako da su sve odabrane jedinke bile zdrave, vitalne i u dobroj kondiciji. Prilikom formiranja grupa, prasadi su bila ujednačena u odnosu na roditeljsko poreklo, telesnu masu, pol i doba života. Pre početka ogleda izvršene su uobičajene preventivne mere zaštite, a tokom ogleda svakodnevno je praćeno zdravstveno stanje oglednih jedinki.

Ogled je izveden na ukupno 48 prasadi podeljenih u grupe po 12 jedinki sa jednakim odnosom polova. Ogled je trajao 40 dana, a podeljen je u dve faze od po 20 dana. Tokom ogleda praćeni su proizvodni rezultati i zdravstveno stanje prasadi. Na početku i kraju svake faze ogleda izvršeno je merenje telesne mase životinja, utrošak hrane kao i uzimanje uzoraka potpunih smeša za analizu, a iz dobijenih podataka vršeno je izračunavanje ostalih proizvodnih rezultata. Na kraju druge faze ogleda izvršeno je planirano žrtvovanje po 6 jedinki iz svake grupe, a prilikom žrtvovanja uzeti su uzorci creva i crevnog sadržaja za fizičko-hemijska, mikrobiološka i histološka ispitivanja.

### **4.4. Ishrana prasadi**

Sve eksperimentalne grupe su tokom ogleda hranjene smešama koje su odgovarale dobu života prasadi. Smeše za ishranu prasadi su bile formulisane u skladu sa preporukama NRC (1998), kao i AEC (1993) i u potpunosti su odgovarale njihovim nutritivnim zahtevima. Prasad su po zalučanju hranjena potpunom smešom za odbijenu prasadi do 15 kg, a zatim smešom za porast do 25 kg. Smeše za kontrolnu grupu prasadi bile su standardnog sirovinskog sastava (tabela 3 i 4).

Osnovni zadatak ispitivanja bio je da se utvrdi uticaj ishrane prasadi smešama sa različitim stimulatorima rasta na proizvodne rezultate i zdravstveno stanje, kao i opravdanost korišćenja pojedinih stimulatora rasta u ishrani prasadi. Zbog toga su u

smešama izvršene minimalne korekcije kako bi se postigao željeni cilj (tabela 5). Kontrolna grupa prasadi hranjena je smešom bez stimulatora rasta, dok su ogleadne grupe, po redosledu, dobijale hranu sa dodatkom probiotika (Bioplus 2B), prebiotika (Technomos) ili fitobiotika (Enviva EO101) u količinama koje su preporučene od strane proizvođača.

**Tabela 3.** Sirovinski sastav smeša za ishranu prasadi do TM 15 kg (%)

Hraniva	u % s m e š e			
	K	O-I	O-II	O-III
<b>Kukuruz</b>	53	53	53	53
<b>Sojina sačma</b>	18	18	18	18
<b>Ekstrudirani sojin griz</b>	19	19	19	19
<b>Premiks</b>	10	10	10	10
<b>Stimulator rasta</b>	-	+	+	+

**Tabela 4.** Sirovinski sastav smeša za ishranu prasadi od 15-25 kg, (%)

Hraniva	u % s m e š e			
	K	O-I	O-II	O-III
<b>Kukuruz</b>	60	60	60	60
<b>Sojina sačma</b>	15	15	15	15
<b>Ekstrudirani sojin griz</b>	15	15	15	15
<b>Premiks</b>	10	10	10	10
<b>Stimulator rasta</b>	-	+	+	+

**Bioplus 2B** (Biochem) je komercijalni preparat korišćen u ogledu kao izvor probiotskih kultura u kome su aktivni sastojci u jednakom odnosu sprejno osušeni sojevi sporoformnih bakterija *Bacillus licheniformis* DSM 5749 i *Bacillus subtilis* DSM 5750 u minimalnoj koncentraciji od  $3,2 \times 10^9$  CFU/g.

**Technomos** (Biochem) je komercijalni preparat korišćen u ogledu kao prebiotik i predstavlja ekstrakt koji se dobija iz ćelijskog zida pekarskog kvasca *Saccharomyces cerevisiae* i odlikuje se visokim sadržajem manan-oligosaharida (19,3%) i  $\beta$  1-3 glukana (20,6%)

**Enviva EO 101** (Danisco Animal Nutrition) je komercijalni preparat korišćen u ogledu kao fitobiotik i sadrži aktivne principe (cinamaldehyd i timol) u količini 18g/100g preparata, inkapsulirane u maltodekstrinski matriks.

**Tabela 5.** Sadržaj pojedinih stimulatora rasta u smešama, (kg/t)

Stimulator rasta	G r u p a			
	K	O-I	O-II	O-III
<b>Bioplus 2B</b>	-	0.4	-	-
<b>Technomos</b>	-	-	1.50	
<b>Enviva EO 101</b>	-	-	-	0.1

#### 4.5. Metode hemijske analize hrane

Uzorci hrane za predviđena ispitivanja uzeti su na početku ogleda. Za uzorkovanje i pripremu hrane za životinje primenjivani su uobičajeni postupci (Pravilnik o metodama uzimanja uzoraka i metodama fizičkih, hemijskih i mikrobioloških analiza stočne hrane, 1987), a hemijski sastav smeša utvrđen je pomoću Weende postupka - fizičko-hemijska metoda kojom je obuhvaćeno određivanje sadržaja:

- Vode - određivanjem gubitka mase pri sušenju homogenizovanog uzorka pri  $105 \pm 1$  °C do konstantne mase (SRPS ISO 6496/2001)
- Masti - metodom po Soxhletu, ekstrakcijom masti iz osušenog uzorka petrol etrom, destilacijom i sušenjem pri  $105 \pm 1$  °C do konstantne mase (SRPS ISO 6492/2001)
- Proteina - metodom po Kjeldahl-u primenom uređaja firme Tecator" (SRPS ISO 5983/2001)
- Pepela - sagorevanjem uzorka pri 550 °C do konstantne mase (SRPS ISO 5984/2002)



- Određivanje sadržaja celuloze-metoda sa međufiltracijom (SRPS ISO 6865/2004)
- Određivanje sadržaja bezazotnih ekstraktivnih materija (BEM)  
Sadržaj bezazotnih ekstraktivnih materija (BEM) određen je računski prema formuli:  $BEM = 100 - (\% \text{ vlage} + \% \text{ pepela} + \% \text{ celuloze} + \% \text{ sirovi proteini} + \% \text{ sirova mast})$  i izražena u procentima (Sinovec i Ševković, 2008).

#### 4.6. Zdravstveno stanje

Pored preventivnog programa zaštite, sve ogledne jedinke su se nalazile pod stalnom veterinarsko-medicinskom kontrolom, a sve promene zdravstvenog stanja su praćene i beležene. Svakodnevna opservacija vršena je pojedinačnom i grupnom adspekcijom, a u slučaju uginuća vršen je detaljniji patoanatomski pregled. Broj uginule prasadi i njihove telesne mase evidentirane su po danima uginuća za svaku grupu posebno.

#### 4.7. Proizvodni rezultati

Kontrolna merenja eksperimentalnih prasadi izvršena su na tehničkoj vagi sa tačnošću od  $10^{-2}$  kg. Na osnovu rezultata merenja izračunavana je prosečna telesna masa, a iz razlika telesnih masa ukupan prirast, dok je dnevni prirast izračunavan na osnovu trajanja pojedinih faza, kao i samog oglada.

Tokom celog oglada tačno je merena količina potpunih smeša datih pojedinim grupama. Na kraju svake faze i oglada u celini, na osnovu sabiranja dnevnih količina, utvrđen je utrošak hrane. Iz dobijenih podataka o konzumaciji i prirastu izračunavana je konverzija hrane i to posebno za svaku fazu, kao i za ceo ogled.

#### 4.8. Ispitivanje elektrohemijske reakcije himusa

Vrednost pH himusa merena je potenciometrijskim pH-metrom (pH METER 3310WTW, model PH 340) direktnim ubadanjem elektrode u lumen ispitivanih delova tankog i debelog creva (ISO 2917-1974).

#### 4.9. Mikrobiološka ispitivanja

Za bakteriološka ispitivanja uziman je sadržaj creva prasadi neposredno nakon izvršene sekcije. Utvrđivanje ukupnog broja bakterija urađeno je na podlozi za ukupan broj bakterija iz serije razređenja  $10^{-7}$ . Za izolaciju i identifikaciju vrsta korišćeni su Krvni agar, Brillijant zeleni agar, MacConkey agar, Kit-Tarozzi i Rogoza agar. Zasejane podloge, pojedinačno su prema vrsti namene, inkubirane u aerobnim, anaerobnim i mikroaerofilnim uslovima na temperaturi od  $37^{\circ}\text{C}$  tokom 24-72 sata. Na osnovu izgleda kolonija i kulturelnih osobina izvršena je subkultivacija na određene podloge u cilju dobijanja čistih bakterijskih kultura. Zatim je izvršeno ispitivanje morfoloških i biohemijskih karakteristika izolovanih bakterija (Quin i sar., 2011; Ašanin i sar., 2006). Prema spektru vrste bakterija koje identifikuje, kao potvrđan test korišten je BBL Crystal G/P, E/N kit i Anaerobe ID kit (Becton Dickinson). Za detekciju i identifikaciju *Brachyspira hyodysenteriae* iz sadržaja cekuma je korišćena metoda (PCR) reakcije lančane polimeraze (Herbst i sar., 2004).

#### 4.10. Histološka ispitivanja

Neposredno posle žrtvovanja životinja uzimani su delovi jejunuma i cekuma za histološka ispitivanja. Isečci su fiksirani u 10% neutralnom formalinu u trajanju od 48-72 sata, dehidrisani u seriji rastuće koncentracije alkohola, prosvetljeni u ksilolu, impregnisani parafinom i uklopljeni u parafinske blokove. Parafinski isečci, debljine  $5\mu\text{m}$ , bojani su standardnom hematoksilin-eozin (HE) metodom (Scheur i Chalk, 1986).

Morfometrijska ispitivanja dužine i širine resica, kao i dubine kripte izvršena su korišćenjem okularnog mikrometra 1:100 (Djolai i sar., 1998).

#### **4.11. Statistička obrada podataka**

U statističkoj analizi dobijenih rezultata izvedenog eksperimenta kao osnovne statističke metode korišćeni su deskriptivni statistički parametri. Za ispitivanje značajnosti razlika između posmatranih tretmana korišćen je grupni test, ANOVA, a zatim su pojedinačnim Tukey testom ispitane statistički značajne razlike između pojedinačnih tretmana. Svi testovi su korišćeni na nivou rizika od 5% i 1% pa su prema tome i zaključci dati sa odgovarajućom verovatnoćom (95 i 99%). Dobijeni i obrađeni rezultati prikazani su numerički u vidu tabela, a u cilju vizuelne komparacije eksperimentalno utvrđenih numeričkih vrednosti korišćeni su histogrami i slike. Statistička analiza dobijenih rezultata urađena je u MS Excel-u 2003 i statističkom paketu GraphPad Prism 5.00.

## 5. DOBIJENI REZULTATI

U narednom poglavlju prikazani su rezultati dobijeni hemijskim analizama kompletnih smeša za ishranu prasadi, proizvodni rezultati, rezultati dobijeni hemijskim i mikrobiološkim analizama pojedinih segmenata digestivnog trakta, kao i histološkim ispitivanjem tankog i debelog creva. Zbog bolje preglednosti rezultati su prikazani u vidu tabela, grafikona i slika za odgovarajuće ispitivane parametre.

### 5.1. Hemijski sastav smeša

Hemijski sastav potpunih smeša korišćenih za ishranu prasadi u ogledu prikazan je u tabelama 6 i 7. Iz prikazanih tabela se uočava da hemijski sastav potpunih smeša zadovoljava potrebe prasadi u odgoju, a istovremeno odgovara zahtevima koji su postavljeni prilikom formiranja ogleda.

**Tabela 6.** Hemijski sastav smeša za ishranu prasadi do 15 kg, [%].

Hemijski sastav	u % s m e š e			
	K	O-I	O-II	O-III
<b>Voda</b>	11,21	11,20	11,20	11,21
<b>Pepeo</b>	3,24	3,30	3,28	3,24
<b>Protein</b>	20,94	20,90	20,98	20,94
<b>Mast</b>	6,20	6,15	6,17	6,20
<b>Celuloza</b>	3,58	3,55	3,66	3,58
<b>BEM</b>	54,83	54,90	54,71	54,83
<b>Ca</b>	0,95	0,94	0,93	0,95
<b>P</b>	0,68	0,66	0,66	0,68
<b>ME, MJ/kg</b>	14,35	14,32	14,33	14,35
<b>Lizin*</b>	1,44	1,44	1,44	1,44
<b>Metionin+cistin*</b>	0,72	0,72	0,72	0,72
<b>Triptofan*</b>	0,31	0,31	0,31	0,31

\* Kalkulativno

**Tabela 7.** Hemijski sastav smeša za ishranu prasadi od 15 do 25 kg [%].

Hemijski sastav	u % s m e š e			
	K	O-I	O-II	O-III
Voda	11,50	11,42	11,45	11,50
Pepeo	2,92	2,94	2,96	2,92
Protein	18,66	18,60	18,50	18,66
Mast	5,73	5,70	5,65	5,73
Celuloza	3,43	3,40	3,50	3,43
BEM	57,76	57,94	57,94	57,76
Ca	0,90	0,89	0,89	0,90
P	0,66	0,64	0,65	0,66
ME, MJ/kg	14,21	14,18	14,15	14,21
Lizin*	1,27	1,27	1,27	1,27
Metionin+cistin*	0,64	0,64	0,64	0,64
Triptofan*	0,28	0,28	0,28	0,28

\* Kalkulativno

## 5.2. Zdravstveno stanje

Prasad svih eksperimentalnih grupa bila su skladne telesne građe, pravilno razvijenog koštanog i mišićnog tkiva, živahnog temperamenta i dobre kondicije. Koža i vidljive sluznice bile su uobičajenog izgleda. Appetit je bio dobar, a feces uobičajeno formiran. Sposobnost aktivnog kretanja i koordinacija pokreta bili su usklađeni, a mišićni tonus normalno izražen. Tokom oglada nije došlo do poremećaja zdravstvenog stanja i/ili ispoljavanja kliničkih znakova oboljenja.

### 5.3. Proizvodni rezultati

Kretanje telesne mase prasadi u ogledu po fazama prikazano je u tabeli 8. Iz tabele se vidi da su prasadi na početku ogleda imale odgovarajuću telesnu masu za doba života, a razlike u telesnoj masi između grupa nisu bile statistički značajne.

Telesna masa prasadi kontrolne grupe tokom svih posmatranih faza ogleda kretala se u okviru granica predviđenih tehnološkim normativima za ovu rasu i doba života. U odnosu na kontrolnu grupu, uočavaju se numeričke razlike u telesnoj masi prasadi oglednih grupa.

Na kraju prve faze ogleda, prasadi oglednih grupa hranjenih smešama koje su sadržavale dodat stimulator rasta postigla su slične telesne mase, s tim da su prasadi u svim oglednim grupama ostvarila numerički veću telesnu masu u poređenju sa kontrolnom grupom. U drugoj fazi ogleda nastavlja se trend zabeležen u prvoj fazi, s tim da su prasadi ogledne grupe O-I ostvarila najveću telesnu masu. Na kraju ogleda, u odnosu na kontrolnu grupu, telesna masa prasadi svih oglednih grupa bila je veća, s tim da je statistička analiza ukazala da utvrđene numeričke razlike nisu bile signifikantne ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 8.** Telesna masa\* prasadi tokom ogleda, [kg]

Dani ogleda	G r u p e			
	K	O-I	O-II	O-III
1.	8,53±2,20	8,54±1,51	8,55±1,34	8,82±1,40
20.	13,20±4,04	13,94±2,93	13,56±2,51	13,51±2,82
40.	25,32±6,31	27,98±4,76	27,23±4,44	27,19±4,77

\*Vrednost izražena kao  $\bar{X} \pm Sd$

Ostvaren prosečan dnevni prirast numerički je prikazan u tabeli 9. Dnevni prirast prasadi kontrolne grupe tokom svih perioda ogleda bio je u granicama predviđenim tehnološkim normativima za ovu rasu i doba života. Ostvaren prosečan dnevni prirast u prvoj fazi ogleda nije se značajnije razlikovao ( $p > 0,05$ ) između oglednih grupa hranjenih smešama koje su sadržavale neki od stimulatora rasta i kontrolne grupe, uz

napomenu da su numeričke razlike postojale za grupe O-I i O-II kako u međusobnom poređenju, tako i u odnosu na kontrolnu grupu i oglednu grupu O-III koje su ostvarile gotovo identičan prirast.

U drugoj fazi ogleda, prasid oglednih grupa hranjenih smešama koje su sadržavale neki od dodataka postigla su viši prirast u odnosu na prasid kontrolne grupe, ali razlike nisu bile signifikantne ( $p>0,05$ ). Ogledna grupa prasidi hranjena obrokom sa dodatim probiotikom postigla je nešto viši dnevni prirast u odnosu na kontrolnu grupu, kao i u odnosu na ogledne grupe O-II i O-III, koje su ostvarile gotovo identičan prirast, ali utvrđene numeričke razlike, sa stanovišta statističke analize nisu bile značajne.

**Tabela 9.** Prosečan dnevni prirast\* prasidi tokom ogleda, [kg]

Period ogleda	G r u p e			
	K	O-I	O-II	O-III
1-20.	0,23±0,15	0,27±0,10	0,25±0,12	0,23±0,09
20-40.	0,61±0,13	0,70±0,13	0,68±0,14	0,68±0,16
1-40.	0,42±0,12	0,49±0,09	0,47±0,10	0,46±0,09

\*Vrednost izražena kao  $\bar{X} \pm Sd$

Posmatrano za ceo ogled zbirno, prasid oglednih grupa hranjenih smešama koje su sadržavale neki od dodataka postigla su viši prirast u odnosu na prasid kontrolne grupe, ali razlike nisu bile signifikantne ( $p>0,05$ ). Ogledna grupa prasidi hranjena obrokom sa dodatkom probiotika postigla je najviši dnevni prirast u odnosu na sve ispitivane grupe, ali utvrđene numeričke razlike, sa stanovišta statističke analize nisu bile značajne.

Dnevna konzumacija hrane prikazana je u tabeli 10, i uočljivo je da je kontrolna grupa prasidi konzumirala uobičajene količine hrane. U prvoj fazi ogleda konzumacija hrane nije se značajnije razlikovala između oglednih grupa prasidi hranjenih smešama koje su sadržavale neki od dodatih stimulatora rasta i kontrolne grupe. U odnosu na kontrolnu grupu, grupa prasidi hranjena obrokom sa dodatim prebiotikom je

konzumirala nešto veću količinu hrane. U drugoj fazi ogleda, sve ogledne grupe su ostvarile veću konzumaciju hrane u odnosu na kontrolnu grupu.

Posmatrano za ceo ogled zbirno (period od 1-40. dana), prasad oglednih grupa hranjena smešama koje su sadržavale neki od dodatih stimulatora rasta postigla su veću konzumaciju hrane u odnosu na prasad kontrolne grupe.

**Tabela 10.** Dnevna konzumacija hrane tokom ogleda, [kg]

Period ogleda	G r u p e			
	K	O-I	O-II	O-III
1-20.	0,49	0,53	0,55	0,49
20-40.	1,29	1,38	1,38	1,40
1-40.	0,89	0,96	0,97	0,94

Konverzija hrane u toku ogleda prikazana je u tabeli 11, a iz podataka se uočava uticaj različitih hranidbenih tretmana. Prasad ogledne grupe O-I, hranjena smešom koja je sadržavala dodatak probiotika, postigla su tokom prve faze ogleda nižu konverziju hrane u odnosu na prasad kontrolne grupe, što je ujedno i bila najniža zabeležena vrednost. Prasad ogledne grupe O-II postigla su višu a ogledne grupe O-III identičnu konverziju u odnosu na prasad kontrolne grupe. U drugoj fazi ogleda, prasad svih oglednih grupa ostvarila su nižu konverziju u odnosu na prasad kontrolne grupe. Nastavljajući trend zabeležen u prvoj fazi ogleda, prasad ogledne grupe O-I ostvarila su i u drugoj fazi najnižu konverziju.

**Tabela 11.** Konverzija hrane tokom ogleda

Period ogleda	G r u p e			
	K	O-I	O-II	O-III
1-20.	2,130	1,963	2,200	2,130
20-40.	2,115	1,971	2,029	2,059
1-40.	2,119	1,959	2,064	2,043



Posmatrano zbirno za ceo ogled, konverzija hrane koju je ostvarila grupa prasadi hranjena obrokom sa dodatkom probiotika (O-I) bila je najniža, sa numeričkom razlikom od 7,55% u odnosu na kontrolnu grupu.

#### 5.4 Rezultati ispitivanja elektrohemijske reakcije himusa

Vrednosti elektrohemijske reakcije himusa, izmerene u pojedinim segmentima creva, prikazane su u tabeli 12.

**Tabela 12.** Elektrohemijska reakcija\* u pojedinim segmentima creva

Segment creva	G r u p e			
	K	O-I	O-II	O-III
Jejunum	5,29±0,17	5,60±0,66	5,53±0,82	5,38±0,58
Cekum	5,20±0,46	5,47±0,38	5,30±0,18	5,37±0,18

\*Vrednost izražena kao  $\bar{X} \pm Sd$

Rezultati ispitivanja elektrohemijske reakcije himusa u tankom crevu pokazuju porast pH vrednosti od kontrolne preko oglednih grupa prasadi sa najvećim zabeleženim vrednostima u oglednoj grupi O-I.

Rezultati ispitivanja elektrohemijske reakcije himusa u debelom crevu pokazuju trend porasta pH vrednosti od kontrolne preko oglednih grupa prasadi sa najvećim zabeleženim vrednostima u oglednoj O-I grupi koja je putem hrane dobijala preparat probiotika. Rezultati ukazuju na pad pH vrednosti od tankog ka debelom crevu u kontrolnoj, kao i svim oglednim grupama uz najizraženije numeričke u oglednoj O-II grupi. Iznete numeričke razlike nisu imale statističku značajnost ( $p > 0,05$ ).

### 5.5 Rezultati mikrobioloških analiza

Rezultati mikrobioloških ispitivanja koji se odnose na prosečan ukupan broj bakterija u sadržaju tankog i debelog creva prasadi izneti su u tabeli 13.

Prosečan ukupan broj bakterija u jejunumu se menjao pod uticajem različitih tretmana i u svim oglednim grupama je zabeležen manji broj bakterija u odnosu na kontrolnu grupu prasadi. Najmanji broj bakterija je ustanovljen u oglednoj grupi O-I.

**Tabela 13.** Prosečan ukupan broj bakterija u sadržaju tankog i debelog creva (log CFU/g)

Posmatrani parametar	G r u p e			
	K	O-I	O-II	O-III
<b>Prosečan ukupan broj bakterija u jejunumu</b>	$10^7$	$10^4$	$10^5$	$10^6$
<b>Prosečan ukupan broj bakterija u cekumu</b>	$10^9$	$10^7$	$10^8$	$10^8$

Prosečan ukupan broj bakterija u cekumu se menjao pod uticajem različitih tretmana i u svim oglednim grupama je zabeležen manji broj bakterija u odnosu na kontrolnu grupu prasadi. Najmanji broj bakterija je zabeležen u oglednoj O-I grupi koja je putem hrane dobijala preparat probiotika, dok je u oglednim grupama O-II i O-III utvrđen jednak broj bakterija. Dobijeni rezultati ukazuju na povećanje prosečnog ukupnog broja bakterija od proksimalnih prema distalnim delovima digestivnog trakta, kako prasadi kontrolne, tako i prasadi oglednih grupa koja su putem hrane dobijala stimulatore rasta.

Rezultati mikrobioloških ispitivanja koji se odnose na determinisanje prisutne mikroflore i njihovu zastupljenost u sadržaju tankog i debelog creva prasadi izneti su u tabelama 14 i 15.

**Tabela 14.** Zastupljenost utvrđenih bakterija u ispitivanim uzorcima jejunuma (x/6)

Posmatrani parametar	G r u p e			
	K	O-I	O-II	O-III
<i>Escherichia coli</i>	6	2	5	6
<i>Enterococcus spp.</i>	6	5	5	0
<i>Bacillus spp.</i>	2	6	0	0
<i>Brachyspira hyodysenteriae</i>	0	0	0	0
<i>Campylobacter spp.</i>	0	0	0	0
<i>Clostridium perfringens</i>	2	0	1	0
<i>Lactobacillus spp.</i>	2	6	3	4

**Tabela 15.** Zastupljenost utvrđenih bakterija u ispitivanim uzorcima cekuma (x/6)

Posmatrani parametar	G r u p e			
	K	O-I	O-II	O-III
<i>Escherichia coli</i>	6	2	5	6
<i>Enterococcus spp.</i>	6	5	5	0
<i>Bacillus spp.</i>	1	6	3	1
<i>Brachyspira hyodysenteriae</i>	2	1	1	2
<i>Campylobacter spp.</i>	2	1	2	1
<i>Clostridium perfringens</i>	2	0	1	0
<i>Lactobacillus spp.</i>	2	6	5	3

Rezultati izneti u tabelama 14 i 15 pokazuju da je u ogleđnoj grupi O-I dodatkom probiotskih bakterija suprimiran rast vrsta koje pripadaju primarnim bakterijskim patogenima digestivnog trakta prasadi (*Brachyspira hyodysenteriae*, *Campylobacter spp.* i *Clostridium perfringens*) uz istovremenu dominaciju bakterija iz rodova *Lactobacillus* i *Bacillus*, čije prisustvo je utvrđeno u svakom od šest ispitivanih uzoraka tankog i debelog creva. Upotreba prebiotika i fitobiotika (ogledne grupe O-II i O-III) rezultirala je blagim smanjenjem broja koliformnih bakterija i klostridija u jejunumu i cekumu u odnosu na prasad kontrolne grupe. U ogleđnoj O-III grupi koja je

putem hrane dobijala preparat fitobiotika je izrazito sužen spektar vrsta bakterija koje se nalaze u digestivnom traktu uz dominaciju *E.coli*, čije prisustvo je utvrđeno u svakom ispitivanom uzorku, kako tankog, tako i debelog creva, što upućuje na zaključak o širokom antibakterijskom dejstvu fitobiotika i rezistenciji *E.coli* na primenjeni preparat.

## 5.6. Rezultati morfometrijskih ispitivanja

Morfometrijske karakteristike ispitivanih segmenata jejunuma i cekuma prikazane su u tabelama 16 i 17.

Iz prikazanih podataka morfometrijskih karakteristika jejunuma može se uočiti da se dužina i širina crevnih resica, kao i dubina kripte značajno menjaju pod uticajem različitih primenjenih tretmana. Dužina i širina crevnih resica u svim oglednim grupama je bila veća u poređenju sa kontrolnom grupom prasadi pri čemu je utvrđena statistička značajnost na nivou  $p < 0,001$  u poređenju ogledne O-I grupe sa kontrolnom i oglednim O-II i O-III grupama. Dubina kripte u oglednim grupama O-I i O-II bila je veća u poređenju sa kontrolnom grupom prasadi, dok je u oglednoj grupi O-III zabeležena vrednost bila manja u odnosu na kontrolnu grupu. Dubina kripte u oglednoj O-II grupi bila je statistički značajno ( $p < 0,01$ ) veća u poređenju sa kontrolnom grupom i visoko statistički značajno veća ( $p < 0,001$ ) u odnosu na oglednu grupu prasadi koja je putem hrane dobijala fitobiotik (O-III).

**Tabela 16.** Morfometrijske karakteristike\* jejunuma ( $\mu\text{m}$ ).

Posmatrani parametar	G r u p e			
	K	O-I	O-II	O-III
Dužina resica	498,1±112,5 <sup>C</sup>	732,7±117,3 <sup>A, B, C</sup>	507,5±88,72 <sup>B</sup>	549,4±126,2 <sup>A</sup>
Širina resica	66,5±18,70 <sup>C</sup>	84,23±17,76 <sup>A, B, C</sup>	67,43±19,03 <sup>B</sup>	71,17±12,17 <sup>A</sup>
Dubina kripte	166,8±55,26 <sup>B</sup>	178,1±54,08	206,9±76,14 <sup>A, B</sup>	159,9±60,04 <sup>A</sup>

\*Vrednost izražena kao  $\bar{X} \pm Sd$

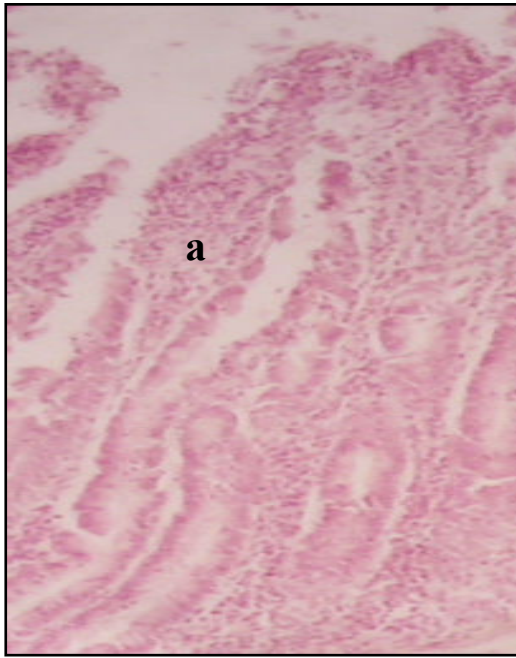
<sup>A, B, C</sup>  $p < 0,01$

**Tabela 17.** Morfometrijske karakteristike\*cekuma ( $\mu\text{m}$ ).

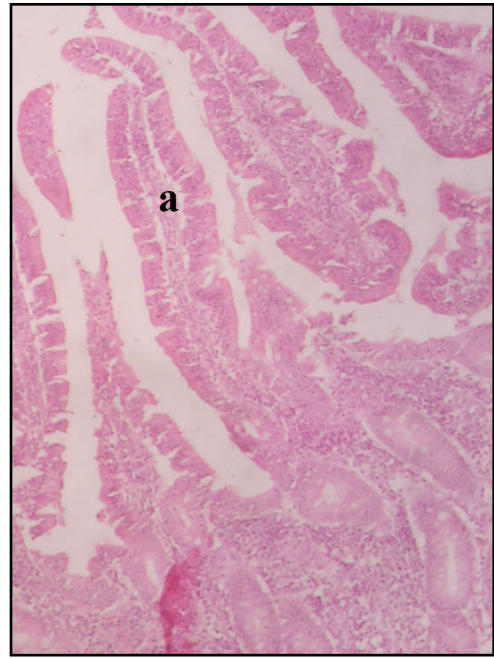
Posmatrani parametar	G r u p e			
	K	O-I	O-II	O-III
<b>Dubina kripti</b>	124,4±30,62 <sup>A, a, b</sup>	154,5±51,25 <sup>A</sup>	146,8±40,14 <sup>a</sup>	148,7±45,03 <sup>b</sup>

\*Vrednost izražena kao  $\bar{x} \pm Sd$       <sup>A</sup> p<0,01      <sup>a, b</sup> p<0,05

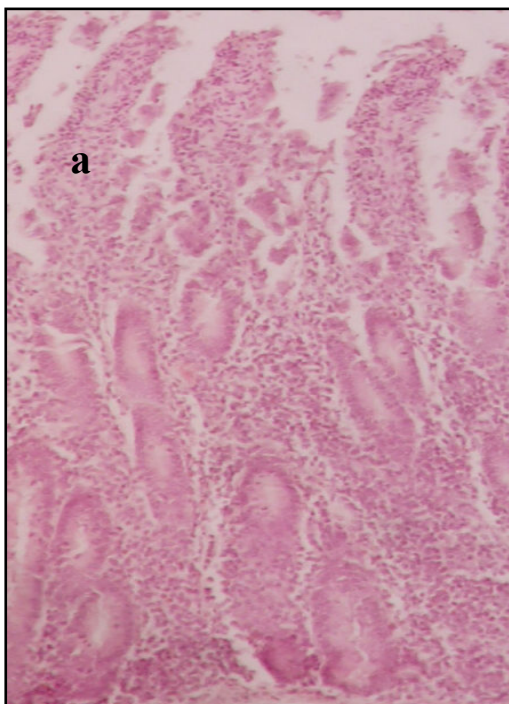
Iz prikazanih podataka morfometrijskih karakteristika cekuma uočava se značajan uticaj primenjenih tretmana na dubinu kripti. U svim oglednim grupama zabeležene su veće vrednosti u odnosu na kontrolnu grupu prasadi, pri čemu su navedene razlike dostigle nivo statističke značajnosti ( $p < 0,05$ ) u oglednim grupama prasadi koja su putem hrane dobijala preparat prebiotika i fitobiotika (O-II i O-III). Najizraženiji uticaj na dubinu kripti je ostvaren u oglednoj grupi O-I a razlike u dobijenim vrednostima u odnosu na kontrolnu grupu su bile visoko statistički značajne ( $p < 0,01$ )



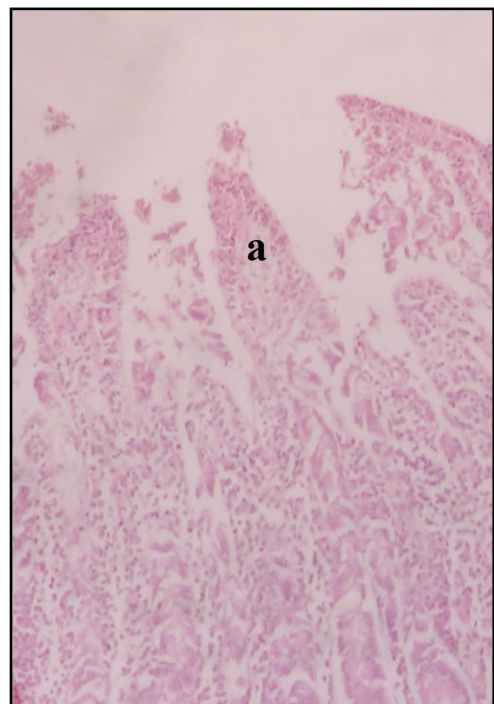
Kontrolna grupa (K)



Ogledna grupa (O-I)



Ogledna grupa (O-II)



Ogledna grupa (O-II)

**Slika 1.** Crevne resice (a) jejunuma prasadi eksperimentalnih grupa, obj. 20x, HE

## 6. DISKUSIJA

U cilju bolje preglednosti poglavlje diskusija je podeljeno na podpoglavlja prema postavljenom cilju i zadacima istraživanja. Zadatak postavljenog rada se odnosio na ispitivanje uticaja upotrebe različitih stimulatora rasta u ishrani prasadi na zdravstveno stanje, proizvodne rezultate, kao i hemijske, mikrobiološke i morfometrijske parametre pojedinih segmenata digestivnog trakta. Dobijeni rezultati eksperimentalnih grupa su poređeni međusobno, kao i u odnosu na literaturne podatke.

### 6.1. Hemijski sastav smeša

Smeše korišćene u izvedenom ogledu su formulisane korišćenjem standardnih hraniva u kvantitativnom odnosu koji je uobičajen u ishrani prasadi u našim uslovima. Rezultati hemijske analize smeša za ishranu kontrolne grupe prasadi bili su u skladu sa tehnološkim i zakonskim normativima (Pravilnik, 2010), a sadržaj hranljivih materija u potpunosti je zadovoljavao potrebe prasadi u različitim fazama odgoja (AEC, 1993; NRC, 1998).

Osnovni hemijski sastav smeša za ishranu oglednih grupa prasadi nije se bitno razlikovao od smeša za ishranu kontrolne grupe. Prema planu istraživanja u smeše za ogledne grupe prasadi su dodati određeni stimulatori rasta, dok smeše za ishranu kontrolne grupe nisu sadržale nikakav dodatak. Uključivanje različitih stimulatora rasta izvršeno je smanjenjem učešća nosača (pšenično stočno brašno) u korišćenom premiksu kako bi se minimalno smanjio uticaj na sastav i hranljivu vrednost obroka. Svi preparati su korišćeni u količinama preporučenim od strane proizvođača.

Na osnovu rezultata hemijske analize može se zaključiti da je u potpunosti ispunjen radni zadatak postavljen pri formiranju ogleda u pogledu sadržaja i odnosa pojedinih hranljivih materija u ispitivanim smešama. Na opisani način isključena je razlika u sastavu potpunih krmnih smeša za kontrolnu i ogledne grupe prasadi koja bi mogla da utiče na naknadno ostvarene proizvodne rezultate.

## 6.2. Zdravstveno stanje životinja

Upotreba stimulatora rasta u ishrani životinja se zasniva na činjenici da samo zdrav organizam može u potpunosti da ispolji genetski potencijal proizvodnih svojstava. Tokom oglada nije došlo do poremećaja zdravstvenog stanja i ispoljavanja kliničkih znakova oboljenja, kao ni do uginuća prasadi u kontrolnoj i oglednim grupama. Prasad svih ispitivanih grupa bila su skladne telesne građe, pravilno razvijenog koštanog i mišićnog tkiva, živahnog temperamenta i dobre kondicije. Koža i vidljive sluznice bile su uobičajenog izgleda. Apetit je bio dobar, a feces uobičajeno formiran. Sposobnost aktivnog kretanja i koordinacija pokreta bili su usklađeni, a mišićni tonus normalno izražen. S obzirom na opisano zdravstveno stanje, dobijeni rezultati se mogu prihvatiti sa velikom verovatnoćom kao objektivni.

Pozitivni efekti upotrebe prebiotika na zdravstveno stanje prasadi u izvedenom eksperimentu su u skladu sa prethodno iznetim podacima Shen i sar. (2009), Yin i sar. (2008) i White i sar. (2002) koji su dokazali njihov imunomodulatorni efekat (aktivacija makrofaga i povećan nivo citokina IFN- $\gamma$ ), kao i povećanje nivoa imunoglobulina (IgA, IgG i IgM) u serumu tretiranih prasadi. Takođe, Zhao i sar. (2012), Grela i sar. (2006) i Zhou i sar. (2012) su dokazali da se upotrebom prebiotika može značajno ( $p < 0,05$ ) smanjiti pojava dijareje kod odbijene prasadi, a kao objašnjenje navode sposobnost prebiotika da spreči vezivanje *E.coli* za sluznicu creva, kao i stimulatorni uticaj na rast mlečnokiselinskih bakterija. Pored opisanih efekata, Vondruskova i sar. (2010) navode da upotreba prebiotika rezultira povećanjem koncentracije kratkolančanih masnih kiselina koje imaju pozitivan uticaj na crevnu morfologiju, čime dodatno doprinose poboljšanju zdravstvenog stanja prasadi.

Dobijeni rezultati koji se odnose na pozitivan uticaj korišćenja fitobiotika na zdravstveno stanje prasadi u izvedenom eksperimentu, se slažu sa podacima Bederska i Piesyka (2011) i Pengfei i sar. (2012) koji navedene efekte tumače, pre svega, smanjenjem broja patogenih bakterija u digestivnom traktu prasadi i posledičnoj prevenciji nastanka dijareje. Pored navedenih, fitobiotici mogu ispoljavati i imunostimulatorni, antivirusni, antiinflamatorni, antiparazitski, kao i antioksidativni efekat (Wenk, 2003; Halas i sar., 2011; Li i sar., 2012).



Mehanizmi putem kojih probiotici ostvaruju pozitivan uticaj na zdravstveno stanje prasadi su brojni, s tim da se među najvažnije ubrajaju kompetitivno isključivanje patogena, proizvodnja antimikrobnih supstanci, kao i stimulacija imunološkog sistema (Cho i sar., 2011; Steer i sar., 2000; Corcionivoschi i sar., 2010; Brito i sar., 2012). U izvedenom eksperimentu, modulacijom mikrobiološke populacije u digestivnom traktu prasadi, probiotici su omogućili održavanje intestinane mikrobne ravnoteže, odnosno eubioze. Na opisani način probiotici su stvorili uslove za dobro funkcionisanje digestivnog trakta što predstavlja jedan od osnovnih preduslova za dobro zdravlje životinje, kao i za postizanje optimalnih proizvodnih rezultata. Većina autora je saglasna da se upotrebom probiotika u ishrani prasadi smanjuje pojava dijareje (Simon i sar., 2001; Hadami i sar., 2002; Kyriakis i sar., 1999; Taras i sar., 2005; Zani i sar., 1998), skraćuje vreme trajanja dijareje i smanjuje mortalitet (Alexopoulos i sar., 2004; Rekiel i Kulisiewicz, 1996; Mikolajczak i sar., 2004; Grela, 2004). Profilaktičko dejstvo probiotika u velikoj meri zavisi od vrste i količine upotrebljenih bakterijskih vrsta, načina i dužine tretmana, zdravstvenog stanja životinje, kao i sanitarnih uslova na farmi (Close, 2000).

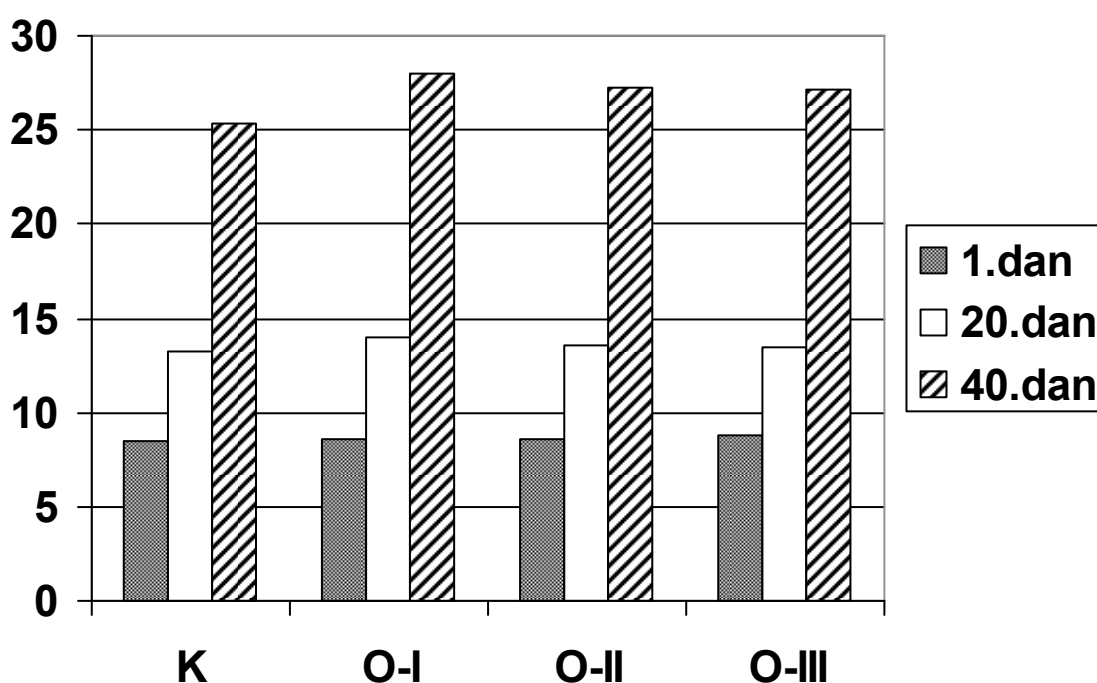
### **6.3. Proizvodni rezultati**

#### **6.3.1. Prosečna telesna masa prasadi**

Prosečne telesne mase prasadi na početku oglada bile su ujednačene, u okviru tehnoloških normativa i kretale su se, između grupa, u opsegu od 8,53-8,82 kg. Nije bilo statistički značajnih razlika ( $p > 0,05$ ) u telesnoj masi između ispitivanih grupa na početku oglada, čime je ispunjen preduslov uniformnosti grupa koji je omogućio precizno tumačenje naknadno ostvarenih proizvodnih rezultata.

Na kraju prve faze oglada (20. dan) prasad kontrolne grupe su postigla uobičajenu telesnu masu predviđenu tehnološkim normativima za datu rasu. Prasad svih oglednih grupa ostvarila su veću prosečnu telesnu masu u odnosu na prasad kontrolne grupe, s tim da navedene razlike nisu dostigle nivo statističke značajnosti ( $p > 0,05$ ). Najveću prosečnu telesnu masu ostvarila su prasad iz grupe koja je obrokom dobijala

probiotik uz numeričku razliku od 5,61% u odnosu na kontrolnu grupu, dok je navedena razlika za prasid koja su obrokom dobijala prebiotik ili fitobiotik bila neznatna (2,73 i 2,35%, retrospektivno). Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa navodima Hoang i sar. (2010, 2011) i Cho i sar. (2011) koji ističu da je efikasnost upotrebe probiotika u ishrani prasadi najveća tokom prve dve nedelje nakon odbijanja kada je crevna mikrobiota još uvek nestabilna i podložna promenama. Rezultate upotrebe preparata probiotika (Bioplus 2B) trebalo bi procenjivati u ranijem uzrastu prasadi i nakon duže upotrebe u ishrani (Wang i sar., 2009).



**Grafikon 1.** Prosečna telesna masa prasadi tokom ogleđa, (kg)

Na kraju druge faze ogleđa (40. dan) nastavljen je započeti trend iz prve faze i prasid svih oglednih grupa su ostvarila veću prosečnu telesnu masu u odnosu na prasid iz kontrolne grupe, s tim da razlike nisu dostigle nivo statističke značajnosti ( $p > 0,05$ ). Ostvarena telesna masa prasadi iz kontrolne grupe bila je u skladu sa tehnološkim normativima predviđenim za datu rasu, kao i rezultatima do kojih su došli autori u slično postavljenim ogledima u našim uslovima držanja prasadi (Šefer, 2002; Popović, 1999). Najveću prosečnu telesnu masu ostvarila su prasid koja su putem hrane dobijala

preparat probiotika uz numeričku razliku od 10,51% u odnosu na kontrolnu grupu. Utvrđeno povećanje telesne mase je u saglasnosti sa podacima do kojih su došli Bontempo i sar. (2006), Hoang i sar. (2010) i SCAN (2000) pri upotrebi probiotika u ishrani prasadi.

Prosečna telesna masa koju su ostvarila prasadi iz oglednih grupa sa dodatim prebiotikom i fitobiotikom bila je za 7,54 i 7,39% veća u odnosu na kontrolnu grupu, retrospektivno. Slične rezultate su utvrdili Grilli (2007), Li i sar. (2012), Pengfei i sar. (2012) i Cho i sar. (2006) pri upotrebi fitobiotika, kao i Shen i sar. (2009), Zhao i sar. (2012), White i sar. (2002) i Poekhampa i sar. (2011) pri upotrebi prebiotika. Treba napomenuti da kod slično koncipiranih istraživanja postoje razlike u korišćenom eksperimentalnom materijalu, sirovinskom sastavu i kvalitetu hrane, načinu držanja, kao i drugim parametrima dizajna eksperimenta, što otežava direktno upoređivanje podataka, naročito proizvodnih parametara.

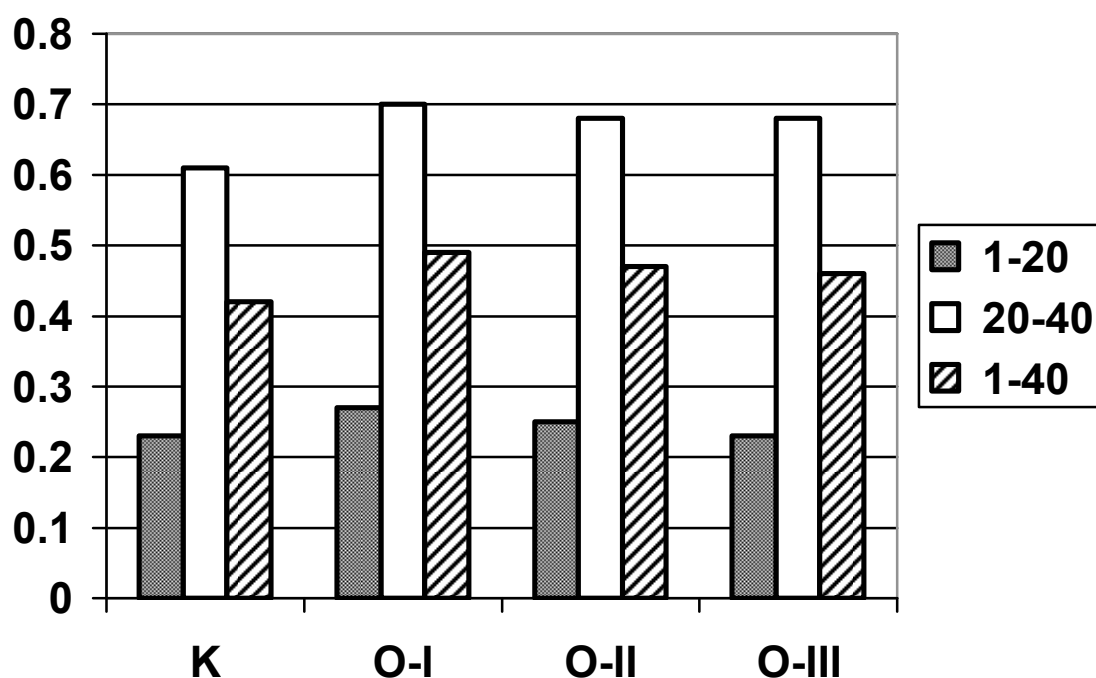
### 6.3.2. Prosečan dnevni prirast prasadi

Iako je telesna masa dobar pokazatelj, smatra se da je dnevni prirast pouzdaniji proizvodni pokazatelj, i to kako hranljive vrednosti i higijenske ispravnosti hrane, tako i zdravstvenog stanja životinje. Dnevni prirast prasadi kontrolne grupe tokom svih faza ogleda bio je u granicama predviđenim tehnološkim normativima.

Analizirajući rezultate ostvarene po fazama ogleda može se konstatovati da su grupe sa dodatim probiotikom i prebiotikom ostvarile u svim fazama veći ( $p > 0,05$ ) dnevni prirast u odnosu na kontrolnu grupu, za razliku od grupe sa dodatim fitobiotikom koja je u početnom periodu ogleda (1-20. dan) ostvarila isti prirast ( $0,23 \pm 0,09$ ) kao i kontrolna grupa prasadi ( $0,23 \pm 0,15$ ). Dobijeni rezultati su u skladu sa podacima Halas i sar. (2011) i Cho i sar. (2006) koji prilikom upotrebe fitobiotika u ishrani prasadi nisu uočili razlike u ostvarenom prirastu u odnosu na kontrolnu grupu tokom prve faze ogleda, dok su tokom narednih faza razlike bili znatno izraženije.

Rezultati koji se odnose na ostvareni prirast tokom celokupnog perioda ogleda (1-40. dan) jasno ukazuju na pozitivan uticaj svih upotrebljenih stimulatora rasta. Grupa sa dodatim probiotikom je ostvarila najveći ( $p > 0,05$ ) prosečan dnevni prirast, koji je bio za 16,67% veći u odnosu na kontrolnu grupu. Dobijeni rezultati u izvedenom

eksperimentu se slažu sa podacima SCAN (2000) koji navode da je upotrebom probiotskog preparata Bioplus 2B u ishrani prasadi ostvareno povećanje prosečnog dnevnog prirasta od 16,4% u poređenju sa kontrolnom grupom. Slične rezultate navode Ushakova i sar. (2006) i Ahrens i sar. (1992) koji su utvrdili za 19%, odnosno 13% veći prosečan dnevni prirast kod prasadi koja su putem hrane dobijala navedeni preparat probiotika. Opisani rezultati zasnivaju se na sposobnosti probiotskih bakterija *Bacillus licheniformis* i *Bacillus subtilis* da proizvode određene enzime (proteaze, amilaze i katalaze), koji potpomažu varenje, posebno, kod mladih životinja (Link i sar., 2007).



**Grafikon 2.** Prosečan dnevni prirast prasadi tokom ogleda, (kg)

U izvedenom eksperimentu upotrebom preparata prebiotika, tokom svih posmatranih faza ishrane, ostvaren je veći prosečan dnevni prirast u odnosu na kontrolnu grupu, s tim da su navedene razlike bile izraženije tokom druge faze (20-40. dan) ogleda. Sa druge strane, Zhao i sar. (2012) su koristeći preparat prebiotika (Bio-Mos kao izvor manan-oligosaharida) utvrdili da je najveći prosečan dnevni prirast, u poređenju sa kontrolnom grupom, zabeležen tokom prve faze ogleda (0-14. dan), dok je tokom druge faze (15-28. dan) efekat upotrebljenog preparata na povećanje dnevnog

prirasta izostao. U skladu sa navedenim, Miguel i sar. (2002), navode da je efikasnost manan- oligosaharida u stimulaciji rasta izraženija u ranijim fazama života prasadi. Autori su, pri upotrebi navedenog prebiotika utvrdili povećanje dnevnog prirasta za 4,2%, dok su pri upotrebi istog prebiotika Davis i sar. (2000, 2002) utvrdili povećanje od 4,15%, a Poeikhampha i sar. (2011) povećanje od 5% u odnosu na kontrolnu grupu prasadi. Navedene vrednosti su niže od vrednosti koje su utrdene u izvedenom eksperimentu.

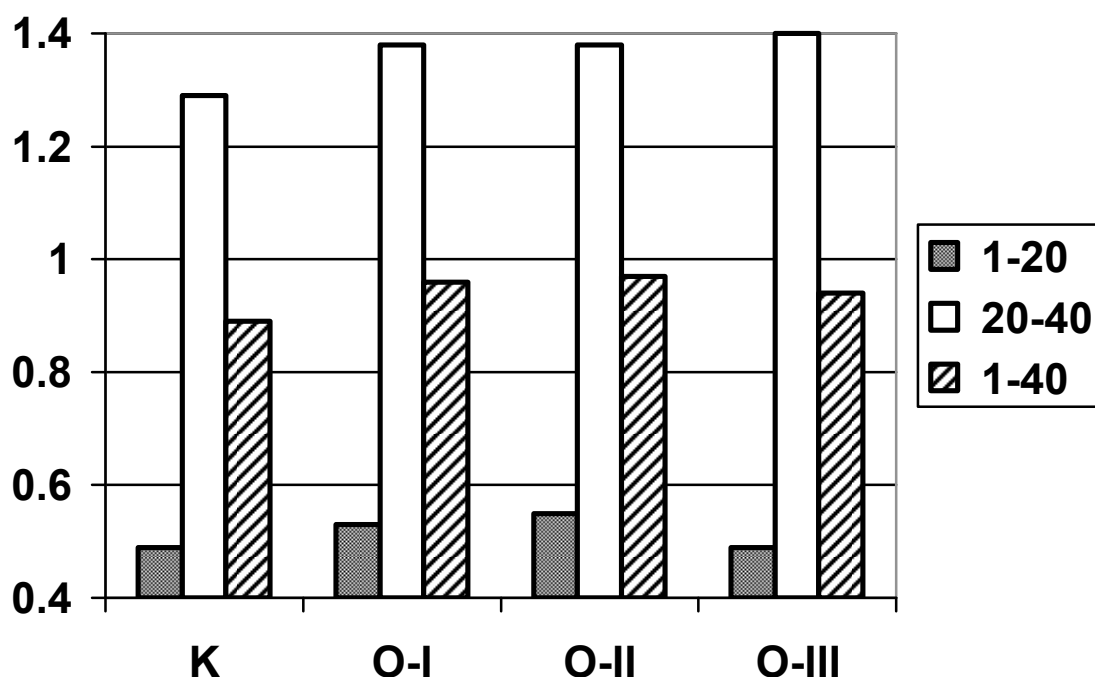
Ostvaren prosečan dnevni prirast u grupi prasadi sa dodatim fitobiotikom u izvedenom eksperimentu je u potpunosti u skladu sa rezultatima do kojih su došli Li i sar. (2012) i Pengfei i sar. (2012) upotrebom istog preparata fitobiotika. Dobijene rezultate autori su objasnili povećanom svarljivošću hranljivih materija, poboljšanjem sastava crevne mikropopulacije i imunološkog statusa prasadi, kao i mogućim uticajem bakterijskih metabolita poput spermidina i spermina. Idući prirast kao u izvedenom eksperimentu (0,46 kg) ostvaren je i u ogledu Cho i sar. (2006) koji su procenjivali efekte upotrebe fitobiotika u ishrani prasadi. Suprotno navedenim rezultatima, Namkung i sar. (2004) su utvrdili niži dnevni prirast kod prasadi koja su putem hrane dobijala preparat fitobiotika, što su autori objasnili izraženim mirisom fitobiotika koji je smanjio konzumaciju hrane.

### 6.3.3. Prosečan dnevni unos hrane

Apetit predstavlja jedan od prvih pokazatelja zdravlja životinja, kao i kvaliteta hrane. Prosečna dnevna konzumacija hrane je tokom ogleda varirala ( $p > 0,05$ ) između ispitivanih grupa. Konzumacija hrane je postepeno povećavana u svim ispitivanim grupama uporedo sa periodom trajanja ogleda.

Tokom prve faze ogleda (1-20. dan) najveća dnevna konzumacija hrane ostvarena je u grupi sa dodatim prebiotikom i u odnosu na kontrolnu grupu ostvareno je povećanje od 12,24%. Dobijeni rezultati su u skladu sa podacima Zhao i sar. (2012) koji su dokazali da je upotrebom manan-oligosaharida u ishrani prasadi najviše povećana konzumacija tokom prve faze ogleda (0-14. dan). Do sličnih rezultata su došli i Zhou i sar. (2012) pri upotrebi hioto-oligosaharida, kao preparata prebiotika, u ishrani ranoodbijenih prasadi. U skladu sa iznetim podacima su i navodi Miguel i sar. (2002) da

je efikasnost manan- oligosaharida kao promotera rasta izraženija u ranijim fazama života prasadi.



**Grafikon 3.** Prosečan dnevni unos hrane tokom ogleda, (kg)

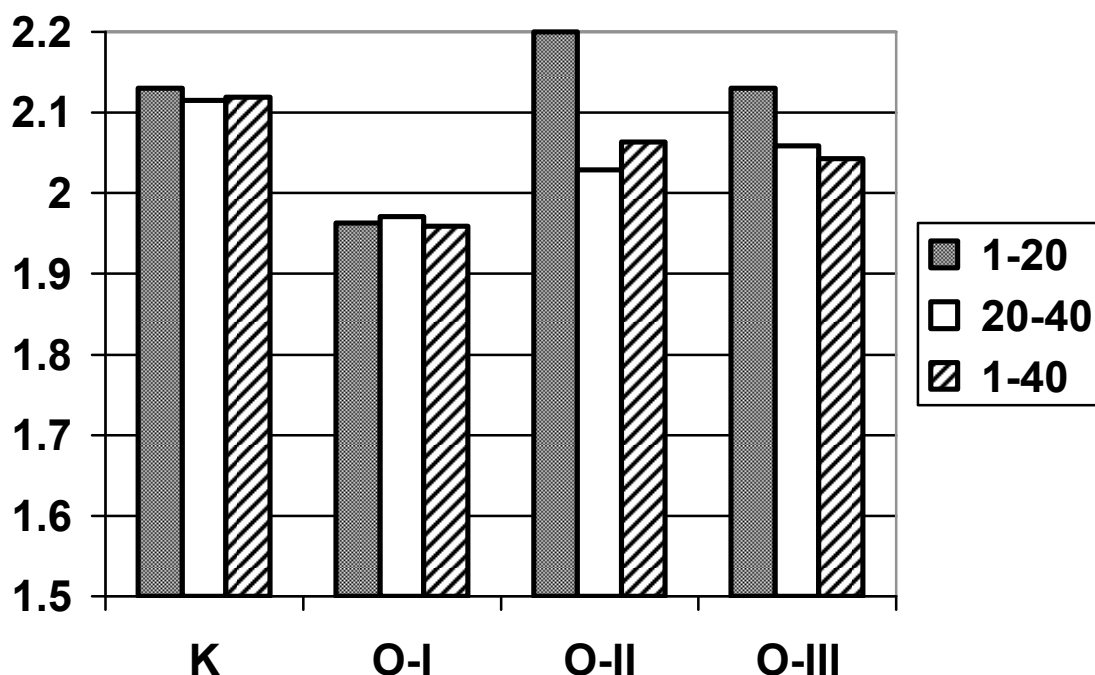
Grupa prasadi sa dodatim fitobiotikom, tokom prve faze ogleda ostvarila je manju dnevnu konzumaciju hrane u odnosu na ostale ogledne grupe, s tim da nije bilo razlike u odnosu na kontrolnu grupu prasadi. Navedeni podaci ukazuju da prasad tokom navedenog perioda nisu negativno reagovala na specifičan i izražen miris upotrebljenog preparata fitobiotika. U suprotnosti sa iznetim podacima su navodi Windisch i sar. (2008) da upotreba fitobiotika u ishrani prasadi pretežno rezultira smanjenim unosom hrane. Slične podatke iznose Namkung i sar. (2004), kao i Halas i sar. (2011) koji su upotrebom fitobiotika u ishrani prasadi utvrdili smanjenu konzumaciju hrane tokom svih ispitivanih faza ogleda. Autori dobijene rezultate tumače izraženim, odbojnim mirisom upotrebljenog preparata fitobiotika. Takođe, Trevisi i sar. (2007) utvrdili su negativan efekat upotrebljnog timola u ishrani prasadi na ostvaren unos hrane. Suprotno rezultatima ostvarenim tokom prve faze, u drugoj fazi izvedenog eksperimenta (20-40. dan) grupa prasadi sa dodatim fitobiotikom konzumirala je najveću količinu hrane i to

za 8,53% više u odnosu na kontrolnu grupu, odnosno 5,62%, posmatrano za celokupni period (1-40. dan). Navedeno povećanje može se objasniti kompenzatornim mehanizmom (Pluske i sar., 2003) ili pretpostavkom da je prasadima potreban određeni period adaptacije na izražen miris upotrebljenog preparata. Opisano povećanje unosa hrane u koju je dodat fitobiotik (timol) može biti posledica povećane sekrecije digestivnih enzima, skraćenog vremena pasaže crevnog sadržaja, kao i sklonosti prasadi ka navedenim fitobiotikom (Michiels i sar., 2012). Rezultati izvedenog eksperimenta su u skladu sa podacima Pengfei i sar. (2012), kao i Li i sar. (2012) koji su upotrebom identičnog preparata fitobiotika u ishrani prasadi utvrdili veći dnevni unos hrane u odnosu na kontrolnu grupu. Takođe, Cho i sar. (2006) su utvrdili pozitivan uticaj fitobiotika na unos hrane u početnoj (0-14. dan), kao i u svim posmatranim fazama ogleđa (14-28. i 28-49. dan).

Posmatrano za ukupan period ogleđa (1-40. dan), upotreba svakog od korišćenih stimulatora rasta, rezultirala je povećanjem konzumacije hrane u odnosu na kontrolnu grupu. Najveća prosečna dnevna konzumacija hrane je zabeležena u grupi sa dodatim prebiotikom i bila je za 8,99% veća u odnosu na kontrolnu, a neznatno veća u odnosu na ostale ogledne grupe. Dobijene vrednosti su nešto veće od prethodno iznetih u ogledima Davis i sar. (2000, 2002), kao i Miguel i sar. (2002), koji su upotrebom manan-oligosaharida u ishrani prasadi utvrdili povećanje konzumacije od 2,08% odnosno 2,1%, retrospektivno. Poeikhampha i sar. (2011) nisu utvrdili razlike u ostvarenom unosu hrane između grupe sa dodatim manan-oligosaharidom i kontrolne grupe prasadi. Za razliku od navedenih, rezultati koje iznose White i sar. (2002) govore o smanjenju dnevnog unosa hrane ( $p < 0,05$ ) tokom svih faza hranidbenog perioda od 28 dana tokom koga su prasad obrokom dobijala dodatak manan-oligosaharida. Različiti efekti upotrebe manan-oligosaharida na proizvodne rezultate prasadi mogu biti izazvani korišćenjem manan-oligosaharida različitih proizvođača i različitog porekla, kao i zbog razlika u korišćenim melezima, uzrastu i polovima prasadi, različito formulisanim obrocima, trajanju ekperimenta, kao i smeštajnim uslovima (Zhao i sar., 2012).

### 6.3.4. Konverzija hrane

Konverzija hrane, kao interakcija konzumacije hrane i prirasta, predstavlja jedan od najboljih pokazatelja ekonomičnosti proizvodnje, odnosno kvaliteta hrane i njenih mogućnosti da zadovolji specifične i visoke potrebe mladih životinja u porastu.



**Grafikon 4.** Konverzija hrane tokom ogleđa

Posmatrano po fazama ogleđa, prasadi koja su putem hrane dobijala preparat probiotika postigla su u prvoj i drugoj fazi nižu konverziju hrane u odnosu na prasadi kontrolne grupe, za razliku od prasadi grupe sa dodatim prebiotikom i fitobiotikom, koja su tokom prve faze ogleđa postigla veću, odnosno identičnu konverziju u poređenju sa kontrolnom grupom. Dobijeni rezultati su u potpunosti u skladu sa podacima do kojih su došli Hung (2009) i White i sar. (2002) koji su upotrebom manan-oligosaharida u ishrani prasadi zabeležili negativan uticaj tretmana na konverziju hrane tokom prve dve nedelje, s tim da je navedeni efekat, kao i u izvedenom eksperimentu, u narednim fazama izostao. Prasadi koja su putem hrane dobijala fitobiotik (timol) u ogleđu Grilli (2007) su tokom prve faze ogleđa (0-21. dan) ostvarila identičnu konverziju hrane kao i kontrolna grupa prasadi.



Analizirajući celokupan period oglada (1-40. dan), upotreba stimulatora rasta rezultirala je smanjenjem konverzije hrane u svim oglednim grupama u odnosu na kontrolnu grupu. Navedene razlike bile su najizraženije u grupi koja je putem hrane dobijala preparat probiotika (7,55%) i slabije izražene za grupe sa dodatim prebiotikom (2,60%) i fitobiotikom (3,59%).

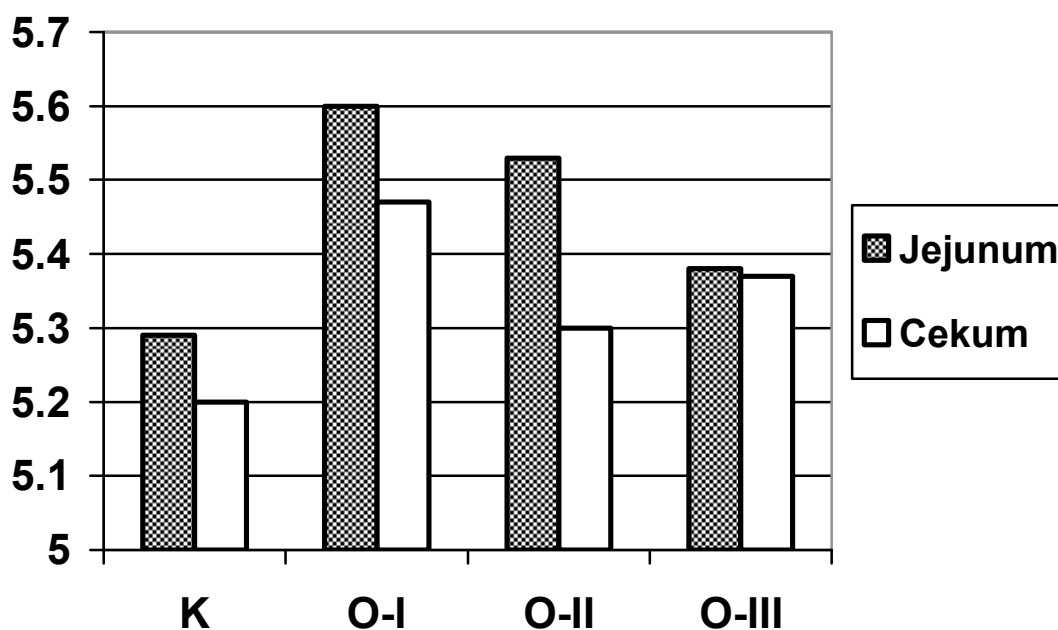
Dobijeni rezultati u izvedenom eksperimentu su u skladu sa rezultatima većine autora, među kojima Malloa i sar. (2010), Zani i sar. (1998), Hoang i sar. (2010), Hoang i sar. (2012) i Choi i sar. (2011) koji su pri upotrebi probiotika u ishrani prasadi zabeležili nižu konverziju hrane za 8,75%, 9,29%, 6,17%, 7,5% i 8,81% u odnosu na kontrolnu grupu, retrospektivno. Takođe, rezultati izvedenog eksperimenta su u skladu i sa navodima Evropske Komisije, SCAN (2000), da je upotrebom probiotskog preparata Bioplus 2B u ishrani prasadi zabeleženo poboljšanje konverzije hrane od 7,7%. Pozitivan efekat upotrebe probiotika na konverziju hrane, navedeni autori objašnjavaju mehanizmima koji se sa velikom verovatnoćom mogu prihvatiti pri tumačenju dobijenih rezultata u izvedenom eksperimentu (proizvodnja enzima i posledično veća svarljivost hranljivih materija, povećanje apsorptivne površine, kao i poboljšan transport hranljivih materija preko četkastog pokrova u sluznici creva, modulacija crevne mikrobiote, smanjen broj mikroorganizama itd.).

#### **6.4. Ispitivanja elektrohemijske reakcije himusa**

Optimalna vrednost elektrohemijske reakcije himusa obezbeđuje efikasno varenje i resorpciju hranljivih materija i stvara nepovoljnu sredinu za razvoj enteropatogenih bakterija. Zheji i sar. (2008) navode da prasad, u periodu neposredno nakon odbijanja, nisu u mogućnosti da proizvedue dovoljne količine hlorovodonične kiseline što rezultira visokim pH u proksimalnom delu gastrointestinalnog trakta. Visoka pH vrednost favorizuje razmnožavanje koliformnih bakterija.

Rezultati ispitivanja elektrohemijske reakcije himusa u jejunumu i cekumu u izvedenom eksperimentu ukazuju da su vrednosti pH u kontrolnoj grupi bile u fiziološkom opsegu koji je zabeležen u ogledima brojnih autora (Amaechi i Njoku, 2013; Hamid i sar., 2011; René i sar., 2001; Clemens i sar., 1975; Tugrul, 1995).

Upotrebom različitih stimulatora rasta, u svim oglednim grupama utvrđene su veće pH vrednosti u himusu isptivanih segmenata tankog, kao i debelog creva u odnosu na odgovarajuće vrednosti zabeležene u kontrolnoj grupi. Navedene razlike nisu dostigle nivo statističke značajnosti ( $p > 0,05$ ). Analizom ostvarenih vrednosti pH u jejunumu i cekumu može se utvrditi da su najveće vrednosti zabeležene u oglednoj grupi koja je putem obroka dobijala preparat probiotika. Dobijeni rezultati ukazuju na pad pH vrednosti od tankog ka debelom crevu u kontrolnoj, kao i svim oglednim grupama. Najizraženije numeričke razlike između vrednosti utvrđenih u jejunumu i cekumu ostvarene su u oglednoj grupi koja je obrokom dobijala preparat prebiotika. Slične rezultate zabeležili su White i sar. (2002) koji su utvrdili povećanje pH vrednosti u fecesu prasadi koja su obrokom dobijala prebiotik u poređenju sa kontrolnom grupom.



**Grafikon 5.** Elektrohemijska reakcija crevnog sadržaja jejunuma i cekuma

Naseljavanjem mlečnokiselinskih bakterija pri korišćenju probiotika proizvode se u većoj meri isparljive masne kiseline koje obezbeđuju kiselu elektrohemijsku reakciju digestivnog trakta (Gilland i Speck, 1977; Sorrels i Speck, 1970; Herrick, 1972) i posledično dovode do bolje svarljivosti hranljivih materija (Lyberg i sar., 2006).

Suprotno navedenim autorima, upotrebom probiotika (*Bacillus subtilis*) u ishrani prasadi Chen i sar. (2005) nisu utvrdili efekat primenjenog tretmana na koncentraciju sirćetne, propionske i buterne kiseline u fecesu. Isti autori navode da je koncentracija navedenih kiselina pokazatelj mikrobne aktivnosti u digestivnom traktu i da je iz navedenog razloga bilo očekivano smanjenje vrednosti pH kao posledica navedenog tretmana. Do sličnih podataka su došli Spriet i sar. (1987) dokazavši da upotreba preparata probiotika (*Bacillus spp.*) nije uticala na koncentraciju fekalnog amonijaka, kao i koncentracije sirćetne, propionske i buterne kiseline u fecesu prasadi. U skladu sa navedenim su i rezultati do kojih su došli Wang i sar. (2009) koji upotrebom 0,05% probiotskog preparata (Bioplus 2B) u ishrani prasadi nisu uočili značajne razlike ( $p > 0,05$ ) u pH vredenosti uzoraka (feces i urin) u odnosu na kontrolnu grupu.

U izvedenom eksperimentu, najveće vrednosti pH zabeležene u grupi koja je putem hrane dobijala probiotik mogu, donekle, biti objašnjene izraženim smanjenjem ukupnog broja bakterija u jejunumu i cekumu tretiranih prasadi. Manji broj bakterija je rezultirao i smanjenjem ukupne mikrobiološke aktivnosti, kao i koncentracije njihovih proizvoda fermentacije. Upotrebom probiotskih bakterija (*Bacillus licheniformis* i *Bacillus subtilis*) moguće je povećati svarljivost hranljivih materija (Meng i sar., 2010; Link i sar., 2007; Hoang, 2011) i smanjiti količinu dostupnog supstrata za fermentabilne procese u kaudalnim delovima digestivnog trakta (cekum), kao i njihovih krajnjih produkata. U skladu sa iznetim rezultatima su i podaci Monica i sar. (2009) koji su utvrdili povećanje ( $p > 0,05$ ) pH vrednosti sadržaja cekuma prasadi koja su obrokom dobijala probiotik, a dobijene vrednosti su se kretale u opsegu 5,72-5,81.

## 6.5. Mikrobiološka ispitivanja creva

Eubioza ostvarena u digestivnom traktu omogućava efikasno varenje i resorpciju hranljivih materija, indukuje promene u strukturi zida creva, povećavajući ujedno i otpornost organizma prema bolestima. Što se tiče profitabilnosti svinjarske proizvodnje, najizraženiji efekat poremećaja mikrobne ravnoteže predstavlja učestala pojava dijareje, što se dešava uglavnom u periodu odbijanja ili u drugim slučajevima iznenadnih promena u ishrani (Ewing i Cole, 1994; Mosenthin, 2003). Diekenhorst (2002) navodi

da sastav obroka direktno ili indirektno utiče na sastav crevne mikrobiote. Međutim, postoje i mnogi drugi stresori koji ometaju ravnotežu između korisnih i patogenih bakterija, (paraziti, mikotoksini, loš kvalitet vode i hrane, vlažnost, NH<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>S, prašina, temperature varijacije, socijalni stres i nedovoljno razvijen digestivni sistem). Navedeni faktori stresa mogu favorizovati proliferaciju i dominaciju patogenih nad korisnim bakterijama u različitim delovima gastrointestinalnog trakta.

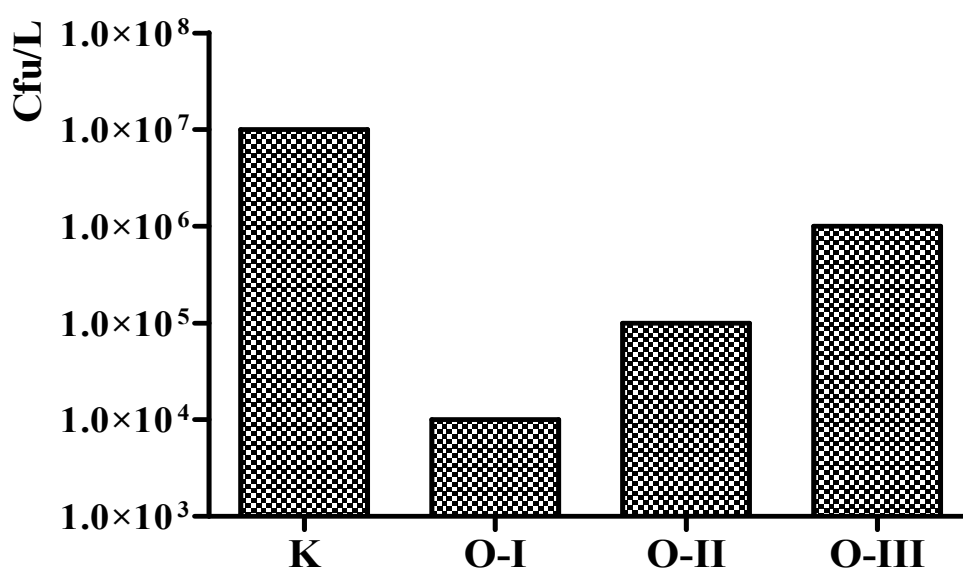
U izvedenom eksperimentu, rezultati mikrobioloških ispitivanja koji se odnose na ukupan prosečan broj bakterija (log CFU/g) u crevnom sadržaju jejunuma ukazuju da su vrednosti zabeležene u kontrolnoj grupi bile u opsegu fizioloških vrednosti (Martin-Orue, 2006; Bederska i Piesyka, 2011). Upotreba različitih stimulatora rasta rezultirala je značajnim smanjenjem prosečnog ukupnog broja bakterija u svim oglednim grupama, s tim da je najizrazitiji efekat ostvaren u grupi sa dodatim probiotikom.

Opisane promene u jejunumu su, takođe, utvrđene i u crevnom sadržaju cekuma, s tim da su navedene razlike bile izražene u manjoj meri. Najmanji prosečan ukupni broj bakterija utvrđen je u grupi prasadi koja je putem hrane dobijala probiotik, dok su u grupama koje su dobijale prebiotik i fitobiotik utvrđene identične vrednosti. Sumirajući dobijene rezultate može se zaključiti da se ukupan broj bakterija u svim ispitivanim grupama povećava od proksimalnih ka distalnim delovima digestivnog trakta, s tim da su navedene promene bile najizraženije u oglednim grupama koje su putem hrane dobijale preparat probiotika i prebiotika.

Dobijeni rezultati nisu u skladu sa podacima Shen i sar. (2009) koji upotrebom prebiotika nisu dokazali značajan uticaj tretmana na ukupan broj aeroba, kao i anaeroba u cekumu prasadi. Podaci navedenih autora su u skladu sa rezultatima Mikkelsen i Jensen (2004) koji upotrebom prebiotika nisu uočili efekat na ukupan broj anaeroba duž ispitivanih delova digestivnog trakta prasadi. U izvedenom eksperimentu, u grupi sa dodatim prebiotikom uočeno je značajno povećanje broja bakterija od jejunuma (10<sup>5</sup>) ka cekumu (10<sup>8</sup>) što se delom može objasniti ulogom upotrebljenog preparata kao hranljivog supstrata za prisutne mikroorganizme. Manan-oligosaharid je predstavljao hranljivi supstrat za rast, u prvom redu, laktobacila čije prisustvo je utvrđeno u većini uzoraka cekuma grupe prasadi sa dodatim prebiotikom.

Jonsson i Conway (1992) navode da *Bacillus spp.* ne predstavlja deo autohtone crevne mikrobiote i da ne kolonizuju lako digestivni trakt prasadi, ali može uticati na

autohtonu mikrobiotu u digestivnom traktu (Spriet i sar., 1987; Kornegay i Risley, 1996) i takmičiti se sa drugim crevnim bakterijama za hranljive materije (Freter, 1992) ili proizvoditi antibakterijske supstance, bakteriocine i njima slične supstance (Hong i sar., 2005). Može se pretpostaviti da je u izvedenom eksperimentu upotreba probiotika rezultirala konkurentnim isključivanjem patogenih vrsta, sprečavajući njihovo vezivanje za epitel creva, kao i proizvodnjom bakteriocina za koje je dokazano da mogu ispoljiti inhibični efekat na rast *E.coli* (Vila i sar., 2010). Snižavanje pH vrednosti, koje se u literaturi navodi kao značajan mehanizam dejstva probiotika protiv patogenih bakterija (Marteu i sar., 2004; Chichlowski i sar., 2007) u izvedenom eksperimentu se ne može prihvatiti kao uzrok navedenih promena, uzimajući u obzir da je izmerena pH vrednost u crevnom sadržaju jejunuma, kao i cekuma bila ujedno i najveća zabeležena vrednost. Najmanji utvrđen ukupan broj bakterija u grupi sa dodatim probiotikom je rezultirao najizraženijim smanjenjem fermentacionih procesa, a samim tim i najmanjom proizvodnjom kiselina, kao i posledično najvećom pH vrednošću. U skladu sa navedenim su i rezultati Marinho i sar. (2007) koji su upotrebom probiotika u ishrani prasadi utvrdili značajno smanjenje koncentracije kratkolančanih masnih kiselina (SCFA) u kolonu prasadi što je, prema autorima, ukazalo na smanjenje mikrobiološke aktivnosti u debelom crevu.



**Grafikon 6.** Prosečan ukupan broj bakterija u jejunumu

Opisani efekti korišćenja preparata fitobiotika u izvedenom eksperimentu nisu u skladu sa rezultatima do kojih je u svom ogledu došao Michiels (2009) koji, upotrebom timola i cinamaldehida u različitim koncentracijama (500 i 2000 mg/kg hrane), nije utvrdio efekat tretmana na ukupan broj bakterija u tankom crevu prasadi. Navedeni rezultat autor je objasnio negativnim uticajem visokog sadržaja suve materije u želucu, kao i brze apsorpcije preparata u proksimalnom delu tankog creva. Pengfei i sar. (2012) upotrebom istog fitobiotika kao u izvedenom eksperimentu utvrdili su značajno ( $p < 0,05$ ) smanjenje ukupnog broja aeroba u sadržaju rektuma, dok je u cekumu navedeni efekat izostao.

Rezultati mikrobioloških ispitivanja koji se odnose na determinisanje prisutne mikroflore ukazuju da je u grupi sa dodatim probiotikom u jejunumu i cekumu najizraženije suprimiran rast vrsta koje pripadaju primarnim bakterijskim patogenima digestivnog trakta (*Brachyspira hyodysenteriae*, *Campylobacter spp.* i *Clostridium perfringens*) uz istovremenu dominaciju bakterija iz rodova *Lactobacillus* i *Bacillus*. Opisani efekti su bili izraženi u manjoj meri pri upotrebi probiotika i fitobiotika. Najizraženiji efekat koji je ostvaren upotrebom fitobiotika odnosi se na potpunu rezistenciju *E.coli* na primenjeni tretman, s tim da je istovremeno izostao i inhibitorski efekat na rast bakterija iz roda *Lactobacillus* čije prisustvo je utvrđeno u većini ispitivanih uzoraka. Dobijeni rezultati nisu u skladu sa podacima Si i sar. (2006) koji su dokazali izraženu antibakterijsku aktivnost cinamaldehida i timola prema *E.coli*, u *in vitro* uslovima u crevnom sadržaju prasadi. Uzimajući u obzir da tokom izvedenog eksperimenta nije došlo do poremećaja zdravstvenog stanja prasadi može se pretpostaviti da je utvrđena *E.coli* pripadala avirulentnom soju na čiji rast upotrebljeni fitobiotik nije ispoljio inhibitorski efekat ili da je nakon resorpcije ili inaktivacije u prethodnim segmentima digestivnog trakta bio prisutan u nedovoljnoj količini. Navedeni rezultati su u skladu sa rezultatima Lee i Ahn (1998) i Burt (2004) koji navode da fenilpropani poput cinamaldehida ispoljavaju slabu inhibitorsku aktivnost protiv *Bifidobacterium longum* ili *Lactobacillus acidophilus*. Slične rezultate su dobili i Michiels i sar., (2009), koji su tokom *in vitro* eksperimenta, simulirajući uslove koji vladaju u različitim delovima gastrointestinalnog trakta prasadi, dokazali jasan selektivni antibakterijski efekat cinamaldehida, kao i neselektivni efekat karvakrola i

timola na crevnu mikrobiotu jejunuma. Upotreba cinamaldehida je rezultirala značajnim smanjenjem broja koliforma u jejunumu, dok je uticaj na broj laktobacila bio neznatan. Upotrebom karvakrola i timola značajno je smanjen, kako broj koliforma, tako i laktobacila u jejunumu. Prilikom dodavanja fitobiotika u hranu za prasadi, neophodno je da aktivni principi održe stabilnu strukturu i koncentraciju u distalnim partijama crevnog trakta, zaobilazeći suviše nizak pH želuca (by pass), što se ostvaruje korišćenjem tehnike mikroinkapsulacije. Na opisan način omogućeno je oslobađanje aktivnih principa tek nakon ulaska u dvanaestopalačno crevo, kao i potpuna razgradnja u distalnim delovima creva. Inkapsulacija doprinosi boljoj stabilnosti preparata fitobiotika u hrani, kao i u životinjskom telu, a samim tim i boljoj bioefikasnosti tokom primene u ishrani prasadi (Piva i sar., 2007). U ogledu koji je sproveo Grilli (2007) upotreba mikroinkapsuliranog timola u ishrani prasadi nije rezultirala promenom u broju laktobacila i *E.coli* u ispitivanom sadržaju jejunuma i cekuma. Sa druge strane, Li i sar. (2012) su upotrebom istog fitobiotika kao u izvedenom eksperimentu utvrdili značajno ( $p < 0,05$ ) veći broj laktobacila, kao i manji broj *E.coli* u fecesu prasadi. Izneti rezultati su u skladu sa rezultatima Namkung i sar. (2004) koji su utvrdili značajno ( $p < 0,05$ ) manji broj koliforma u fecesu prasadi koja su putem hrane dobijala fitobiotik.

Rezultati izvedenog eksperimenta ukazuju da je u grupi sa dodatim fitobiotikom ostvaren snažniji inhibicioni efekat na rast bakterija u jejunumu u odnosu na cekum, gde je utvrđen veći broj prisutnih bakterijskih vrsta. Opisane promene se mogu objasniti apsorpcijom upotrebljenog preparata prilikom pasáže ka distalnim delovima digestivnog trakta kao i njegovim mešanjem sa komponentama hrane za koje je dokazano da mogu negativno uticati na antibakterijsko dejstvo fitobiotika (Gutierrez i sar., 2008). Isti autori navode da je antimikrobna aktivnost esencijalnih ulja veća pri kiseljoj pH vrednosti (veoma visoka aktivnost na pH 5) uled povećanja njihove hidrofobnosti i posledično lakšeg rastvaranja u lipidima ćelijske membrane ciljnih bakterija. Uzimajući u obzir rezultate analize elektrohemiske reakcije u izvedenom ogledu, može se zaključiti da utvrđena pH vrednost u grupi prasadi koja je putem hrane dobijala preparat fitobiotika nije bila razlog izostanka inhibicionog efekata upotrebljenog preparata na rast *E.coli*.

Tokom izvedenog eksperimenta pozitivan uticaj upotrebe preparata probiotika, ostvaren je suprimiranjem rasta primarnih bakterijskim patogenima digestivnog trakta uz istovremenu dominaciju poželjnih bakterija iz rodova *Lactobacillus* i *Bacillus*. Dobijeni

rezultati su u skladu sa podacima Choi i sar. (2011) koji su upotrebom preparata probiotika utvrdili značajno ( $p < 0,05$ ) manji broj koliforma i *Clostridium spp.*, kao i značajno ( $p < 0,05$ ) veći broj laktobacila u fecesu tretirane prasadi. Slične rezultate su dobili i Melanie i sar. (2010), koji su, proučavajući uticaj probiotika, utvrdili značajno smanjenje broja *E.coli* i koliforma u fecesu što je rezultiralo boljim odnosom bakterijske populacije (veći broj laktobacila u odnosu na koliforme). Hoang i sar. (2012), su, takođe, upotrebom različitih preparata probiotika utvrdili smanjenje broja *E.coli*, kao i povećanje broja laktobacila u različitim ispitivanim segmentima creva tretiranih prasadi. Muralidhara i sar. (1977) su prvi predložili koncept utvrđivanja odnosa laktobacili/koliformi pri čemu se širi odnos smatra pokazateljem većeg prisustva poželjnije mikroflore koja treba da obezbedi poboljšan rast životinja. U skladu sa navedenim, Kornegay i Risley (1996) su ispitujući efekte različitih probiotskih proizvoda utvrdili smanjenje ukupnog broja koliforma, kao i povećan broj laktobacila u fecesu prasadi. Sa druge strane, Hoang i sar. (2011) upotrebom probiotske bakterije *Bacillus subtilis* tokom perioda porasta i tova svinja nisu utvrdili promene u broju mlečnokiselinskih bakterija, kao i *E.coli* u ispitivanim uzorcima fecesa. Autori ističu da je efekat navedene probiotske bakterije izraženiji prilikom upotrebe u ranijim fazama odgoja prasadi. Dobijeni rezultati su u skladu sa podacima do kojih je došao Pollmann (1986) pri upotrebi istog probiotika u ishrani krmača. Slične rezultate iznose i Mathew i sar. (1998) koji nisu utvrdili uticaj probiotika na broj laktobacilia i *E.coli* u sadržaju ileuma tretiranih prasadi.

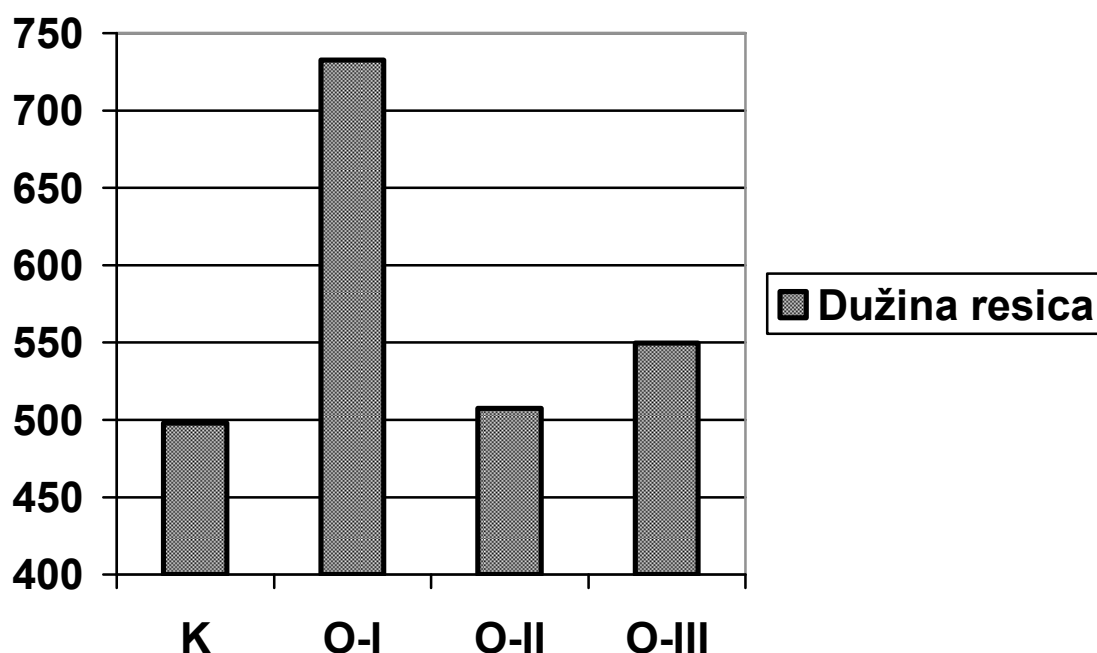
## 6.6. Morfometrijska ispitivanja creva

Prestankom sisanja, usled odbijanja prasadi, prestaje i pozitivan uticaj bioaktivnih supstanci (epidermalni faktor rasta, poliamini, insulin i insulinu slični faktori rasta), kao i glutamina poreklom iz mleka, na održavanje intaktnosti intestinalne sluznice (Lalles i sar., 2009; Xu i sar., 2000; Mosenthin, 1998). Proces odbijanja se odlikuje izraženim morfometrijskim promenama sluznice digestivnog trakta (skraćenje dužine crevnih resica, povećanje dubine kriпти) koje rezultiraju ukupnim smanjenjem sposobnosti creva za varenje i apsorpciju hranljivih materija, što predstavlja



predisponirajući faktor za nastanak malapsorpcije i dijareje (Marion i sar., 2002). Spreuwenberg i sar. (2001) su dokazali da odbijanje prasadi dovodi do povećanja propustljivosti crevne sluznice, pri čemu bakterije i crevni antigeni dospevaju u *lamina propria* i dovode do nastanka inflamacije. Seve i sar. (1986) navode da je razvoj digestivnog trakta prioritetan zadatak u odgoju prasadi.

U izvedenom eksperimentu, na osnovu histološke analize jejunuma može se zaključiti da su prasad kontrolne grupe imala pravilno razvijenu građu ispitivanih segmenata koja je odgovarala njihovoj starosnoj dobi i obezbeđivala optimalnu digestiju i resorpciju hranljivih materija.



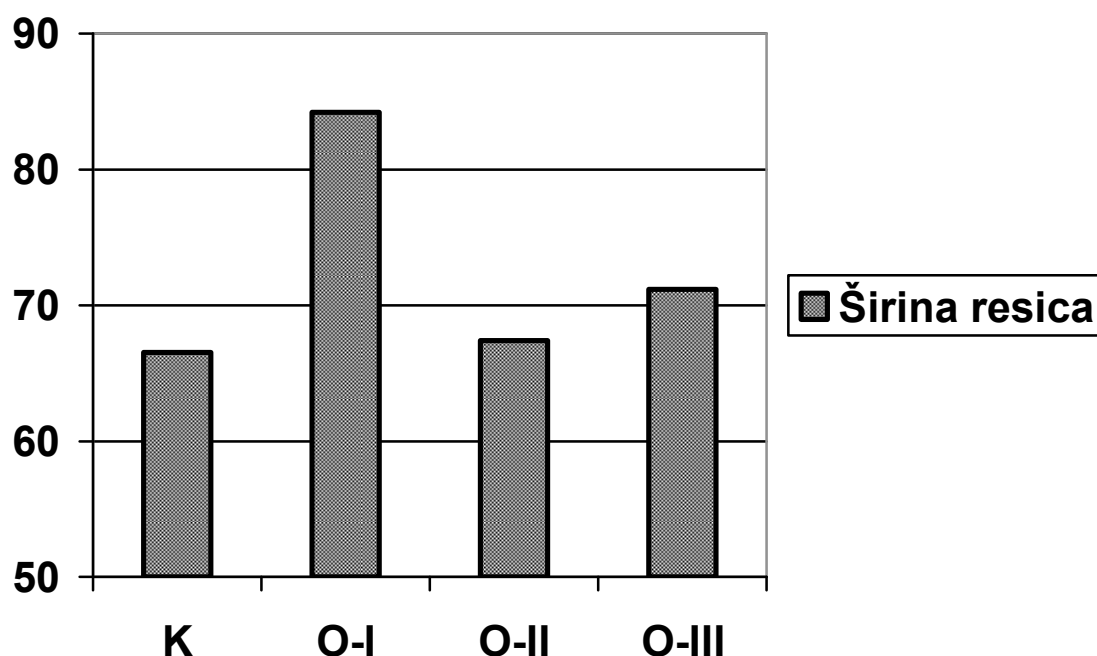
**Grafikon 7.** Dužina crevnih resica u ispitivanim segmentima jejunuma

Upotrebom prebiotika blago su povećana ( $p > 0,05$ ) dužina i širina crevnih resica jejunuma i izrazito povećana dubina kripti u jejunumu ( $p < 0,01$ ) u poređenju sa kontrolnom grupom prasadi. Međusobnim poređenjem ostvarenih rezultata koji se odnose na dubinu kripti u jejunumu ostalih oglednih grupa, najveća vrednost je utvrđena u grupi koja je putem hrane dobijala preparat prebiotika, a najniža u grupi koja je dobijala preparat fitobiotika. Navedene razlike su bile statistički veoma značajne

( $p < 0,001$ ). Izneti rezultati su u potpunosti u skladu sa rezultatima do kojih su došli Poeikhampha i sar. (2011) koji su utvrdili numeričko povećanje dužine resica u jejunumu, kao i statistički značajno ( $p < 0,05$ ) povećanje dubine kripti u jejunumu prasadi koja su putem hrane dobijala manan-oligosaharid. Xu i sar. (2002), kao i Van Nevel i sar. (2003) su utvrdili povećanje dužine crevnih resica kod prasadi koja su u obroku dobijala oligosaharide. Sa druge strane, White i sar. (2002) su uočili numeričko smanjenje dužine crevnih resica kod prasadi koja su u hrani dobijala manan-oligosaharid. Shen i sar. (2009) su izvestili o povećanju dužine resica ali i istovremenom smanjenju dubine kripti u jejunumu prasadi koja su putem hrane dobijala preparat prebiotika. Povećanje dubine kripti je pokazatelj povećane produkcije enterocita i njihove migracije ka vrhu resice. Ubrzana proliferacija ćelija kripti uz smanjenje dužine resica rezultira pojavom nedovoljno zrelih i diferentovanih enterocita koji bivaju odbačeni sa vrha crevne resice pre nego što su u potpunosti razvili svoju maksimalnu enzimsku aktivnost (Pluske i sar., 1996). Powell (1987) navodi da se u tankom crevu hranljive materije, elektroliti i voda apsorbuju u enterocitima na resicama, a elektroliti i voda izlučuju putem sekrecije u ćelijama kripti. Dublje kripe imaju više sekretornih ćelija, što dovodi do povećanja sekrecije a navedene promene mogu dovesti i do pojave dijareje. Razmatrajući podatke dobijene u izvedenom eksperimentu, a koji se odnose na statistički značajno povećanje dubine kripti u jejunumu u ogleđnoj O-II grupi sa dodatim prebiotikom, može se zaključiti da su u kriptama bili izraženiji apsorpcioni nego sekretorni procesi ili da sekretorni procesi nisu bili izraženi u meri u kojoj bi uzrokovali nastanak proliva. Nabuurs i sar. (1993) navode pozitivnu korelaciju između dubine kripti i dužine crevnih resica. Nove ćelije prisutne u kriptama rezultiraju stvaranjem novih enterocita koji ostaju na vrhu crevne resice bez obzira na prisustvo novih ćelija u kripti. Na ovaj način povećan broj enterocita rezultira povećanjem apsorptivne površine crevnog epitela.

U izvedenom eksperimentu upotrebom fitobiotika opisani efekti na morfometrijske osobine crevnih resica jejunuma se potenciraju. Korišćenje fitobiotika rezultiralo je povećanjem dužine i širine resica, kao i smanjenjem dubine kripti u odnosu na kontrolnu grupu, s tim da navedene razlike nisu bile statistički značajne ( $p < 0,05$ ). Dobijeni rezultati su u potpunosti u skladu sa podacima do kojih su došli Pengfei i sar. (2012) koji su uočili numerički porast dužine resica i neznatno smanjenje

dubine kripti u jejunumu prasadi koja su putem hrane dobijala identičan preparat fitobiotika. Takođe, upotrebom fitobiotika (timol, cinamaldehyd, karvakrol) u ishrani prasadi Namkung i sar. (2004) su dokazali pozitivan uticaj tretmana na dužinu crevnih resica kao i smanjenje dubine kripti ( $p > 0,05$ ) u odnosu na kontrolnu grupu. Slične rezultate navode Nofrarias i sar. (2006) koji su korišćenjem fitobiotika (karvakrol i cinamaldehyd) u ishrani odbijene prasadi utvrdili povećanje dužine i širine crevnih resica, ali i dubine kripti u jejunumu, s tim da razlike nisu bile statistički značajne ( $p > 0,05$ ) u poređenju sa kontrolnom grupom. U skladu sa navedenim su i podaci Manzanila i sar. (2006) koji su utvrdili povećanje dužine crevnih resica, kao i dubine kripti ( $p > 0,05$ ) u jejunumu prasadi koja su putem hrane dobijala fitobiotik (cinamaldehyd i karvakrol). Upotrebom timola u ishrani prasadi u ogledu koji je sproveo Grilli (2007) zabeleženo je neznatno povećane ( $p > 0,05$ ) dužine resica i dubine kripti u jejunumu u odnosu na kontrolnu grupu. Do sličnih rezultata je došao i Michiels (2009) analizirajući završni deo tankog creva prasadi koja su putem hrane dobijala 500 mg/kg hrane timola. Sa druge strane Kroismayr i sar. (2008) su opisali trend smanjenja dužine i širine crevnih resica u jejunumu nakon upotrebe fitobiotika (timol, karvakrol, anetol i limonen) u ishrani odbijene prasadi.

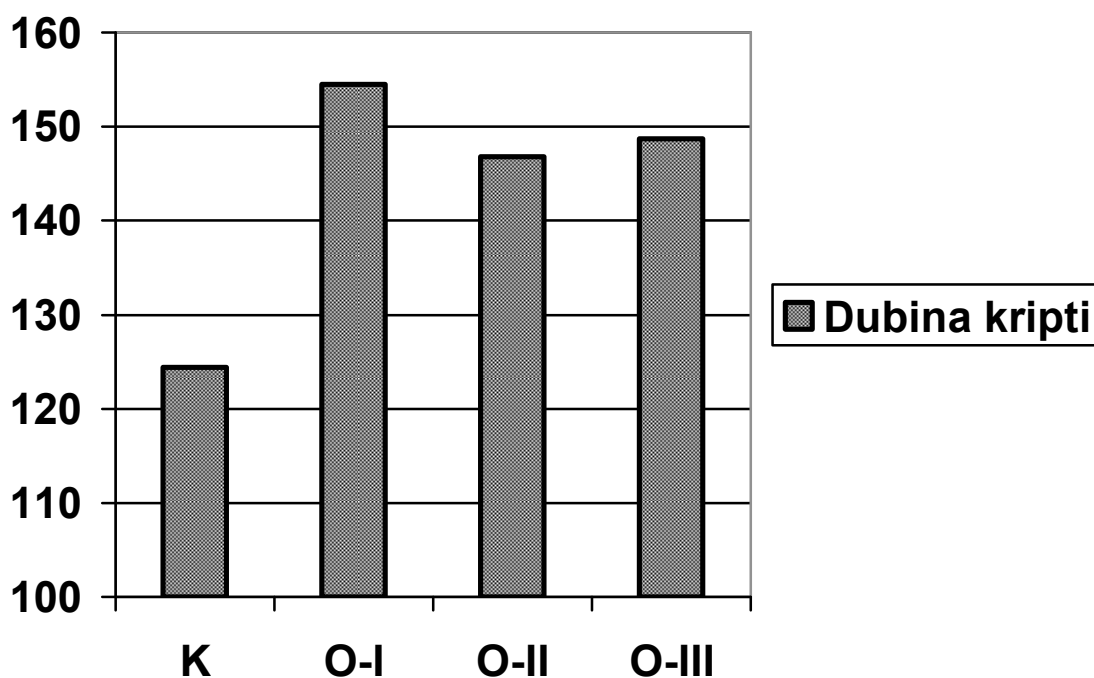


**Grafikon 8.** Širina crevnih resica u ispitivanim segmentima jejunuma

Upotreba probiotika u izvedenom eksperimentu rezultirala je najizraženijim morfometrijskim promenama ispitivanih segmenata jejunuma. Dužina i širina resica u ispitivanim histološkim uzorcima jejunuma bili su statistički značajno ( $p < 0,001$ ) veći u grupi sa dodatim probiotikom u odnosu na kontrolnu, kao i u odnosu na ostale ogledne grupe, ukazujući na nedvosmislen pozitivan uticaj probiotika na morfološke karakteristike creva. Velika crevna površina sa optimalnom funkcionalnom zrelošću enterocita predstavlja bitan preduslov za maksimalnu digestiju i resorpciju hranljivih sastojaka a time i za postizanje optimalnih proizvodnih rezultata (Cera i sar., 1988). Dubina kripti u jejunumu bila je numerički veća u grupi koja je obrokom dobijala probiotik u odnosu na kontrolnu i grupu sa dodatim fitobiotikom, s tim da navedene razlike nisu bile statistički značajne ( $p > 0,05$ ). Dobijeni rezultati su u skladu sa podacima Giancamillo i sar. (2008) koji su utvrdili povećanje dužine crevnih resica, kao i dubine kripti u ileumu prasadi koja su putem hrane dobijala preparat probiotika (*Pediococcus acidilactici*). U ogledu koji su sproveli Marinho i sar. (2007a) upotrebom probiotika u ishrani odbijene prasadi utvrđeno je povećanje dužine, ali ne i širine crevnih resica u jejunumu. Sa druge strane, Enrique i sar. (2005) su dokazali statistički značajno smanjenje ( $p < 0,05$ ) dužine resica u jejunumu prasadi koja su dobijala preparat probiotika (Bioplus 2B) putem hrane tokom 7 dana, da bi se nakon 14 dana uočilo oporavljanje resica čija dužina se više nije statistički značajno razlikovala od kontrolne grupe. Dijk i sar. (2001) navode da adekvatan unos kvalitetne hrane može uticati na povećanje mitotske aktivnosti ćelija i povećanja dužine crevnih resica, dok su inflamatorni procesi odgovorni za smanjenje dužine resica (Rossi i sar., 2008). U izvedenom eksperimentu, upotrebom probiotika suprimiran je rast vrsta koje pripadaju primarnim bakterijskim patogenima. Na ovaj način je smanjena proizvodnja toksina koji dovode do smanjenja dužine crevnih resica.

Na osnovu dobijenih podataka koji se odnose na morfometrijske karakteristike cekuma uočava se značajan, pozitivan uticaj primenjenih tretmana na dubinu kripti. Upotrebom prebiotika ostvarena je statistički značajno veća ( $p < 0,05$ ) dubina kripti u odnosu na kontrolnu grupu prasadi. Rossi i sar. (2008) navode da isparljive masne kiseline (buterna), nastale fermentacijom oligosaharida, mogu biti odgovorne za poboljšanje morfoloških karakteristika creva prasadi koja su putem hrane dobijala prebiotik. Gibson i Roberfroid (1995) navode značaj upotrebe prebiotika kao

selektivnog supstrata za rast i razmnožavanje poželjnih bakterija (*Bifidobacterium* i *Lactobacillus*) uz posledičnu proizvodnju SCFA, što rezultira povećanjem ćelijske proliferacije i produblivanjem kripti.



**Grafikon 9.** Dubina kripti u ispitivanim segmentima cekuma

Upotrebom fitobiotika u izvedenom eksperimentu opisani efekti se potenciraju a razlike postaju numerički izraženije, s tim da je nivo statističke značajnosti ( $p < 0,05$ ) na istom nivou kao i prilikom upotrebe prebiotika. Navedeni rezultati su donekle u skladu sa podacima do kojih je došao Grilli (2007) utvrdivši da je dubina kripti u cekumu bila veća ( $p > 0,05$ ) u grupi prasadi koja su putem hrane dobijala timol u odnosu na kontrolnu grupu. Nasuprot navedenim podacima, Manzanila i sar. (2006) su utvrdili smanjenje dubine kripti ( $p > 0,05$ ) u kolonu prasadi koja su putem hrane dobijala preparat fitobiotika (cinamaldehyd i karvakrol). Slične rezultate su izneli Nofrarias i sar. (2006) koji su upotrebom fitobiotika (karvakrol i cinamaldehyd) u ishrani odbijene prasadi utvrdili smanjenje ( $p > 0,05$ ) dubine kripti u kolonu, a Kroismayr i sar. (2008) upotrebom fitobiotika (timol, karvakrol, anetol i limonen) smanjenje ( $p > 0,05$ ) dubine kripti u cekumu tretiranih prasadi. Navedeni autori su dobijene rezultate objasnili povećanjem

svarljivosti hranljivih materija pre ulaska crevnog sadržaja u cekum, što smanjuje fermentabilne procese i dovodi do smanjene ćelijske proliferacije u kriptama.

Najizraženiji pozitivni efekti u izvedenom eksperimentu su zabeleženi u grupi prasadi koja je putem hrane dobijala preparat probiotika. Utvrđene vrednosti dubine kripti u cekumu u grupi sa dodatim probiotikom bile su statistički značajno veće ( $p < 0,01$ ) u odnosu na kontrolnu grupu. Međusobnim poređenjem ostvarenih rezultata koji se odnose na dubinu kripti u cekumu ostalih oglednih grupa nisu uočene statistički značajne razlike ( $p > 0,05$ ). Do sličnih rezultata su došli Giancamillo i sar. (2008) koji su utvrdili povećanje dubine kripti u cekumu prasadi koja su putem hrane dobijala preparat probiotika (*Pediococcus acidilactici*). Povećanjem dubine kripti, upotrebom alternativnih stimulatora rasta, omogućena je veća apsorptivna površina u debelom crevu ispitivanih prasadi. Debelo crevo je terminalno mesto apsorpcije elektrolita i vode pre ekskrecije, a u cilju održanja homeostaze elektrolita, neophodne su kompleksne interakcije između sekretornih i apsorptivnih procesa. Rezultati ranijih istraživanja su upućivali na pretpostavku da su sekrecija i apsorpcija dva posebna, odvojena procesa povezana ili sa kriptama ili površinskim ćelijama (enterocitima), dok Welsh i sar. (1982) ističu da kripe u kolonu imaju dominantnu sekretornu funkciju. Međutim, Naftalin i sar. (1995) ističu da kripe u kolonu luče tečnost samo kada su izložene pojedinim stimulativnim materijama, dok pri normalnim fiziološkim uslovima, one imaju apsorptivnu funkciju. Novija istraživanja (Geibel, 2005) ukazuju da i ćelije na površini sluznice i ćelije kripti mogu obavljati sekretorne i apsorpcione funkcije, odnosno da se ove funkcije mogu obavljati istovremeno. Navedeno pitanje se dovodi u vezu sa pojavom sekretorne dijareje, i koristi se u razvijanju novih strategija u prevenciji i lečenju crevnih poremećaja. Sharma i sar. (1995) su dokazali da uticaj obroka na dubinu kripti odražava promene u crevnoj mikrobioti koja utiče na stepen obnove ćelija epitela jer je mikrobiota jedan od glavnih modulatora aktivnosti epitelnih ćelija. Takashi i sar. (1987) ukazuju na stimulativan uticaj kratkolančanih masnih kiselina (SCFA), kao krajnjeg proizvoda bakterijske fermentacije vlakana u crevima, na proliferaciju epitelnih ćelija creva navodeći redosled njihove važnosti (buterna > propionska > sirćetna kiselina). Slične rezultate iznose i Montagne i sar. (2003) ukazujući na izražen trofički efekat buterne kiseline na proliferaciju epitelnih ćelija. U studiji Jin i sar. (1994) utvrđeno je da je dubina kripti u cekumu veća kod prasadi koja

su dobijala obrok bogat vlaknima u poređenju sa grupom prasadi hranjenih obrokom sa niskim nivoom vlakana. Smanjen broj patogenih bakterija u crevima rezultira povećanjem proliferacije epitelnih ćelija i posledično poboljšanom morfologijom creva (Mourao i sar., 2006). Analizirajući rezultate dobijene mikrobiološkom analizom, kao i rezultate morfometrijskih karakteristika cekuma u izvedenom eksperimentu, uočava se da je najveća dubina kripti zabeležena u grupi sa dodatim probiotikom u kojoj je broj ukupnih bakterija bio najmanji ( $10^7$ ). Sa druge strane rast bakterijskih vrsta koje pripadaju primarnim bakterijskim patogenima suprimiran je dominacijom rodova *Lactobacillus* i *Bacillus*. Iako tokom oglada nije merena koncentracija SCFA, navedene bakterije su mogle doprineti njihovoj povećanoj proizvodnji i posledično povećati dubinu kripti.

## 7. ZAKLJUČAK

Na osnovu rezultata dobijenih u izvedenom ogledu mogu da se izvedu sledeći zaključci:

- 1) Kontrolna grupa prasadi hranjena smešama bez dodatog stimulatora rasta postigla je uobičajenu telesnu masu, dnevni prirast, konzumaciju i konverziju hrane za datu rasu, starost i uslove držanja.
- 2) Korišćenjem stimulatora rasta postignuti su bolji proizvodni rezultati u odnosu na kontrolnu grupu, s tim da je upotreba probiotika rezultirala najboljim proizvodnim rezultatima zasnovanim na najvećoj postignutoj telesnoj masi ( $27,98 \pm 4,76$  kg), najvećem ostvarenom prosečnom dnevnom prirastu ( $0,49 \pm 0,09$  kg) i najboljoj konverziji hrane (1,959).
- 3) Upotrebom fitobiotika i prebiotika postignuti su nešto slabiji proizvodni rezultati u odnosu na grupu prasadi hranjenih probiotikom, ali bolji u odnosu na kontrolnu grupu prasadi.
- 4) Obrokom se utiče na tri načina na održavanje eubioze i to dodavanjem živih mikroorganizama koji nakon ingestije postaju metabolički aktivni (probiotici), dodavanjem hraniva koja sadrže nesvarljive sastojke i stimulišu rast i/ili aktivnost poželjne mikroflore (prebiotici) ili upotrebom etarskih ulja i/ili njihovih aktivnih principa sa dokazanim selektivnim antimikrobnim dejstvom (fitobiotici).
- 5) Korišćenjem prirodnih stimulatora rasta smanjuje se ukupan broj bakterija u digestivnom traktu prasadi čime se povećava dostupnost hranljivih materija domaćinu, s tim da je ispitivani efekat bio najizraženiji u grupi prasadi koja je putem hrane dobijala probiotik.



- 6) Dodavanjem stimulatora rasta u hranu ostvaruje se pozitivan efekat na morfometrijske karakteristike sluznice creva povećanjem dužine i širine resica u jejunumu, kao i povećanjem dubine kripti u cekumu čime se povećava resorptivni kapacitet crevne sluznice.
- 7) Upotreba probiotika rezultirala je najvećom dužinom crevnih resica u jejunumu, kao i najvećom dubinom kripti u cekumu.
- 8) Korišćenje probiotika, prebiotika i fitobiotika kao alternativnih mogućnosti u stimulaciji rasta i kontroli eneteropatogenih bakterija ima svoje nutritivno, medicinsko i ekonomsko opravdanje.

**8. SPISAK LITERATURE**

- 1) Adachi Y., Okazaki M., Ohno N., Yadomae T., 1994. Enhancement of cytokine production by macrophages stimulated with 1-3-beta-D-glucan, Grifolan (Grn), isolated from *Grifola frondosa*. *Biol. Pharm. Bull.*, 17: 1554-1560.
- 2) Adeola O. and King D. E., 2006. Developmental changes in morphometry of the small intestine and jejunal sucrase activity during the first nine weeks of postnatal growth in pigs. *J. ANIM. SCI.*, 84:112-118
- 3) AEC Tables (1993). Recommendation for Animal Nutrition. 6th Edition, Rhone - Poulenc, France.
- 4) Ahrens F., Shmitz M., Warlies B., 1992. Mikrobieller Zusatzstoff in der Ferkelfütterung. *Kraftfutter*, 75, 418-420.
- 5) Aitken I. D., 1984. Structural and functional damage caused by viral infection of the small intestine. In: R. M. Batt and T.L.J. Lawrence (Ed.) *Function and Dysfunction of the Small Intestine*. P 219. Biddles Ltd., Guildford and King's Lynn, U.K.
- 6) Ait-Ouazzou A., Cherrat L., Espina L., Lorán S., Rota C., Pagán R., 2011. The antimicrobial activity of hydrophobic essential oil constituents acting alone or in combined processes of food preservation. *Innov. Food Sci. Emerg.*, 12, 320–329.
- 7) Al-Dewachi H.S., Wright N.A., Appleton D.R., Watson A.J., 1975. The effect of starvation and refeeding on cell population kinetics in the rat small bowel mucosa. *J. Anat.* 119, 105- 121.
- 8) Alexopoulos C., Georgoulakis I. E., Tzivara A., Kritas S. K., Siochu A., Kyriakis S. C., 2004. Field evaluation of the efficacy of a probiotic containing *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* spores, on the health status and performance of sows and their litters. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, Volume 88, Issue 11-12, pages 381–392.
- 9) Algers B., 1984a. Animal health in flatdeck rearing of weaned piglets. *Zentralbl. Veterinaermed. Reihe A*, 31: 1-13.
- 10) Algers B., 1984b. Early weaning and cage rearing of piglets: Influence on behaviour. *Zentralbl. Veterinaermed. Reihe A*, 31: 14-24.
- 11) Altmann G.G., 1972. Influence of starvation and refeeding on mucosal size and epithelial renewal in the rat small intestine. *Am. J. Anat.* 133, 391-400.
- 12) Amaechi N. and Njoku U.P., 2013. Growth performance and haematological parameters of weanling pigs fed diets supplemented with chloroacetic acid. *Online J. Anim. Feed Res.*, 3(4): 189-192.
- 13) Arambawela W. J., Nielsen H. E., Danielsen V. and Eggum B. O., 1975. Effect of replacing barley with tapioca meal at two different levels of feeding on the growth and health of early weaned pigs. *Livest. Prod. Sci.* 2: 281-288.
- 14) Arunachalam K., Gill H.S. and Chandra R.K., 2000. Enhancement of natural immune function by dietary consumption of *Bifidobacterium lactis* (HN019). *Eur J Clin Nutr* 54, 263-267.
- 15) Ašanin R., Krnjaić D., Milić N., 2006. Priručnik sa praktičnim vežbama iz mikrobiologije sa imunologijom. Autorsko izdaje.

- 16) Aumaitre A., Peiniau J. and Madec F., 1995. Digestive adaptation after weaning and nutritional consequences in the piglet. *Pig News and Information* 16, 73-79N.
- 17) Baber D.W. and Coblenz B.E., 1987. Diet, nutrition and conception in feral pigs on Santa Catalina island. *Journal of Wildlife Management* 51, 306-317.
- 18) Bailey S., 1987. Factors affecting microbial competitive exclusion in poultry. *Food Technol.*, 41, 88-92.
- 19) Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M., 2008. Biological effects of essential oils – a review. *Food and Chemical Toxicology* 46 446–475.
- 20) Ball' R. O. and Aherne F. X., 1982. Effect of diet complexity and feed restriction on the incidence and severity of diarrhea in early-weaned pigs. *Can. J. Anim. Sci.* 62: 907-913.
- 21) Balz R., 1999. *The Healing Power of Essential Oils*, 1st ed.; Lotus Press: Twin Lakes, WI, USA, pp. 27–80.
- 22) Bederska Lojewska D., Pieszka M., 2011. Modulating gastrointestinal microflora of pigs through nutrition using feed additives. *Ann. Anim. Sci.*, Vol. 11, No. 3, 333–355.
- 23) Berg R. D., 1996. The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiol* 4:430-435.
- 24) Bernet M. F., Brassart D., Neeser J. R., and Servin A. L., 1994. *Lactobacillus acidophilus* LA binds to cultured human intestinal cell lines and inhabits cell attachment and invasion by enterovirulent bacteria. *Gut* 35:483-489.
- 25) Bertschinger H.U. and Eggenberger E., 1978. Evaluation of low nutrient, high fibre diets for the prevention of porcine *Escherichia coli* enterotoxaemia. *Veterinary Microbiology* 3, 281-290.
- 26) Bird AR, Vuaran M., Crittenden R., Hayakawa T., Playne MJ., Brown IL., Topping DL., 2009. Comparative effects of a high-amylose starch and a fructooligosaccharide on fecal *bifidobacteria* numbers and short-chain fatty acids in pigs fed *Bifidobacterium animalis*. *Dig Dis Sci.*54:947-54.
- 27) Blankenship L. C., Cox N. A., Bailey J. S., Stern, N. J., 1990. Competitive exclusion cultures in chickens. U: Biozyme Service Through Science Technical Symposium, St. Joseph, MO, 37.
- 28) Blecha F., Pollmann DS., Nichols DA., 1983. Weaning pigs at an early age decreases cellular immunity. *Journal of Animal Science*, 56, (2):396-400]
- 29) Blomberg L., Henriksson A., and Conway P. L., 1993. Inhibition of adhesion of *Escherichia coli* K88 to piglet ileal mucus by *Lactobacillus* spp. *Appl. Environ. Microbiol* 59:34-39.
- 30) Bolduan G., Jung H., Schnabel E. and Schneider R., 1988. Recent advances in the nutrition of weaner piglets. *Pig News and Information* 9, 381-385.
- 31) Bontempo V., Giancamillo Di A., Savoini G., Dell'Orto V., Domeneghini C., 2006. Live yeast dietary supplementation acts upon intestinal morphofunctional aspects and growth in weanling piglets. *Anim Feed Sci Technol* 129, 224–236.
- 32) Boyle W., 1955. Spices and essential oils as preservatives. *The American Perfumer and Essential Oil Review* 66, 25– 28.
- 33) Brady D., Stoll A. D., Starke L., and Duncan J. R., 1994. Chemical and enzymatic extraction of heavy metal binding polymers from isolated cell walls of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.*44:297–302.

- 34) Brandtzaeg P. E., 2002. Current understanding of gastrointestinal immunoregulation and its relation to food allergy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 964:13-45.
- 35) Brashears M.M., Reilly S.S. and Gilliland S.E., 1998. Antagonistic action of cells of *Lactobacillus lactis* toward *Escherichia coli* O157:H7 on refrigerated raw chicken meat. *J Food Prot* 61, 166-170.
- 36) Brito Bermudez M., Plaza-Díaz J., Muñoz-Quezada S., Gómez-Llorente C., Gil A., 2012. Probiotic Mechanisms of Action. *Ann. Nutr. Metab*; 61:160–174.
- 37) Brook I., 1999. Bacterial interference. *Crit. Rev. Microbiol.* 25:155-172.
- 38) Brooks P.H. and Tsourgiannis I., 2003. In: Pluske, J. Le Dividich, M.W.A. Verstegen 2003. Weaning the pig—concepts and consequences. Wageningen Academic Publishers The Netherlands.
- 39) Brown D.C., Maxwell C.V., Davis M.E., Singh S., 2002a. Effect of segregated early weaning on growth performance and immune parameters. *J. Anim. Sci.* 80 (Suppl. 1), 197.
- 40) Brown M., 2011. Modes of action of probiotic. Recent developments. *Journal of animal and veterinary advances*, 10 (14) 1895-1900.
- 41) Bruininx E.M., van der Peet-Schwering CM., Schrama J.W., Vereijken P.F., Vesseur P.C., Everts H., den Hartog L.A. & Beynen A.C., 2001. Individually measured feed intake characteristics and growth performance of group housed weanling pigs: effects of sex, initial body weight, and body weight distribution within groups. *Journal of Animal Science* 79, 301–308.
- 42) Buddle R. and Bolton J. R., 1992. The pathophysiology of diarrhoea in pigs. *Pig News Info.* 13:41N-45N.
- 43) Bula S., Ositis U, Strikauska S. and Degola Li., 2012. Impact of Probiotic Supplement on the Weight Lose of Sows and Weaning Weight of Piglet. *Journal of Environmental Science and Engineering A* 1 1122-1129.
- 44) Burt S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of Food Microbiology* 94, 223-253.
- 45) Carson C.F., Mee B.J., Riley T.V., 2002. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46 (6), 1914–1920.
- 46) Castillo M., Martín-Orúe S. M., Roca M., Manzanilla E. G., Badiola I., Perez J. F. and Gasa J., 2006. The response of gastrointestinal microbiota to avilamycin, butyrate, and plant extracts in early-weaned pigs. *J ANIM SCI*, 84:2725-2734.
- 47) Cécile C., Stamataki D. and Lewis J., 2006. Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. *Nature Publishing Group*, volume 7, 349-351.
- 48) Cera K.R., Mahan D.C., Cross R.F., Reinhart G.A. and Whitmoyer R.E., 1988. Effect of age, weaning and postweaning diet on small intestinal growth and jejunal morphology in young swine. *Journal of Animal Science* 66, 574-584.
- 49) Chen Y. J., Son K. S., Min B. J., Cho J. H., Kwon O. S. and Kim I. H., 2005. Effects of Dietary Probiotic on Growth Performance, Nutrients Digestibility,

- Blood Characteristics and Fecal Noxious Gas Content in Growing Pigs. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*. Vol 18, No. 10: 1464-1468.
- 50) Chen Y.J., Kim I.H., Cho J.H., Yoo J.S., Wang Y., Huang Y., Kim H.J., Shin S.O., 2009. Effects of chitooligosaccharide supplementation on growth performance, nutrient digestibility, blood characteristics and immune responses after lipopolysaccharide challenge in weanling pigs. *Livestock Science* 124, 255–260.
  - 51) Chichlowski M., Croom J., Mc Bride B.W., Havenstein G. B. and Koci M. D., 2007. Metabolic and physiological impact of probiotics or direct-fed-microbials on poultry. A brief review of current knowledge. *Int.J.Poult.Sci.*, 6:694-704.
  - 52) Cho J. H., Chen Y. J., Min B. J., Kim H. J., Kwon O. S., Shon K. S., Kim I. H., Kim S. J. and Asamer A., 2006. Effects of essential oils supplementation on growth performance, IgG concentration and fecal noxious gas concentration of weaned pigs. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* Vol 19, No. 1 : 80-85.
  - 53) Cho J.H., Zhao P. Y, and Kim I. H., 2011. Probiotics as a Dietary Additive for Pigs: A Review. *Journal of Animal and Veterinary Advances* Volume: 10, Issue: 16, Page No.: 2127-2134.
  - 54) Choi J.Y., Shinde P.L., Ingale S.L., Kim J.S., Kim Y.W., Kim K.H., Kwonb I.K., Chae B.J., 2011. Evaluation of multi-microbe probiotics prepared by submerged liquid or solid substrate fermentation and antibiotics in weaning pigs *Livestock Science* 138, 144–151
  - 55) Clemens E. T., Stevens C. E. and Southworth M., 1975. Sites of organic acid production and pattern of digesta movement in the gastrointestinal tract of swine. *J. Nutr.* 105:759-768.
  - 56) Close W.H., 2000. Producing pigs without antibiotic growth promoters. *Adv. Pork Prod.*, 11:47–56
  - 57) Coates, M. E., Fuller R., Harrison G. F., Lev M., and Suffolk S. F., 1963. A comparison of the growth of xhicks in the Fustafsson germ-free apparatus and in a conventional environment, with and without dietary supplements of penicillin. *Br. J. Nutr.* 17:141-151.
  - 58) Conner, D. E., and Beuchat L. R., 1984. Effect of essential oils from plants on growth of food spoilage yeasts. *J Food Sci* 49: 429-434.
  - 59) Conway P. L., 1994. Function and regulation of the gastrointestinal microbiota of the pig. EAPP publication 2:231-240.
  - 60) Conway P. L., 1997. Development of intestinal microbiota. Gastrointestinal microbes and host interactions. In: Mackie, R. I., Whyte, B. A. and Isaacson, R. E., eds. *Gastrointestinal Microbiol.*, vol. 2. Chapman and Hall, London.
  - 61) Corcionivoschi N., Drinceanu D., Stef L., Luca I., Călin J., Mingyart O., 2010. Probiotics – identification and ways of action. *Innovative Romanian Food Biotechnology* 6, 1-11.
  - 62) Corrier D. E., Nisbet D. J., Scanlan C. M., Tellez G., Hargis B. M., Deloach J. R., 1994. Inhibition of *Salmonella enteritidis* cecal and organ colonization in Leghorn chicks by a defined culture of cecal bacteria and dietary lactose. *J. of Food Prot.*, 56: 377-381.

- 63) Cosentino S., Tuberoso C.I.G., Pisano B., Satta M., Mascia V., Arzedi E., Palmas F., 1999. In vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils. *Letters in Applied Microbiology* 29, 130–135.
- 64) Cotter P. F., Sefton A. E., Lilburn M. S., 2002. Manipulating the immune system of layers and breeders: novel applications of mannan oligosaccharides. *Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries. Proceedings of Alltech's 18th Annual Symposium*, 21-28.
- 65) Council Directive 2008/120/EC of 18 December 2008, laying down minimum standards for the protection of pigs. *Official Journal of the European Union*.
- 66) Counsilman J.J. and Lim L.M., 1985. The definition of weaning. *Anim. Behav.*, 33: 1023-1024.
- 67) Cox S.D., Mann C.M., Markham J.L., Bell H.C., Gustafson J.E., Warmington J.R., Wyllie S.G., 2000. The mode of antimicrobial action of essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology* 88:170–175.
- 68) Cui C., Shen C.J., Jia G. and Wang K.N., 2013. Effect of dietary bacillus subtilis on proportion of *Bacteroidetes* and *Firmicutes* in swine intestine and lipid metabolism. *Genetics and Molecular Research* 12 (2): 1766-1776.
- 69) Cummings J.H. and Macfarlane G. T., 1997. Roles of intestinal bacteria in nutrient metabolism. *J. Parenteral External Nutr.*, 21:357-365.
- 70) Danielsen V., Holmgard P., Luno S. and Petersen. P. K., 1975. *Produktionssystemer i svineholdet 19 27 Landbrugets Informationskontor, Tune, Denmark. (As cited by Nielsen (1976).)*
- 71) Danielsen V., Nielsen H.E., 1979. Inflydelse af tidlig fravaenning på søernes reproduction og smågrisenens udvikling. *Statens Huisdyrbrugsforsøg, Medd. No 290.*
- 72) Davidson P. M., 1997. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds, p. 520-556. In M. P. Doyle, L. R. Beuchat, and T. J. Montville (eds), *Food microbiology fundamentals and frontiers*, ASM Press, New York, USA.
- 73) Davis M. E., Maxwell C. V., Brown D. C., de Rodas B. Z., Johnson Z. B., Kegley E. B., Hellwig D. H., and Dvorak R. A., 2002. Effect of dietary mannan oligosaccharide and(or) pharmacological additions of supplemental copper on growth performance and immunocompetence of weanling and growing/finishing pigs. *J. Anim. Sci.* 80:2887–2894.
- 74) Davis M. E., Maxwell C. V., Kegley E. B., de Rodas B. Z., Friesen K. G., Hellwig D. H., Johnson, Z. B. and Kellogg D. W., 2000. Efficacy of mannan oligosaccharide (Bio-Mos®) addition at two levels of supplemental copper on performance and immunocompetence of early weaned pigs. *Arkansas Agric. Exp. Sta. Res. Series.* 470:15–18.
- 75) Degola L., Bula S., 2012. Probiotic Bioplus 2B effect on sows productivity and piglets weight. *Lucrări Științifice - Seria Zootehnie*, vol. 57.
- 76) Delaquis P.J., Stanich K., Girard B., Mazza G., 2002. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *International Journal of Food Microbiology* 74, 101–109.
- 77) Delzenne N. M. & Roberfroid M. B., 1994. Physiological effects of non-digestible oligosaccharides. *Lebensm. Wiss. Technol.* 27:1-6.

- 78) Demigne C., Yacoub C., Remezy C., & Fafournoux P., 1986. Effects of absorption of large amounts of volatile fatty acids on rat liver metabolism. *J. Nutr.* 116: 77-86.
- 79) Diekenhorst A., 2002. Alternativen zu konventionellen Leistungsförderern. *Großtierpraxis* 3:32-37.
- 80) Dijk Van A.J., Niewold T.A., Margry R.J.C.F., Van Den Hoven S.G.C., Nabuurs M.J.A., Stockhofe-Zurwieden N., Beynen A.C., 2001. Small intestinal morphology in weaned piglets fed a diet containing spray-dried porcine plasma. *Research in Veterinary Science* (accepted for publication, available online at <http://www.idealibrary.com> doi: 10.1053).
- 81) Djolai M., Somer Lj., Damjanov D., Hadnadjev Lj., Krnojelac D., 1998. Volume density of intestinal glands in clinical remission of ulcerative colitis. *Folia Anatomica*, 26, 56-57
- 82) Dorman H. J. and Deans S. G., 2000. Antimicrobial aspects from plants; antimicrobial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.* 88:308-16.
- 83) Dorshow S. T. and Levitt M. D., 1986. Gaseous response to ingestion of a poorly absorbed fructooligosaccharide sweetener. *Food Chem.* 22: 46-61.
- 84) Drasar B. S., Jenkins D.J.A. & Cummings J. H., 1976. The influence of a diet rich in wheat fibre on the human faecal flora. *J. Med. Microbiol.* 9: 423-431.
- 85) Dréau D., Lallès J.P., Philouze-Romé V., Toullec R., Salmon H., 1994. Local and systemic immune responses to soybean protein ingestion in early weaned pigs, *J. Anim. Sci.* 72: 2090–2098
- 86) Dritz S.S., Chengappa M.M., Nelssen, J.L., Tokach M.D., Goodband R.D., Nietfeld J.C., Staats J.J., 1996. Growth and microbial flora of nonmedicated, segregated, early weaned pigs from a commercial swine operation. *JAVMA* 208, 711–715.
- 87) Dritz S.S., Nelssen J.L., Goodband R.D., Tokach M.D., Chengappa M.M., 1994. Application of segregated early weaning technology in the commercial swine industry. *The Compendium*.:5;677-85.
- 88) Edmond A.P., Fraser D., Kramer D.L., 1991. Consumption of solid food by suckling pigs: individual variation and relation to weight gain. *Appl Ani Behav*; 32:139-55.
- 89) EFSA, 2009. Scientific opinion. Guidance for the preparation of dossiers for sensory additives. *EFSA Journal*;7(10):1352.
- 90) English P.R., Smith W.J. and MacLean., 1977. *The Sow--Improving her Efficiency.* Farming Press, Ipswich.
- 91) Enrique Fábio L. B., Cristina M. T., Rodolfo N. K., Laura S. O. N., Fernanda M. T., Alessandro L. F., Antônio J. S. and Rizal A. R. H., 2005. Effect of Probiotic and Prebiotic Inclusion in Weaned Piglet Diets on Structure and Ultra-structure of Small Intestine Brazilian Archives of Biology and Technology Vol.48, n. 6 : pp. 921-929
- 92) Erdal M. and Eraslan E., 2012. The Impact of Probiotics on the Gastrointestinal Physiology. *New Advances in the Basic and Clinical Gastroenterology.* Prof. Tomasz Brzozowski (Ed.), ISBN: 978-953-51-0521-3.
- 93) Etheridge R.D., Seerley R.W. and Huber T.L., 1984. The effect of diet on fecal moisture, osmolarity of fecal extracts, products of bacterial fermentation

- and loss of minerals in feces of weaned pigs. *Journal of Animal Science* 58, 1403-1411.
- 94) European Parliament and Council, 2003. Regulation (EC) No. 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition. *Off. J.Eur. Union* L268:29–43.
- 95) Ewing, W. N. and Cole D. J. A., 1994. The microbiology of the gastrointestinal tract. Pages 45-65 in *The living gut. An introduction to microorganisms in nutrition*. W. N. Ewing and D. J. A. Cole, eds. Context, Ireland, UK.
- 96) Faleiro M.L., Miguel M.G., Ladeiro F., Venancio F., Tavares R., Brito J.C., Figueiredo A.C., Barroso J.G., Pedro L.G., 2002. Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of *Thymus*. *Letters in Applied Microbiology* 36, 35–40.
- 97) FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2007. FAO Technical Meeting on Prebiotics, September 15–16. FAO, Rome, Italy.
- 98) Favier C. F., Vaughan E. E., de Vos W. M., and Akkermans A. D. L., 2002. Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:219-226.
- 99) FDA, Food and Drug Administration, 2013. Part 182 - Substances Generally Recognized As Safe. CFR - Code of Federal Regulations Title 21. U.S. Food and Drug Administration.
- 100) Fioramonti J., Theodorou V. and Bueno L., 2003. Probiotics: What are they, what are their effects on gut physiology. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 17:711-724.
- 101) Flickinger E. A., 2003. Oligosaccharides as functional foods: can we improve gut health? *Nutritional Biotechnology in the Feed and Food industries. Proceedings of Alltech's 19th Annual Symposium*, 345-353
- 102) Flory C. M., Jones M. L., Miller B. F., Warren J. S., 1995. Regulatory roles of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1-beta in monocyte chemoattractant protein-1-mediated pulmonary granuloma formation in the rat. *Am. J. Pathol.*, 146: 450-462.
- 103) Fons M., Gomez A., and Karjalainen T., 2000. Mechanisms of colonisation and colonisation resistance of the digestive tract. *Microb. Ecol. Health Dis.* 2: 240S-246S.
- 104) Fooks L.J., Gibson G.R., 2002. Probiotics as modulators of the gut flora. *British Journal of Nutrition* 88 (Suppl. 1), 39–49.
- 105) Franklin M. A., Mathew A. G., Vickers J. R., and Clift R. A., 2002. Characterization of microbial populations and volatile fatty acid concentrations in the jejunum, ileum, and cecum of pigs weaned at 17 vs. 24 days of age. *J. Anim. Sci.* 80: 2904-2910
- 106) Fraser D., Milligan B. N., Pajor E. A., Philips P. A., Taylor A. A. and Weary D. M., 1998. Behavioural perspectives on weaning in domestic pigs. In: *Progress in Pig Science* (Wiseman, J. M., Varley, A. & Chadwick, J. P., eds.), pp. 121–138. Nottingham University Press, Nottingham, UK.
- 107) Freter R., 1992. Factors affecting the microecology of the gut. In: Fuller, R. (Ed.), *Probiotics: The Scientific Basis*. Chapman & Hall, London, pp. 111-144



- 108) Friedman M., Henika P. R., and Mandrell R. E., 2002. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. *J Food Protect* 65: 1545-1560.
- 109) Fuller R., 1989. Probiotics in man and animals. *J. Applied Bacterol.*, 66:365-378.
- 110) Gaskins H. R., 1997. Immunological aspects of host/microbiota interactions at the intestinal epithelium. In: R. Mackie, B. A. White, and R. E. Isaacson (Ed.) *Gastrointestinal Microbiology*. p 537. Chapman & Hall, New York.
- 111) Geibel J.P., 2005; Secretion and absorption by colonic crypts. *Annu Rev Physiol.* 67:471-90.
- 112) Giancamillo A., Vitari F., Savoini G., Bontempo V., Bersani C., Dell'Orto V., Domeneghini C., 2008. Effects of orally administered probiotic *Pediococcus acidilactici* on the small and large intestine of weaning piglets. A qualitative and quantitative micro-anatomical study. *Histol Histopathol* 23, 651–664.
- 113) Gibson G. R., and Roberfroid M. B., 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.* 125:1401–1412.
- 114) Gibson G. R., Probert H. M., Loo J. V., Rastall R. A., and Roberfroid M. B., 2004. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Updating the concept of prebiotics. *Nutr. Res. Rev.* 17:259–275.
- 115) Gibson G.R, Beatty E.R., Wang X., Cummings J.H., 1995. Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. *Gastroenterology*; 108:975–82.
- 116) Gill A. O. & Holley R. A., 2006. Inhibition of membrane bound ATPases of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by plant oil aromatics. *International Journal of Food Microbiology*, 111 (2), 170-174.
- 117) Gill H.S., Shu Q., Li, H., Rutherford K.J. and Cross, M.L., 2001c. Protection against translocating *Salmonella typhimurium* infection in mice by feeding the immuno-enhancing probiotic *Lactobacillus rhamnosus* strain HN001. *Med Microbiol Immunol* 190, 97-104.
- 118) Gillan, S. E., Speck M. L., 1977. Antagonistic action of *Lactobacillus acidophilus* toward intestinal and foodborne pathogens in associatide cultures. *J. of Food Protect.*, 40: 820-823.
- 119) Gleeson T. M., Stavric S., Blanchfield B., 1989. Protection of chicks against *Salmonella* infection with a mixture of pure cultures of interstitial bacteria. *Av. Dis.*, 33: 636-642.
- 120) Goodlad R.A., Le C.Y., Wright N.A., 1992. Cell proliferation in the small intestine and colon of intravenously fed rats: effects of urogastrone epidermal growth factor. *Cell Prolif.* 25, 393-404.
- 121) Greenberg B., 1969. *Salmonella* suppression by known populations of bacteria in flies. *J Bacteriol* 99: 629–635.
- 122) Grela E., 2004. Pig feeding optimization using latest-generation feed additives. *Pr. Mat. Zoot.*, 15: 53–63
- 123) Grela, E. R., Semeniuk V., and Czech A., 2006. Efficacy of fructooligosaccharides and mannanoligosaccharides in piglet diets. *Med. Welt* 62:762–765.

- 124) Grilli E., 2007. Development of non pharmaceutical strategies to improve intestinal health in weaning piglets. PhD thesis, Università di Bologna, 127 p.
- 125) Guenther E., 1948. The Essential Oils. D. Van Nostrand, New York.
- 126) Gustafson J.E., Liew Y.C., Chew S., Markham J.L., Bell H.C., Wyllie S.G., Warmington J.R., 1998. Effects of tea tree oil on Escherichia coli. Letters in Applied Microbiology 26, 194–198.
- 127) Gutierrez J., Barry-Ryan C., Bourke P., 2008. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. International Journal of Food Microbiology 124, 91–97.
- 128) Hadami A., Ratner D., Doron O., 2002. Probiotic in the prevention of infectious bacterial diarrhoea of piglets. Israel J. Vet. Med., 57 (4): 1–11.
- 129) Halas V., Nocht I., Pásti Z., Szabó C., Tóthi R., Tossenberger J., Babinszky L., 2011. Cellular immune response of weaned pigs fed diet supplemented with an essential Oil. Agriculturae Conspectus Scientificus Vol. 76 No. 4 (279-282).
- 130) Hall G.A., Byrn, T.F., 1989. Effects of age and diet on small intestinal structure and function in gnotobiotic piglets. Res. Vet. Sci. 47, 387-392.
- 131) Hamid A. M., McConnell E. L., Fang Liu, C. R., Rucha P. K., Abdul W. B., Sudaxshina M., 2011. Assessment of gastrointestinal pH, fluid and lymphoid tissue in the guinea pig, rabbit and pig, and implications for their use in drug development. European Journal of Pharmaceutical Sciences 42, 3–10.
- 132) Hampson D.J., 1986. Alterations in piglet small intestinal structure at weaning. Research in Veterinary Science 40, 32-40.
- 133) Hampson, D.J., 1987. Dietary influences on porcine post-weaning diarrhoea. In: J.L Barnett, E.S. Batterham, G.M. Cronin, C. Hansen, P.H. Hemsworth, D.P. Hennessy, P.E. Hughes, N.E. Johnston and R.H. King (editors). Manipulating Pig Production. Australasian Pig Science Association, Werribee, Victoria, Australia. pp. 202-214.
- 134) Hassan M., Kjos M., Nes I.F., Diep D.B, Lotfipour F., 2012. Natural antimicrobial peptides from bacteria: characteristics and potential applications to fight against antibiotic resistance. J Appl Microbiol., DOI: 10.1111/j.1365 2672.2012.05338
- 135) Havenaar R., Huis In't Veld M J H., 1992. Probiotics: a general view. In: Lactic acid bacteria in health and disease. Vol 1. Amsterdam: Elsevier Applied Science Publishers.
- 136) Hayakawa K., Mizutani J., Wads K., 1990. Effects of soybean oligosaccharides on human faecal microflora. Microb Ecol Health Dis 3:293–303.
- 137) Helande, I. M., Alakomi H.L., Latva-Kala K., Mattila-Sandholm T., Pol I., Smid E. J., Gorris L. G. M., and Von Wright A., 1998. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *J Agr Food Chem* 46: 3590-3595.
- 138) Henning S. J., 1987. Functional development of the gastrointestinal tract. In: L. R. Johnson (2nd Ed.) Physiology of the Gastrointestinal Tract. p 285. Raven Press, New York.
- 139) Herrick J. B., 1972. Therapeutic nutrition using Lactobacillus species. Veterinary Medicine and Small Animal Clinic, 67: 1249.

- 140) Hidaka H., Eida T., Takizawa T. I., 1986. Effects of fructooligosaccharides on intestinal flora and human health. *Bifidobacteria Microflora*;5:37–50.
- 141) Hoang H. G., Tran Q. V., Brian O. and Jan E. L., 2011. Effects of supplementation of Probiotics on the Performance, Nutrient Digestibility and Faecal Microflora in Growing-finishing Pigs. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* Vol. 24, No. 5: 655–661.
- 142) Hoang H. G., Tran Q. V., Ogle B., Lindberg J. E., 2012. Growth performance, digestibility, gut environment and health status in weaned piglets fed a diet supplemented with a complex of lactic acid bacteria alone or in combination with *Bacillus subtilis* and *Saccharomyces boulardii*. *Livestock Science* 143, 132–141.
- 143) Hoang H. G., Viet T. Q., Ogle B., Lindberg J. E., 2010. Effects of different probiotic complexes of lactic acid bacteria on growth performance and gut environment of weaned piglets. *Livestock Science* 133, 182–184.
- 144) Hong H. A., Le Hong D., Cutting S. M., 2005. The use of bacterial spore formers as probiotics. *FEMS Microbiology Reviews* 29, 813–835.
- 145) Hooge D.M., 2003. Dietary MOS may have application in turkey diets. *Feedstuffs*. 75 (18).
- 146) Hooper L. V., Bry L., Falk P. G., and Gordon J. I., 1998. Host-microbial symbiosis in the mammalian intestine: exploring an intestinal ecosystem. *BioEssays* 20:336-343.
- 147) Hopwood D.E. and Hampson D.J., 2003. Interactions between the intestinal microflora, diet and diarrhoea, and their influences on piglet health in the immediate post-weaning period. Pluske, J. Le Dividich, M.W.A. Verstegen 2003. Weaning the pig – concepts and consequences. Wageningen Academic Publishers The Netherlands
- 148) Huis in't Veld J. H. J. and Havenaar R., 1993. Selection criteria for microorganisms for probiotic use. In *Prevention and control of potentially pathogenic microorganisms in poultry and poultry meat processing*. J. F. Jensen, M. H. Hinton and R. W. A. W. Mulder, eds. The Netherlands.
- 149) Hume M. E., 2011. Historic perspective: Prebiotics, probiotics, and other alternatives to antibiotics. *Poultry Science* 90 :2663–2669.
- 150) Hung I-Fen, 2009. Influences of supplementing a mannan oligosaccharide containing product to pig diets on sow and weanling pig performance. PhD thesis, University of Kentucky, 113 p..
- 151) Impey C. S., Mead G. C., George S. M., 1982. Competitive exclusion of salmonellas from chick caecum using a defined mixture of bacterial isolates from the caecal microflora of an adult bird. *J. Hyg. Camb.*, 89: 479-490.
- 152) Inoue R., Tsukahara T., Nakanishi N., and Ushida K., 2005. Development of the intestinal microbiota in the piglet. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 51:257–265.
- 153) Inouye S., Yamaguchi H., Takizawa T., 2001. Screening of the antibacterial effects of a variety of essential oils on respiratory tract pathogens, using a modified dilution assay method. *J. Inf. Chemother.*, 7, 251–254.
- 154) Ito M., Kimura M., Deguchi Y., Miyamori-Watabe A., Yajima T., Kan T., 1993. Effect of trans-galactosylated disaccharides on the human intestinal microflora and their metabolism. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*;39:279–88.
- 155) Janeway C. A., 1993. *Scientific America*. September, 73-79.

- 156) Janz J.A.M., Morel P.C.H., Wilkinson B.H.P., Purchas R.W., 2007. Preliminary investigation of the effects of low-level dietary inclusion of fragrant essential oils and oleoresins on pig performance and pork quality. *Meat Science* 75 350–355.
- 157) Jensen B. B., 1998. The impact of feed additives on the microbial ecology of the gut in young pigs. *J. Anim. Feed Sci. Technol.* 89:175-188.
- 158) Jensen B. B., Agergaard N., Hansen L. L., Mikkelsen L. L., Jensen M. T. and Laue A., 1998. Effect of liquid feed on microbial production of skatole in the hind gut, skatole absorption to portal vein blood and skatole deposition in back fat. In: *Skatole and Boar taint*. W. K. Jensen, ed. Danish Meat Research Institute, Roskilde.
- 159) Jensen P. and Recon B., 1989. When to wean - observations from free ranging domestic pigs. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, 23: 49-60.
- 160) Jensen P., Gunilla S. and Algers B., 1991. Nursing and suckling behaviour of semi-naturally kept pigs during the first 10 days postpartum. *Applied Animal Behaviour Science*, 31, 195-209.
- 161) Jiang R., Chang X., Stoll B., Fan M.Z., Arthington J., Weaver E., Campbell J. and Burrin D.G., 2000. Dietary plasma protein reduces small intestinal growth and lamina propria cell density in early weaned pigs. *Journal of Nutrition* 130, 21-26.
- 162) Jin L. Z., Ho Y.W., Abdulah N. and Jalaludin S., 1998. Growth performance, intestinal microbial populations and serum cholesterol of broilers fed diet containing *Lactobacillus* cultures. *Poult. Sci.*, 77:1259-1265.
- 163) Jin L., Reynolds L. P., Redmer D. A., Caton J. S. and Crenshaw J. D., 1994. Effects of dietary fiber on intestinal growth, cell proliferation, and morphology in growing pigs. *J ANIM SCI*, 72:2270-2278
- 164) Jonsson E., Conway P., Fuller R., 1992. Probiotics for pigs. *Probiotics. The Scientific Basis*. Chapman & Hall, London, pp. 259–316.
- 165) Jouault T., Lepage G., Bernigaud A., Trinel P. A., Fradin C., Wieruszski J. M., Linton A. H., 1995. Has Swan failed. *Vet. Rec.*, 104: 329.
- 166) Juliani H.R., Koroch A.R., Simon J.E., 2009. Chemical Diversity of Essential Oils of *Ocimum* species and Their Associated Antioxidant and Antimicrobial Activity. In *Essential Oils and Aromas: Green Extractions and Applications*; Chemat, F., Varshney, V.K., Allaf, K., Eds.; Har Krishan Bhalla & Sons: Dehradun, India,
- 167) Juliano C., Mattana A., Usai M., 2000. Composition and in vitro antimicrobial activity of the essential oil of *Thymus herba-barona* Loisel growing wild in Sardinia. *Journal of Essential Oil Research* 12, 516–522.
- 168) Juven B. J., Weisslowich H., Harel S., 1988. Detection of hydrogen peroxide produce by meat lactic starter cultures. *J. of Appl. Bact.*, 65: 357-360.
- 169) Juven B.J., Kanner J., Schved F., Weisslowicz H., 1994. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *Journal of Applied Bacteriology* 76, 626– 631.
- 170) Kaplan H., Hutkins RW., 2000. Fermentation of fructooligosaccharides by lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Appl Environ Microbiol.*;66:2682-4.
- 171) Kato T., and Owen R. L., 1994. Structure and function of intestinal mucosal epithelium. In: P. L. Ogra (Ed.) *Handbook of Mucosal Immunology*. p 11. Academic Press, Inc., New York.

- 172) Katouli M., Lund A., Wallgren P., Kuhn I., Soderlind O., and Mollby R., 1997. Metabolic fingerprinting and fermentative capacity of the intestinal flora of pigs during pre- and postweaning periods. *J. Appl. Microbiol.* 83:147-154.
- 173) Kelly D., 1994. Colostrum, growth factors and intestinal development in pigs, in: Souffrant W.B., Hagemester H. (Eds.), *The VIth International Symposium on Digestive Physiology in Pigs*, EAAP Publication no. 80, Dummerstorf, Bad Doberan, pp. 151–166.
- 174) Kelly D., Begbie R. and King T.P., 1992. Postnatal intestinal development. In: M.A. Varley, P.E.V. Williams and T.L.J. Lawrence (editors), *Neonatal Survival and Growth*, British Society of Animal Production: Edinburgh, pp. 63-79.
- 175) Kelly D., Greene J., O'Brien J. J. & McCracken K. J., 1984. Gavage of feeding of early-weaned pigs to study the effect of diet on digestive development and changes in intestinal microflora. In: *Proceedings of the VIIIth International Pig Veterinary Society Congress*, p. 317. Ghent, Belgium (abs).
- 176) Kelly D., Smyth J.A. and McCracken K.J., 1991. Digestive development in the early-weaned pig. *British Journal of Nutrition* 65, 169-180.
- 177) Kennedy M. T., Bates P. J., Wheatley C. L., Rohrbach M. S., 1995. Discrete pathways for arachidonic acid release from tanin versus beta-glucan-stimulated rabbit alveolar macrophages. *J. Leukocyte Biol.*, 58: 241-248.
- 178) King D. E., Asem E. K., and Adeola O., 2000. Ontogenetic development of intestinal digestive functions in White Pekin ducks. *J. Nutr.* 130:57–62.
- 179) King R.H. and Pluske J.R., 2003. In: Pluske, J. Le Dividich, M.W.A. Verstegen 2003. *Weaning the pig – concepts and consequences*. Wageningen Academic Publishers The Netherlands
- 180) Knobloch K., Pauli A., Iberl B., Weigand H. and N. Weis., 1989. Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. *Journal of Essential Oil Research* 1:119– 128.
- 181) Kocher A., 2004. The potential for immunosaccharides to maximize growthperformance – A review of six published meta-analyses on Bio-MOS. Pg.107–115 in *Interfacing Immunity, Gut Health and Performance*. L. A. Tucker and J. A. Taylor-Pickard, ed. Nottingham University Press, Nottingham, UK .
- 182) Kogan G. and Kocher A., 2007. Role of yeast cell wall polysaccharides in pig nutrition and health protection. *Livestock Science* 109, 161–165.
- 183) Kokoshis P. L., Williams D.L., Cook J. A., Di Luzio, N. R.,1978. Increased resistance to *Staphylococcus aureus* infection and enhancement in serum lysozym activity by glucan. *Science*, 199: 1340-1342.
- 184) Kommera S. K., Mateo R. D., Neher F. J. and Kim W. S., 2006. Phytobiotics and organic acids as potential alternatives to the use of antibiotics in nursery pig diets. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* Vol. 19, No. 12 : 1784 – 1789.
- 185) Konstantinov S. R., Favier C. F., Zhu W. Y., Williams B. A., Klub J., Souffrant W. B., De Vos W. M., Akkermans A. D. L. and Smidt H., 2004. Microbial diversity studies on the porcine gastrointestinal ecosystem during weaning transition. *Anim. Res.* 53:317-324.

- 186) Kornegay E.T., Risley C.R., 1996. Nutrient digestibilities of a cornsoybean meal diets as influenced by *Bacillus* products fed to finishing swine. *J. Anim. Sci.* 74, 799–805
- 187) Kovačević N., 2004. Osnovi farmakognozije, treće izdanje. Srpska školska knjiga.
- 188) Kovčičin S., Kolak S., Šiljačić L., 1986. Aktuelni problemi ishrane prasadi. *Krmiva* 28/3-4.
- 189) Krivec L., Rotar I., Šlehar A., Čandek A., 1973. Proučavanje optimalnog doba laktacije kod krmača iskustva sa etažnim uzgojem prasadi na farmi. *Dok. Za teh. i tehniku u poljoprivredi.* Sv. 9-10.
- 190) Kroismayr A., Sehm J., Pfaffl M.W., Schedle K., Plitzner C., Windisch W., 2008. Effects of avilamycin and essential oils on mRNA expression of apoptotic and inflammatory markers and gut morphology of piglets. *Czech J. Anim. Sci.*, 53, (9): 377–387.
- 191) Kyriakis S.C., Tsiloyiannis V.K., Vlemmas J., Sarris K., Tsinas A.C., Alexopoulos C., Jansegers L., 1999. The effect of probiotic LSP 122 on the control of postweaning diarrhoea syndrome of piglets. *Res. Vet. Sci.* 67, 223–228.
- 192) Labus T., 2011. ispitivanje uticaja dodatka probiotika BioPlus 2B u hranu za dojne krmače na proizvodne rezultate prasadi. Specijalistički rad, Fakultet veterinarske medicine, Univerziteta u Beogradu. Katedra za ishranu i botaniku, 61, strana.
- 193) Lalle`s J.-P., Paolo B., Hauke S. and Chris R. Stokes, 2007. Nutritional management of gut health in pigs around weaning. *Proceedings of the Nutrition Society*, 66, 260–268
- 194) Lallès J. P., Bosi P., Janczyk P., Koopmans S. J. and Torrallardona D., 2009. Impact of bioactive substances on the gastrointestinal tract and performance of weaned piglets: a review. *Volume 3, Issue 12* pp 1625 1643.
- 195) Lallès J.-P., Gaëlle B., Christine F., Nathalie Le F., Isabelle L., Lucile M., Isabelle P. Oswald S. P., Christelle P., Bernard S., 2004. Gut function and dysfunction in young pigs: physiology. *Anim. Res.* 53: 301–316.
- 196) Lambert R.J.W., Skandamis P.N., Coote P.J. and Nychas G.-J.E., 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 453-462.
- 197) Le Dividich J. and Herpine P., 1994. Effects of climatic conditions on the performance, metabolism and health status of weaned pigs. *Lives. Prod. Sci.* 38:79-90.
- 198) Lebenthal B., 1989. Concepts in gastrointestinal development. In E. Lebenthal (Ed.) *Human Gastrointestinal Development.* p 3. Raven Press, New York.
- 199) Lecce J. G., Armstrong W. D., Crawford P. C. and Duncharme G. A., 1979. Nutrition and management of early weaned piglets: Liquid versus *dry* feeding. *J. Anim. Sci.* 48:1007.
- 200) Lee A., 1984. Neglected Niches: the microbial ecology of the gastrointestinal tract. In: *Advances in Microbial Ecology*, K. Marshall, ed. Plenum Press. New York.

- 201) Lee H.-S., Ahn Y.-J., 1998. Growth-inhibiting effects of *Cinnamomum cassia* bark-derived materials on human intestinal bacteria. *J. Agric. Food Chem.* 46, 8–12.
- 202) Lee Y.K., Puong K.Y., Ouwehand A.C. & Salminen S., 2003. Displacement of bacterial 819 pathogens from mucus and Caco-2 cell surface by lactobacilli. *J Med Microbiol*, Vol. 52 (Pt 10), pp. (925-930).
- 203) Li D.F., Nelssen J.L., Reddy P.G., Blecha F., Hancock J.D., Allee G.L., Goodband R.D., Klemm R.D., 1990. Transient hypersensitivity to soybean meal in the early-weaned pig, *J. Anim. Sci.* 68: 1790–1799.
- 204) Li S.Y., Ru Y.J., Liu M., Xu B., Péron A., Shi X.G, 2012. The effect of essential oils on performance, immunity and gut microbial population in weaner pigs. *Livestock Science* 145 119–123.
- 205) Liebbrandt V. C. and Ewan R. C.. 1972. Effect of weaning and age at weaning on performance by baby pigs. *J. Anim. Sci* 35:1107
- 206) Lievin V., Peiffer I., Hudault S., 2000. Bifidobacterium strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity. *Gut* 47:646-652.
- 207) Lilly D. M., Stillwell R. H., 1965. Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. *Science*, 147: 747-748
- 208) Lindemann M. D., Cornelius S. G., Kandelgy S. M. El, Moser R. L., and Pettigrew J. E., 1986. Effect of age, weaning and diet on digestive enzyme levels in the piglet. *J. Anim. Sci.* 62: 1298-1307.
- 209) Link R., Kovač G., Foltys V., Kirchnerova K., 2007. Composition of sow's milk and selected metabolic indices after administration of probiotics. *Research in pig breeding*, 1, (1).
- 210) Lis-Balchin M., 1997. Essential oils and aromatherapy: their modern role in healing. *The Journal of the Royal Society for the promotion of health*, vol 131, 229-241.
- 211) Lyberg K., Lundh T., Pedersen C., Lindberg J.E., 2006. Influence of soaking, fermentation and phytase supplementation on nutrient digestibility in pigs offered a grower diet based on wheat and barley. *Anim. Sci.* 82, 853–858.
- 212) Lynch M.B., Sweeny T., Callan J.J., O'Sullivan J.T., O'Doherty J.V., 2010. The effect of dietary laminaria derived laminarin and fucoidan on nutrient digestibility, nitrogen utilisation, intestinal microflora and volatile fatty acid concentration in pigs. *J. Sci. Food. Agric.* 90, 430–437, 8.
- 213) Lyons TP, Bourne S., 1995. Principles of the effect of probiotics on the basis of yeasts and mannans. In: *Proceedings of Conference on Probiotics in animal nutrition*, Pohorelice, Czech Republic, 13–22.
- 214) Mackie R. I., Sghir A., and Gaskins H. R., 1999. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am. J. Clin. Nutr.* 69:1035S 1045S.
- 215) Maczulak A. E., Wolin M. J. & Miller T. L., 1993. Amounts of viable anaerobes, methanogens, and bacterial fermentation products in feces of rats fed high fiber or fiber-free diets. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 657-662.
- 216) Madec F., Bridoux N., Bounaix S. & Jestin A., 1998. Measurement of digestive disorders in the piglet at weaning and related risk factors. *Preventative Veterinary Medicine* 35: 53–72.

- 217) Maenner K., Vahjen W. and Simon O., 2011. Studies on the effects of essential-oil-based feed additives on performance, ileal nutrient digestibility, and selected bacterial groups in the gastrointestinal tract of piglets. *J ANIM SCI*, 89:2106-2112.
- 218) Makkink C.A., Negulescu G.P., Guixin Q. and Verstegen M.W.A., 1994. Effect of dietary protein source on feed intake, growth, pancreatic enzyme activities and jejunal morphology in newlyweaned piglets. *British Journal of Nutrition* 72, 353-368.
- 219) Makras L., Triantafyllou V., Fayol-Messaoudi D., Adriany T., Zoumpopoulou G., Tsakalidou E., Servin A., DeVuyst L., 2006: Kinetic analysis of the antibacterial activity of probiotic lactobacilli towards *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* reveals a role for lactic acid and other inhibitory compounds. *Res Microbiol*; 157: 241–247.
- 220) Malloa J.J., Rioperez J. and Honrubia P., 2010. The addition of *Enterococcus faecium* to diet improves piglet's intestinal microbiota and performance. *Livestock Sci.*, 133:176-178.
- 221) Manners M. J., 1976, The development of digestive function in the pig. *Proc. Nutr. Soc.* 35:49-55.
- 222) Manzanilla E. G., 2005. Evaluation of in-feed additives in early weaned pigs: study of the extract, a plant based additive. PhD thesis, Universitat Autònoma de Barcelona.
- 223) Manzanilla, E.G., Perez J.F., Martin M., Kamel C., Baucells F., and Gasa J., 2004. Effect of plant extracts and formic acid on the intestinal equilibrium of early-weaned pigs. *J. Anim. Sci.* 82:3210–3218.
- 224) Marinho M.C., Lordelo M.M., Cunha L.F., Freire J.P.B., 2007. Microbial activity in the gut of piglets: I. Effect of prebiotic and probiotic supplementation. *Livestock Science* 108, 236–239..
- 225) Marinho M.C., Pinho M.A., Mascarenhas R.D., Silva F.C., Lordelo M.M., Cunha L.F., Freire J.P.B., 2007a. Effect of prebiotic or probiotic supplementation and ileo rectal anastomosis on intestinal morphology of weaned piglets. *Livestock Science* 108, 240 -243.
- 226) Marino M., Bersani C., Comi G., 1999. Antimicrobial activity of the essential oils of *Thymus vulgaris* L. measured using a bioimpedometric method. *Journal of Food Protection* 62 (9), 1017– 1023.
- 227) Marion J., Marzena B., Françoise T., Gérard S., Yves Le B., Romuald Z., Isabelle Le H., Jean Le D., 2002. Small intestine growth and morphometry in piglets weaned at 7 days of age. Effects of level of energy intake *Reprod. Nutr. Dev.* 42, 339–354.
- 228) Marteu P., Seksik P., Lepage P. and Dore J., 2004. Cellular and physiological effects of probiotics and prebiotics. *Med. Chem.*, 4:889-896.
- 229) Martin P., 1984. The meaning of weaning. *Anim. Behav.*, 32: 1257-1259.
- 230) Martin-Orue S., 2006. Development of gut microbiota in the pig: modulation of bacterial communities by different feeding strategies. Phd thesis, University of Barcelona, 218 p.
- 231) Mathew A. G., Chattin S. E., Robbins C. M. and Golden D. A., 1998. Effects of a direct-fed yeast culture on enteric microbial populations, fermentation acids, and performance of weanling pigs. *J. ANIM. SCI.*, 76:2138-2145.



- 232) Mathew A. G., Franklin M. A., Upchurch W. G., and Chattin S. E., 1996. Effect of weaning on ileal short-chain fatty acid concentrations in pigs. *Nutr. Res.* 16:1689-1698.
- 233) Mathew A. G., Sutton A. L., Scheidt A. B., Patterson J. A., Kelly D. T. and Meyerholtz K. A., 1993. Effect of galactan on selected microbial populations in the ileum of the weanling pig. *J. Anim. Sci.* 71:1503-1509.
- 234) McCracken B. A., Spurlock M. E., Roos M. A., Zuckermann F. A. and Gaskins H. R., 1999. Weaning anorexia may contribute to local inflammation in the piglet small intestine. *J. Nutr.* 129: 613–619.
- 235) McCracken B.A., Gaskins H.R., Ruwe-Kaiser P.J., Klasing K.C., Jewell D.E., 1995. Diet-dependent and diet-independent metabolic responses underlie growth stasis of pigs at weaning, *J. Nutr.* 125 2838–2845.
- 236) McCracken K. J. & Kelly D., 1984. Effect of diet and post-weaning food intake on digestive development of early-weaned pigs. *Proc. Nutr. Soc.* 43: 110A
- 237) McGimpsey J.A., Douglas M.H., Van Klink J.L., Beauregard D.A., Perry N.B., 1994. Seasonal variation in essential oil yield and composition from naturalized *Thymus vulgaris* L. in New Zealand. *Flavour and Fragrance Journal* 9, 347– 352.
- 238) McNeill, L.K., Hamilton J.R., 1971. The effect of fasting on disaccharidase activity in the rat small intestine. *Pediatrics* 47, 65-72.
- 239) Medeiros A. A., Schocken-Iturino R. P., Ronchi C. P. H., 2004. Probiotic effect on gastrointestinal tract pH of broiler chickens. Abstract Book. Proceedings of Alltech's 20th Annual Symposium, 66.
- 240) Medzhitov R., Janeway Jr., 2000. Innate immunity. *N. Engl. J. Med.* 343, 338–344.
- 241) Melanie Le B., Davies H. E., Charles C. G., Madden T. M., Wiseman J., Christine E.R. D, Louis H, George P, Y Le T, Jim C, Sabine T, Mellits K. H., 2010. Influence of probiotics on gut health in the weaned pig *Livestock Science* 133, 179–181.
- 242) Meng Q. W., Yan L., Ao X., Zhou X T., Wang J. P., Lee J. H. and Kim I. H., 2010. Influence of probiotics in different energy and nutrient density diets on growth performance, nutrient digestibility, meat quality, and blood characteristics in growing-finishing pigs. *J ANIM SCI*, 88:3320-3326.
- 243) Metzler B., Bauer E. and Mosenthin R., 2005. Microflora Management in the Gastrointestinal Tract of Piglets. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* Vol 18, No. 9 : 1353-1362.
- 244) Michiels J., Missotten J., Owyn A., Dierick N., Fremaut D., De Smet S., 2012. Effect of dose of thymol and supplemental flavours or camphor on palatability in a choice feeding study with piglets. *Czech. J. anim. Sci.*, 57 (2):65-74.
- 245) Michiels J., Missotten J.A.M., Fremaut D., De Smet S., Dierick N.A., 2009. In vitro characterization of the antimicrobial activity of selected essential oil components and binary combinations against the pig gut flora. *Animal feed science and technology* 151, 111-127.
- 246) Michiels, J., 2009. Effect of essential oils on gut bacteria and functionality in the pig. PhD thesis, Ghent University, Belgium, 282p.

- 247) Miguel J. C., Rodriguez-Zas S. L., and Pettigrew J. E.. 2002. Practical effects of Bio-Mos in nursery pig diets: A meta-analysis. Pages 425–433 in *Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industry*. Proc. Alltech's 18th Annu. Symp. Nottingham, Univ. Press, Nottingham, UK.
- 248) Miguel J.C, Rodriguez-Zas S.L, Pettigrew J.E., 2004. Efficacy of a mannan oligosaccharide (Bio-Mos) for improving nursery pig performance. *J Swine Health Prod.*; 12, (6):296–307.
- 249) Mikkelsen L. L. and Jensen B. B., 2004. Effect of fructo-oligosaccharides and transgalacto oligosaccharides on microbial populations and microbial activity in the gastrointestinal tract of piglets post-weaning. *Animal Feed Science and Technology* 117, 107–119.
- 250) Mikolajczak J., Jarzynowska A., El-Essa A., 2004. The effects of probiotic preparation on growth rate and health condition of piglets (in Polish). *Rocz. Nauk. Zoot., Supl.*, 20: 115–119.
- 251) *Miller H.M. and Slade R.D., 2003. Digestive physiology of the weaned pig.* In: J.R. Pluske, J. Le Dividich, M.W.A. Verstegen 2003. *Weaning the pig – concepts and consequences*. Wageningen Academic Publishers The Netherlands.
- 252) Miller, B.G., James P.S., Smith M.W. and Bourne F.J., 1986. Effect of weaning on the capacity of pig intestinal villi to digest and absorb nutrients. *Journal of Agricultural Science* 107, 579-589.
- 253) Modesto M., Rosaria D. M., Ilaria S., Paolo T., Sara De F., Luisa C., Maurizio M., Paolo B., Biavati B., 2009. A novel strategy to select Bifidobacterium strains and prebiotics as natural growth promoters in newly weaned pigs. *Livestock Science* 122, 248–258.
- 254) Montagne L., Pluske J.R, Hampson D.J., 2003. A review of interactions between dietary fibre and the intestinal mucosa, and their consequences on digestive health in young non-ruminant animals. *Animal Feed Science and Technology* 108:95–117.
- 255) Mosenthin R., 1998. *Physiology of Small and Large Intestine of Swine*. *AJAS Vol. 11 (No.5)* 608 ·619.
- 256) Mosenthin, R., 2003. Strategies for optimizing gut health in piglets. In: *Proceedings of the 12th conference on nutrition of domestic animals "Zadavec-Erjavec Days"*, pp. 150-157.
- 257) Mourão J.L., Pinheiro V., Alves A., Guedes C.M., Pinto L., Saavedra M.J., Spring P., Kocher A., 2006. Effect of mannan oligosaccharides on the performance, intestinal morphology and cecal fermentation of fattening rabbits. *Volume 126, Issues 1–2, 28, Pages 107–120*.
- 258) Mul A. J., Perry F. G., 1994. The role oligosaccharides play in animal nutrition. *Feed Manufactures Conference*, University of Nottingham, Loughborough, Leics. 3-5.
- 259) Muralidhara, K. S., Sheggeby G. G., Elliker P. R., England D. C. and Sandine W. E.. 1977. Effect of feeding lactobacilli on the coliform and lactobacillus flora of intestinal tissue and feces from piglets. *J. Food Protection* 40:288-293.
- 260) Nabuurs M. J. A., Hoogendoorn A., Van der Molen E. J., Van Osta A. L. M., 1993. Villus height and crypt depth in weaned and unweaned pigs, reared

- under various circumstances in the Netherlands. *Research in Veterinary Science*, 55, 78-84.
- 261) Naftalin R. J., Zammit P. S. and Pedley K. C., 1995. Concentration polarization of fluorescent dyes in rat descending colonic crypts: evidence of crypt fluid absorption. *Journal of Physiology* 487.2, pp.479-495
- 262) NAHMS–National Animal Health Monitoring System, 2000. Publication no. 338. 0801. USDA Centers for Epidemiology and Animal Health, Fort Collins, Colo.
- 263) Namkung H., Li M., Gong J., Yu H., Cottrill M., and de Lange C. F. M., 2004. Impact of feeding blends of organic acids and herbal extracts on growth performance, gut microbiota and digestive function in newly weaned pigs. *Canadian journal of animal sciFence* 84:697-704.
- 264) National Research Council. 1998. *Nutrient Requirements of Swine*. 10th Edition. National Academy Press, Washington, DC.
- 265) Newman M. C., 2006. Effects of mannan oligosaccharide source and structure on antibiotic resistance of pathogenic bacteria. Pg. 109-113 in *Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries*, Proc. Alltech's 22nd Annu. Symp. T. P. Lyons, K. A. Jacques, and J. M. Hower, ed. Nottingham University Press, Nottingham, UK.
- 266) Newman, K. E., 1994. Mannan oligosaccharides: Natural polymers with significant impact on the gastrointestinal microflora and the immune system. . U: *Biotechnology in the Feed Industry*. Proc. Alltechs 10<sup>th</sup> Annual Symposium. (Ed.: T. P. Lyons) Nicholasville Kentucky.
- 267) Ng, S. C., Hart A. L., Kamm M. A., Stagg A. J. and Knight S. C., 2009. Mechanisms of action of probiotics: Recent advances. *Inflammation Bowel Dis.*, 15:300-310.
- 268) Nisbet D. J., Corrier D. E., Scanlan C. M., Hollister A. G., Beier R. C., Deloach, J. R., 1993. Effect of a defined continuous-flow derived bacterial culture and dietary lactose on *Salmonella* colonization in broiler chicks. *Av. Dis.*, 37: 1017-1025.
- 269) Nofranías M., Manzanilla E. G., Pujols J., Gibert X., Majo N. ´, Segale J. ´, and Gasa J., 2006. Effects of spray-dried porcine plasma and plant extracts on intestinal morphology and on leukocyte cell subsets of weaned pigs. *J. Anim. Sci.* 84:2735–2742.
- 270) Nollet H., Deprez P., Van Driessche E. and Muylle E., 1999. Protection of just weaned pigs against infection with F18+ *Escherichia coli* by non-immune plasma powder. *Veterinary Microbiology*, 65, 37-45.
- 271) Ofek I., and Beachey E. H., 1978. Mannose binding and epithelial cell adherence of *Eschenchia coli*. *Infect. Immun.* 22:247-254.
- 272) Ohashi Y., Umesaki Y., Ushida K., 2004. Transition of probiotic bacteria, lactobacillus casei strain Shirota, in the gastrointestinal tract of pig. *International Journal of Food Microbiology* 96, 61–66.
- 273) Ohashi Yuji and Ushida Kazunari, 2009. Health-beneficial effects of probiotics: Its mode of action. *Animal Science Journal* 80, 361–371.
- 274) Ohno N., Asada N., Adachi Y., Yadomae T., 1995. Enhancement of LPS triggered TNF-alfa (Tumor Necrosis Factor) production by (1-3)-beta-D—glucans in mice. *Biol. Pharm. Bull.*, 18, 126-133.

- 275) Okai D. B., Aherne F. X. and Hardin R. T., 1976. Effects of creep and starter composition on feed intake and performance of growing pigs. *Can. J. Anim. Sci.* 56: 573-586.
- 276) Okazaki, M., Adachi Y., Ohno N., Yadomae T., 1995. Structure- activity relationship of (1-3)-beta-D-glucans in the induction of cytokine production from macrophages, in vitro. *Biol. Pharm. Bull.*, 18, 1320-1327.
- 277) Oosterhaven K., Poolman B. and Smid E.J., 1995. S-carvone as a natural potato sprout inhibiting, fungistatic and bacteristatic compound. *Industrial Crops and Products* 4:23-31.
- 278) Pabst, R., Geist M., Rothkotter H. J., and Fritz F. J., 1988. Postnatal development and lymphocyte production of jejunal and ileal Peyer's patches in normal and gnotobiotic pigs. *Immunology* 64:539-544.
- 279) Palmer N. C. and Hulland T. J., 1965. Factors predisposing to the development of coliform gastro-enteritis in weaned pigs. *Can. Vet. J.* 6:310-316.
- 280) Pantić V., 1990. *Histologija*, Naučna knjiga, Beograd,
- 281) Park K. M., Han Y.K., Park K.W., 2000. Effects of herb-mix supplementation on the growth performance and serum growth hormone in weaned pigs. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* vol. 13, No. 6:791-794.
- 282) Parker R. B., 1974. Probiotics, the other half of the antibiotics story. *Animal Nutrition and Health*, 29: 4-8.
- 283) Pastorelli H., Le Floc'h N., Merlot E., Meunier-Salaün M. C., J. van Milgen and Montagne L., 2012. Feed restriction applied after weaning has different effects on pig performance and health depending on the sanitary conditions. *J ANIM SCI*, 90:4866-4875.
- 284) Pengfei Li, Xiangshu P., Yingjun R., Xu H., Lingfeng X., Hongyu Z., 2012. Effects of adding essential oil to the diet of weaned pigs on performance, nutrient utilization, immune response and intestinal health. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 25 (11).
- 285) Petersen M. M., Steadman R., Williams J. D., 1994a. Human neutrophils are selectively activated by independent ligation of the subunits Cd 11B/CD18 integrin. *J. Leukocyte Biol.*, 56, 708-713.
- 286) Petersen V., 1994. The development of feeding and investigatory behavior in free- ranging domestic pigs during their first 18 weeks of life. *Applied Animal Behavioural Science* 42, 87-98.
- 287) Piva A., Pizzamiglio V., Morlacchini M., Tedeschi, M., Piva G., 2007. Lipid microencapsulation allows slow release of organic acids and natural identical flavors along the swine intestine. *J. Anim. Sci.* 85, 486-493
- 288) Platel K., and Srinivasan K., 2000. Influence of dietary spices and their active principles on pancreatic digestive enzymes in albino rats. *Nahrung* 44:42-46.
- 289) Pluske J., Le Dividich Verstegen M.W.A., 2003. Weaning the pig – concepts and consequences. Wageningen Academic Publishers The Netherlands.
- 290) Pluske J.R., Hampson DJ & Williams I.H., 1997. Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review. *Livestock Production Science* 51, 215-236.
- 291) Pluske J.R., Williams I.H., Aherne F.X., 1996. Villous height and crypt depth in piglets in response to increases in the intake of cows' milk after weaning, *Anim. Sci.* 62: 145-158.

- 292) Pluske, J.R., Williams I.H. and Aherne F.X., 1991. Maintenance of villous height and crypt depth in the small intestine of weaned piglets. In: E.S. Batterham (editor), *Manipulating Pig Production III*, edited by . Victoria: Australasian Pig Science Association, Werribee, p143.
- 293) Poekhampha T. and Bunchasak C., 2011. Comparative Effects of Sodium Gluconate, Mannan Oligosaccharide and Potassium Diformate on Growth Performances and Small Intestinal Morphology of Nursery Pigs. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 24(6):844-850.
- 294) Pollman D. S., 1986. Probiotics in pig diets. In: *Recent Advances in Animal Nutrition* (Ed. W. Haresign and D. J. A. Cole). Butterworth, London. pp. 193-205.
- 295) Popović O., 1999. Uticaj različitih stimulatora rasta u ishrani prasadi na proizvodne rezultate i zdravstveno stanje. Specijalistički rad, Univerzitet u Beogradu, 51 strana.
- 296) Porter J. W. and Rolls B. A., 1971. Some aspects of the digestion of proteins. *Proc. Nutr. Soc.* 30: 77-25.
- 297) Powell D., 1987. Intestinal water and electrolyte transport. In: *physiology of the gastrointestinal tract*. New York, Raven Press (L.R. Johnson ed.), 1267-1305.
- 298) Pravilnik o kvalitetu hrane za životinje, 2010. Službeni glasnik RS, broj 41/09.
- 299) Pravilnik o metodama uzimanja uzoraka i metodama fizičkih, hemijskih i mikrobioloških analiza stočne hrane. Sl. list SFRJ, 15, 1987.
- 300) Prohaszka L. and Baron F., 1980. The predisposing role of high dietary protein supplies in enteropathogenic *Escherichia coli* infections in weaned pigs. *Zbl Veterinary Medicine B*, 27, 222-232
- 301) Quigley J. D., Campbell J. M., Polo J. and Russell L. E., 2004. Effects of spray-dried animal plasma on intake and apparent digestibility in dogs. *J. Anim Sci.* 82:1685-1692.
- 302) Quinn P. J., Markey B. K., Leonard F. C., Fitzpatrick E. S., Fanning S., Hartigan P. J., 2011. *Veterinary microbiology and microbial disease*. WILEY BLACKWELL. Publishing ltd.
- 303) Radecki, S. V., and Yokohama M. T., 1991. Intestinal bacteria and their influence on swine nutrition. In: *Swine Nutrition*. E. R. Miller, D. E. Ullrey, and A. J. Lewis, eds. Butterworth Heinemann, Boston, USA.
- 304) Rakoff-Nahoum S., Paglino J., Eslami-Varzaneh F., Edberg S., Medzhitov R., 2004. Recognition of commensal microflora by Toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 118: 229–241.
- 305) Rekiel A., Kulisiewicz J., 1996. The use acidfing and probiotic preparates in piglets rearing (in Polish). *Med. Wet.*, 52 (4): 266–269
- 306) Rene´ L. van W., Bert A., Uurlings P., Len J. Lipman A., Snijders M. A., Keuzenkamp D., Verheijden H. M., and Frans van K., 2001. Effect of fermented feed on the microbial population of the gastrointestinal tracts of pigs. *Applied and environmental microbiology*, Vol. 67, No. 7, p. 3071–3076.
- 307) Roberfroid M., 2007. Prebiotics: The concept revisited. *J. Nutr.* 137:830–837.
- 308) Rolfe R. D., 1996. Colonization resistance. *Gastrointestinal microbes and host interactions*. In: *Gastrointestinal Microbiol.*, vol. 2. R. I. Mackie, B. A. Whyte, and R. E. Isaacson, eds. Chapman and Hall, London. UK.

- 309) Rolfe R.D., 1991. Population dynamics of the intestinal tract, in Blankenship LC (ed): Colonization Control of Human Bacterial Enteropathogens in Poultry. San Diego, Academic Press, , pp 59–75
- 310) Rossi Filippo, Mauro M., Paolo G., Sara S., Callegari M. L., Piva G., 2008. Effects of a gluco-oligosaccharide supplement on the morphological characteristics of the gastro-intestinal tract and growth performance in weaned piglets. *Ital.J.Anim.Sci.* vol. 7, 185-198.
- 311) Roth, F.X. and Kirschgessner, M.,1988. Nutritive Wirksamkeit von Toyocerin. 1 Ferkelaufzucht. *Landwirtschaftliche-Forschung* 41, 58–62.
- 312) Rowland I.R, Tanaka R., 1993. The effects of transgalactosylated oligosaccharides on gut flora metabolism in rats associated with human faecal microflora. *J Appl Bacteriol* 74:667–74.
- 313) Rozeboom, D. W., Shaw D. T., Tempelman R. J., Miguel J. C., Pettigrew J. E., and Connolly A., 2005. Effects of mannan oligosaccharide and an antimicrobial product in nursery diets on performance of pigs reared on three different farms. *J. Anim. Sci.* 83:2637–2644.
- 314) Ruckebusch Y. and Bueno L., 1976. The effect of feeding on the motility of the stomach and small intestine in the pig. *Br. J. Nutr.* 35: 397 405.
- 315) Ruiz-Herrera J., 1992. Fungal Cell Wall: Structure, Synthesis, and Assembly. CRC Press, Boca Raton, FL.
- 316) Rumessen J. J., Bode S., Hamberg O. & Hoyer E. G., 1990. Fructans of Jerusalem artichokes: intestinal transport, absorption, fermentation and influence on blood glucose, insulin and C-peptide responses in healthy subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* 52: 675-681
- 317) Saad N., Delattre C., Urdaci M., Schmitter J.M., Bressollier P., 2013. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *LWT - Food Science and Technology* 50:1-16.
- 318) Saarela M.H., Alakomi H.L., Puhakka A. and Matto J., 2009. Effect of the fermentation pH on the storage stability of *Lactobacillus rhamnosus* preparations and suitability of in vitro analyses of cell physiological functions to predict it. *J Appl Microbiol* 106, 1204-1212.
- 319) Saito Y., Tanaka T., Rowland IR., 1992. Effects of soybean oligosaccharides on the human gut microflora in in vitro culture. *Microb Ecol Health Dis*;5:105–10.
- 320) Sakurai T., Ohno N., Suzuki I., Yadomae T., 1995. Effect of soluble fungal (1-3)- beta- D-glucan obtained from *Sclerotinia sclerotiorum* on alveolar macrophage, activation. *Immunopharmacol.*, 30, 157-166.
- 321) Salit, L. E., and Gotschlich E. C., 1977. Type I *Escherichia coli* pili: characterization of binding to monkey kidney cells. *J. Exp. Med.* 146:1182-1194.
- 322) Salyers A. A., O'Brien M. & Kotarski S. F., 1982. Utilization of chondroitin sulfate by *Bacteroides thetaiotaomicron* growing in carbohydrate-limited continuous culture. *J. Bacteriol.* 150: 1008-1015.
- 323) Sansom B. F., and Gleed P. T., 1981. The ingestion of sow's faeces by suckling piglets. *Br. J. Nutr.* 46:451-456.
- 324) SCAN, 2000. Report of the Scientific Committee on animal nutrition on product Bioplus 2B for use as feed additive. European Commission, Health and

- consumer protection directorate, Unit B3-Management of scientific committees II
- 325) Scheuer J. P., Chalk T. B., 1986. Clinical test: Histology. Wolfe Medical Publ. Ltd, Netherlands.
- 326) Schöne F., Vetter A., Hartung H., Bergmann H., Biertumpfel A., Richter G., Muller S. & Breitschuh G., 2006. Effects of essential oils from fennel (*Foeniculi aetheroleum*) and caraway (*Carvi aetheroleum*) in pigs. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 90 (11-12), 500-510.
- 327) Sève B., Reeds P.J., Fuller M.F., Cadenhead A., Hay S.M., 1986. Protein synthesis and retention in some tissues of the young pig as influenced by dietary protein intake after early-weaning. Possible connection to the energy metabolism, *Reprod. Nutr. Dev.* 26 849–861
- 328) Shapiro S., and Guggenheim B., 1998a. Inhibition of oral bacteria by phenolic compounds. Part 1: QSAR analysis using molecular connectivity. *Quant Struct-Act Rel* 17: 327-337.
- 329) Shapiro S., and Guggenheim B., 1998b. Inhibition of oral bacteria by phenolic compounds. Part 2. Correlation with molecular descriptors. *Quant Struct-Act Rel* 17: 338-347.
- 330) Sharma, R., Schumacher U., Ronaasen V. and Coates, M., 1995. Rat intestinal mucosal responses to a microbial flora and different diets. *Gut*. 36: 209–214. Abrams, G. D. 1977. Microbial effects on mucosal structure and function. *Am. J. Clin. Nutr.* 30:1880–1886.
- 331) Sharon N., Lis H., 1993. Carbohydrates in cell recognition. *Scientific American*.
- 332) Shen Y. B., Piao X. S., Kim S. W., Wang L., Liu P., Yoon I. and Zhen Y. G., 2009. Effects of yeast culture supplementation on growth performance, intestinal health, and immune response of nursery pigs. *J ANIM SCI* 2009, 87:2614-2624.
- 333) Sherman P.M., Johnson-Henry K.C., Yeung H.P., Ngo P.S.C., Goulet J. & Tompkins T.A., 2005. Probiotics reduce enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7-and enteropathogenic *E. coli* O127:H6-induced changes in polarized T84 epithelial cell monolayers by reducing bacterial adhesion and cytoskeletal rearrangements. *Infect Immun*, Vol. 73, pp. (5183-5188).
- 334) Si W., Gong J., Tsao R., Zhou T., Yu H., Poppe C., Johnson R., and Du Z., 2006. Antimicrobial activity of essential oils and structurally related syntetic food additives towards selected pathogenic and beneficial gut bacteria. *J Appl Microbiol* 100: 296-305.
- 335) Sigvard T. and Elwinger K., 1998. Growth promotants in feeding pigs and poultry. Growth and feed efficeancy responses to antibiotic growth promotants. *Ann Zootech* 47: 85-97.
- 336) Sikkema J., De Bont J.A.M. and Poolman B., 1994. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *Journal of Biological Chemistry* 269 (11):8022–8028.
- 337) Sikkema, J., de Bont J.A. and Poolman B., 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 59: 201-222
- 338) Simon O., Jadamus A., Vahjen W., 2001. Probiotic feed additives-effectiveness and expected modes of action. *J. Anim. Feed Sci.*, 10, 1: 51–67.

- 339) Simpson, J. M., McCracken V. J., White B. A., Gaskins H. R., and Mackie R. I., 1999. Application of denaturant gradient gel electrophoresis for the analysis of the porcine gastrointestinal microbiota. *J. Microbiol. Methods*. 36:167-179.
- 340) Sinovec Z., 2000. Stimulatori rasta u ishrani nepreživara. Hemijska industrija Župa, Kruševac.
- 341) Sinovec Z., Nemanja Ševković, 2008. Praktikum iz ishrane, FVM, Beograd.
- 342) Sinovec Z., Ševković N., Kasalica T., 1994. Ishrana prasadi smešama bez mleka i smanjenom količinom proteina. *Veterinarski glasnik*, 48:435-443.
- 343) Skandamis, P., Koutsoumanis, K., Fasseas, K., Nychas, G.-J.E., 2001. Inhibition of oregano essential oil and EDTA on *Escherichia coli* O157:H7. *Italian Journal of Food Science* 13 (1), 65– 75.
- 344) Smith H. M. and Lucas I.A.M., 1956. The early weaning of pigs. 1. The effect upon growth of variations in protein, fat, sucrose, antibiotics, vitamin and mineral contents of diets for pigs 8-25 lb. weight and a comparison of wet and *dry* feeding. *J. Agric. Sci. (Camb.)* 48:220.
- 345) Sorrels K. M., Speck M. L., 1970. Inhibition of *Salmonella gallinarum* by culture filtrates of *Leuconostoc citrovorum*. *Journal of Dairy Science*, 59: 338-343.
- 346) Spiegel J., Rose R., Karabell T., Frankos V., Schmitt D., 1994. Safety and benefits of fructo-oligosaccharides as food ingredients. *Food Technology*.
- 347) Spitz F., 1986. Current state of knowledge of wild boar biology. *Pig News and Information* 7, 171-175.
- 348) Spreeuwenberg M.J., Verdonk J.M., Gaskins H.R., Verstegen M.W., 2001. Small intestine epithelial barrier function is compromised in pigs with low feed intake at weaning. *J. Nutr.* 131: 1520–1527.
- 349) Spriet, S.M., Decuypere, J.A., Henderickx, H.K., 1987. Effect of *Bacillus toyoi* (Toyocerin) on the gastrointestinal microflora, concentration of some bacterial metabolites, digestibility of the nutrients and the small intestinal mean retention time in pigs. *Meded. Fac. Landbouwk. Rijksuniv. Gent*. 52, 1673.
- 350) Spring P., 1995. Competitive exclusion of salmonella using bacterial cultures and oligosaccharides. In: *Biotechnology in the Feed Industry. Proc. Alltechs 11<sup>th</sup> Annual Symposium*. (Ed.: T. P. Lyons) Nicholasville Kentucky. 383-388.
- 351) SRPS ISO 5983/2001. Hrana za životinje – Određivanje sadržaja azota i izračunavanje sadržaja sirovih proteina, Metoda po Kjeldalu
- 352) SRPS ISO 5984/2002. Hrana za životinje – Određivanje sadržaja sirovog pepela
- 353) SRPS ISO 6490-1/2001. Hrana za životinje – Određivanje sadržaja kalcijuma, Deo 1: Volumetrijska metoda
- 354) SRPS ISO 6491/2002. Hrana za životinje – Određivanje sadržaja fosfora, spektrometrijska metoda
- 355) SRPS ISO 6492/2001. Hrana za životinje – Određivanje sadržaja masti
- 356) SRPS ISO 6496/2001. Hrana za životinje – Određivanje sadržaja vlage i drugih isparljivih materija
- 357) SRPS ISO 6865/2004. Hrana za životinje – Određivanje sadržaja sirove celuloze, metoda sa međufiltracijom



- 358) Stavric S., D'Aoust J. Y., 1993. Undefined and defined bacterial preparations for the competitive exclusion of Salmonella in poultry review. *Journal of Food Protection*, 56: 173-180.
- 359) Stavric S., Gleeson T. M., Blanchfield B., Pivnick H., 1985. Competitive exclusion of Salmonella from newly hatched chicks by mixtures of pure bacterial cultures isolated from fecal and cecal contents of adult birds. *Journal of Food Prot.*, 56: 173.
- 360) Stavric, S., 1992. Defined cultures and prospects. *International Journal of Food Microbiology*, 55: 245-263.
- 361) Steer T., Carpenter H., Tuohy K. and Gibson G.R., 2000. Perspectives on the role of the human gut microbiota and its modulation by pro- and prebiotics. *Nutr Res Rev* 13, 229-254.
- 362) Stevanović J., 2004. Fiziologija organa za varenje kod domaćih životinja. Autorsko izdanje.
- 363) Stevens A. J., 1963. Enteritis in pigs – a working hypothesis. *Br. Vet. J.* 119: 520-522.
- 364) Stewart C. S., 1999. Microorganisms in hindgut fermentors. 2nd edition. In : *Gastrointestinal Microbiol.*, R. I. Mackie and B. A. White, eds. Chapman and Hall Microbiol. Series. New York.
- 365) Stewart C. S., Hillman K., Maxwell F., Kelly D., and King T. P., 1993. Recent advances in probiosis in pig: Observations on the microbiology of the pig gut. In: *Recent Advances in Animal Nutrition*. P. C. Garnsworthy and D. J. Cole, eds. Nottingham University Press, Nottingham, UK.
- 366) Sweeney T., Dillon S., Fanning J., Egan J., O'Shea C.J., Figat S., Gutierrez J.J.M., Mannion C., Leonard F., O'Doherty J.V., 2011. Evaluation of seaweed-derived polysaccharides on indices of gastrointestinal fermentation and selected populations of microbiota in newly weaned pigs challenged with Salmonella Typhimurium. *Animal Feed Science and Technology* 165 85–94.
- 367) Swords W. E., Wu C. C., Champlin F. R., and Buddington R. K., 1993. Postnatal changes in selected bacterial groups of the pig colonic microflora. *Biol. Neonate* 63:191-200.
- 368) Šefer D., 2002. Efekat korišćenja fitaze u ishrani prasadi na proizvodne rezultate, iskoristivost fosfora I stepen mineralizacije koštanog tkiva. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, 69 strana.
- 369) Ševković N., Pribičević S., Rajić I., 1983. Ishrana domaćih životinja. Naučna knjiga, Beograd.
- 370) Takahashi S., Yayoi E., Nobuyuki S., Takamitsu T., and Ushida K., 2007. Oral administration of Lactobacillus plantarum strain Lq80 to weaning piglets stimulates the growth of indigenous lactobacilli to modify the lactobacillar population. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 53, 325–332.
- 371) Takashi S., 1987. Stimulatory effect of short-chain fatty acids on epithelial cell proliferation in the rat intestine : a possible explanation for trophic effects of fermentable fibre, gut microbes and luminal trophic factors. *British Journal of Nutrition*, 58, 95-103.
- 372) Tanaka R., Takayama H., Morotomi M., 1983. Effects of administration of TOS and bifidobacterium breve 4006 on the human fecal flora. *Bifidobacteria Microflora* 2:17–24.

- 373) Tang M., Laarveld B., Van Kessel A. G., Hamilton D. L., Estrada A. and Patience J. F., 1999. Effect of segregated early weaning on postweaning small intestinal development in pigs. *J ANIM SCI*, 77: 3191-3200.
- 374) Tang Z. R., Yin Y. L., Nyachoti C. M., Huang R. L., Li T. J., Yang C. B., 2005. Effect of dietary supplementation of chitosan and galactomannan oligosaccharide on serum parameters and the insulin-like growth factor-I mRNA expression in early-weaned piglets. *Domestic Animal Endocrinology*, 28, 430-441.
- 375) Taras D., Vahjen W., Macha M., Simon O., 2005. Response of performance characteristics and fecal consistency to long-lasting dietary supplementation with the probiotic strain *Bacillus cereus* var. *toyoi* to sows and piglets. *Arch. Anim. Nutr.* 59, 405–417.
- 376) Te Brake J.H.A., 1972. Pig rearing in cages-the extraearly weaning of piglets and the fertility of sows. 23 rd FAAP, Verona.
- 377) Te Brake, J.H.A., 1976. An assessment of the most profitable length of lactation for producing piglets of 20 kg body weight. *Livest. Prod. Sci.*, 5:81-94.
- 378) Thomlinson, J. R., 1969. Post-weaning enteritis and dysentery. *Vet. Rec.* 85: 298-300.
- 379) Tokach M.D., S.S. Dritz, R.D. Goodband and J.L. Nelssen, 2003. Pluske, J. Le Dividich, M.W.A. Verstegen 2003. Nutritional requirements of the weaned pig. Weaning the pig – concepts and consequences. Wageningen Academic Publishers The Netherlands
- 380) Trevisi P., Merialdi G., Mazzone M., Casini L., Tittarelli C., De Filippi, S., Minieri L., Lalatta-Costerbosa, G. & Bosi P., 2007. Effect of dietary addition of thymol on growth, salivary and gastric function, immune response, and excretion of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, in weaning pigs challenged with this microbe strain. *Italian Journal of Animal Science*, 6 (Suppl. 1), 374-376.
- 381) Trivers R.L., 1974. Parent-offspring conflict. *Am. Zool.*, 14: 249-264.
- 382) Tugrul T. K., 1995. Comparison of the gastrointestinal anatomy, physiology, and biochemistry of humans and commonly used laboratory animals. *Biopharmaceutics & drug disposition*, vol. 16, 351-380.
- 383) Tung M. C., 2010. Effects of mannan oligosaccharide on immune function and disease resistance in pigs. PhD thesis, University of Illinois, 152 p.
- 384) Ultee A., Bennink M.H.J., Moezelaar R., 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. and Environ. Microbiol.* 68 (4):1561–1568. PhD thesis, ISBN 90- 5808-219-9.
- 385) Ultee A., Kets E.P.W., Alberda M., Hoekstra F.A. and Smid E.J., 2000. Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. *Archives of Microbiolo* 174 (4), 233– 238.
- 386) Ultee A., Kets W. E. P., and Smid E. J., 1999. Mechanism of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microb* 65:4606-4610.
- 387) Ushakova N. A., Kotenkova E. V., Kozlova A. A., Nifatov A. V., 2006. A study of the mechanisms of probiotic effect of *Bacillus subtilis* strain 8130. *Applied Biochemistry and Microbiology* Volume 42, Issue 3, pp 252-257

- 388) van Beers-Schreurs H.M., Nabuurs M.J., Vellenga L., van der Kalsbeek V., Wensing T., Breukink H.J., 1998. Weaning and the weanling diet influence the villous height and crypt depth in the small intestine of pigs and alter the concentrations of short-chain fatty acids in the large intestine and blood, *J. Nutr.* 128 947–953.
- 389) van Beers-Schreurs, H. M. G., M. J. A. Nabuurrs, L. Vellenga and H. J. Breukink. 1995. The effect of weaning and diets on villous height and crypt depth in the small intestines of piglets. In *Proc. of IXth Int'l Conf. Prod. Dise. Farm Anim.* Berlin, Germany, p. 103.
- 390) Van de Braak S.A.A.J., Leijten G.C.J.J., 1999. Essential Oils and Oleoresins: A Survey in the Netherlands and other Major Markets in the European Union. CBI, Centre for the Promotion of Imports from Developing Countries, Rotterdam, p. 116.
- 391) Van Der Heyde H., 1971a. Feeding of piglets weaned at an age of 4-10 days. Symposium, Zurich.
- 392) Van Der Heyde H., Van Nienwerburgh G. and Christianes J., 1971b. Rano odbijanje prasadi sa naročitim sa naročitim osvrtom na plodnost krmača. Simpozijum, Subotica.
- 393) van der Peet-Schwering, C. M. C., Jansman A. J. M., Smidt H., and Yoon I.. 2007. Effects of yeast culture on performance, gut integrity, and blood cell composition of weaning pigs. *J. Anim. Sci.* 85:3099–3109.
- 394) Van der Waaij D., 1989. The ecology of the human intestine and its consequences for overgrowth by pathogens such as *Clostridium difficile*. *Ann. Rev. Microbiol.* 43:69-87.
- 395) Van Kessel A., Shirkey T. W., Siggers R. H., Drew M. D., and Laarveld B., 2004. Commensal bacteria and intestinal development. Studies using gnotobiotic pigs. In: *Interfacing immunity, gut health and performance*. L. A. Tucker and J. A. Taylor-Pickard, eds. Nottingham University Press, Nottingham, UK.
- 396) Van Loo J., Coussement P., De Leenheer L., Hoebregs H. & Smits G., 1995. Inulin and oligofructose in the western diets. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Technol.* (in press).
- 397) Van Nevel C.J., Decuypere J.A., Dierick N., Molly K., 2003. The influence of *Lentinus edodes* (Shiitake mushroom) preparations on bacteriological and morphological aspects of the small intestine in piglets. *Arch. Anim. Nutr.* 57:399-412
- 398) Van Putten G. and Dammers J., 1976. A comparative study of the well being of piglets reared conventionally and in cages. *Appl. Anita. Ethol.*, 2: 339-356.
- 399) Veum T. V. and Odle J., 2001. Feeding neonatal pigs. Pg. 671–690 in *Swine Nutrition*, 2nd ed. A. J. Lewis and L. L. Southern, ed. CRC Press, New York, NY.
- 400) Vila B., Esteve-Garcia E. and Brufau J., 2010. Probiotic micro organisms: 100 year of innovation and efficacy; modes of action. *World's Poult. Sci. J.*, 65:369-380
- 401) Vincent, J. G., Veonett, R. C., Riley, R. G., 1959. Antibacterial activity associated with *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Bacteriology*, 78: 477-484.

- 402) Vondruskova H., Slamova R., Trckova M., Zraly Z., Pavlik I., 2010. Alternatives to antibiotic growth promoters in prevention of diarrhoea in weaned piglets: a review. *Veterinarni Medicina*, 55, (5): 199–224.
- 403) Wallgren P. and Melin L., 2001. Weaning systems in relation to disease. In: *The weaner pig. Nutrition and management*. M.A. Varley and J Wiseman eds. CABI Publishing, UK
- 404) Walsh A.M., Sweeney T. O'Shea C.J., Doyle D.N., O'Doherty J.V., 2013. Effect of supplementing varying inclusion levels of laminarin and fucoidan on growth performance, digestibility of diet components, selected faecal microbial populations and volatile fatty acid concentrations in weaned pigs. *Animal Feed Science and Technology*, Volume 183, Issue 3, Pages 151-159.
- 405) Wang J.Q., Yin F.G., Zhu C., Yu H., Niven S.J., de Lange C.F.M., Gong J., 2012. Evaluation of probiotic bacteria for their effects on the growth performance and intestinal microbiota of newly-weaned pigs fed fermented high-moisture maize *Livestock Science* 145, 79–86.
- 406) Wang X. and Gibson G. R., 1993. Effects of the in vitro fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine. *}. Appl. Bacteriol.* 75: 373-380.
- 407) Wang Y., Cho J.H., Chen Y.J., Yoo J.S., Huang Y., Kim H.J., Kim I.H., 2009. The effect of probiotic BioPlus 2B® on growth performance, dry matter and nitrogen digestibility and slurry noxious gas emission in growing pigs. *Livestock Science* 120, 35–42
- 408) Weary D.M, Appleby M.C, Fraser D., 1999. Responses of piglets to early separation from the sow. *Appl Anim Behav Sci.*;4:289-300.
- 409) Welsh M. L., Smith P. L., Fromm M. & Frizzell R. A., 1982. Crypts are the site of intestinal fluid and electrolyte secretion. *Science* 218, 1219-1221.
- 410) Wenk C., 2003. Herbs and botanicals as feed additives in monogastric animals. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* Vol. 16, No. 2 : 282-289.
- 411) White L. A., Newman M. C., Cromwell G. L. and Lindemann M. D., 2002. Brewers dried yeast as a source of mannan oligosaccharides for weanling pigs. *J ANIM SCI*, 80:2619-2628.
- 412) Wierup, M., 1998. Animal health effects of the new feed act of 1986. In: *Ministry of Agriculture-Seminar on the Swedish Model of Animal Production*, Stockholm 3-4 Sept., 6-7.
- 413) Windisch W., Schedle K., Plitzner C. and Kroismayr A., 2008. Use of phytogetic products as feed additives for swine and poultry. *J ANIM SCI*, 86:E140-E148
- 414) Wood-Gush D.G.M. and Csermely D., 1981. A note on the diurnal activity of early-weaned piglets in flat-deck cages at 3 and 6 weeks of age. *Anim. Prod.*, 33: 107-110.
- 415) Wostmann B. S. 1996. *Germfree and gnotobiotic animal models: background and applications*. Boca Raton, FL: CRC Press.
- 416) Wu G., Meier S.A., Knabe D.A., 1996. Dietary glutamine supplementation prevents jejunal atrophy in weaned pigs, *J. Nutr.* 126: 2578–2584.
- 417) Xu R.J., Wang F., Zhang S.H., 2000. Postnatal adaptation of the gastrointestinal tract in neonatal pigs: a possible role of milk-borne growth factors. *Livestock Production Science* 66:95–107.

- 418) Xu, Z.R., Zou, X.T., Hu, C.H., Xia, M.S., Zhan, X.A Wang, M.Q., 2002. Effects of dietary fructooligosaccharide on digestive enzyme activities, in testinal microflora and morphology of growing pigs. *Asian Austral. J. Anim. Sci.* 15:1784-1789.
- 419) Yamashita, K., 1984. Effects of fructo-oligosaccharides on blood glucose and serum lipids in diabetic subjects. *Nutrition Research*, 4, 961-966
- 420) Yildirim Z., Winters D.K., Johnson M.G., 1999: Purification, amino acid sequence and mode of action of bifidocin B produced by *Bifidobacterium bifidum* NCFB 1454. *J Appl Microbiol*; 86: 45–54.
- 421) Yin Y.-L., Tang Z. R, Sun Z. H., Liu Z. Q., Li T. J., Huang R. L., Ruan Z., Deng Z. Y., Gao B., Chen L. X., Wu G. Y. and Kim S. W., 2008. Effect of Galacto-mannan oligosaccharides or Chitosan Supplementation on Cytoimmunity and Humoral Immunity in Early-weaned Piglets. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 21 (5):723-731.
- 422) Zani J. L., Cruz F. W. D., Santos F. D. and Gil-Turnes C., 1998. Effect of probiotic CenBiot on the control of diarrhoea and feed efficiency in pigs. *J. Appl. Microbiol.* 84:68-71.
- 423) Zhao P. Y., Jung J. H. and Kim I. H., 2012. Effect of mannan oligosaccharides and fructan on growth performance, nutrient digestibility, blood profile, and diarrhea score in weanling pigs. *J ANIM SCI*, 90:833-839.
- 424) Zheji Li, Ganfeng Y., Jingdong Y., Peng S., Defa L. and Chris K., 2008. Effects of Organic Acids on Growth Performance, Gastrointestinal pH, Intestinal Microbial Populations and Immune Responses of Weaned Pigs. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* Vol. 21, No. 2 : 252 – 261.
- 425) Zhou F., Baoping J., Hong Z., Hui J., Zhiwei Y., Jing J. L., Jihai L. and Wenjie Y., 2007. The antibacterial effect of cinnamaldehyde, thymol, carvacrol and their combinations against the foodborne pathogen salmonella typhimurium. *Journal of Food Safety* 27 124–133.
- 426) Zhou T.X., Cho J.H., Kim I.H., 2012. Effects of supplementation of chito-oligosaccharide on the growth performance, nutrient digestibility, blood characteristics and appearance of diarrhea in weanling pigs. *Livestock Science* 144, 263–268.
- 427) Zijlstra R.T., Whang K.Y., Easter R.A., Odle J., 1996. Effect of feeding a milk replacer to earlyweaned pigs on growth, body composition, and small intestinal morphology, compared with suckled littermates, *J. Anim. Sci.* 74, 2948–2959.
- 428) Zoetendal E. G., Akkermans A. D. L., Akkermans-van Vliet W. M., Arjan J. A., de Visser G. M., and de Vos W. M., 2001. The host genotype affects the bacterial community in the human gastrointestinal tract. *Microb. Ecol. Health Disease* 13:129-134.

## 9. PRILOG

**Prilog 1.** Dužina crevnih resica u ispitivanim segmentima jejunuma, [ $\mu\text{m}$ ]

Grupa	n	Mere varijacije						X min.	X max.
		X	$\pm$	Sx	Sd	Cv			
K	59	498,10		14,65	112,50	22,59	280,00	728,00	
O-I	60	732,70		15,15	117,30	16,02	308,00	924,00	
O-II	60	507,50		11,45	88,72	17,48	308,00	714,00	
O-III	50	549,40		17,85	126,20	22,97	266,00	770,00	

**Prilog 2.** Širina crevnih resica u ispitivanim segmentima jejunuma, [ $\mu\text{m}$ ]

Grupa	n	Mere varijacije						X min.	X max.
		X	$\pm$	Sx	Sd	Cv			
K	60	66,50		2,41	18,70	28,12	42,00	112,00	
O-I	60	84,23		2,29	17,76	21,09	56,00	126,00	
O-II	60	67,43		2,46	19,03	28,22	42,00	126,00	
O-III	60	71,17		1,57	12,17	17,10	42,00	98,00	

**Prilog 3.** Dubina kripti u ispitivanim segmentima jejunuma, [ $\mu\text{m}$ ]

Grupa	n	Mere varijacije					X min.	X max.
		X	$\pm$	Sx	Sd	Cv		
K	57	166,8		7,32	55,26	33,14	84,00	294,00
O-I	57	178,10		7,16	54,08	30,37	98,00	280,00
O-II	58	206,90		9,99	76,14	36,81	98,00	420,00
O-III	57	159,90		7,95	60,04	37,55	84,00	336,00

**Prilog 4.** Dubina kripti u ispitivanim segmentima cekuma, [ $\mu\text{m}$ ]

Grupa	n	Mere varijacije					X min.	X max.
		X	$\pm$	Sx	Sd	Cv		
K	60	124,40		3,95	30,62	24,62	70,00	210,00
O-I	58	154,5		6,73	51,25	33,18	84,00	336,00
O-II	60	146,80		5,18	40,14	27,35	70,00	280,00
O-III	58	148,70		5,91	45,03	30,28	84,00	294,00

## **10. BIOGRAFIJA**

Stamen Radulović je rođen 12. decembra 1980. godine u Šapcu. Osnovnu i srednju školu završio je u Šapcu. Veterinarski fakultet Univerziteta u Beogradu upisao je školske 1999/2000. godine, a diplomirao 21. marta 2008. godine sa prosečnom ocenom 9,00. Nakon diplomiranja, u oktobru 2008. godine upisao je poslediplomske, doktorske akademske studije, smer veterinarska preventivna medicina. Iste godine izabran je za stručnog saradnika na Katedri za Ishranu i botaniku na Veterinarskom fakultetu, a 2010. godine izabran je u zvanje asistenta na istoj Katedri, gde je i dalje angažovan. Stamen Radulović učestvuje u izvođenju praktične nastave na osnovnim integrisanim akademskim studijama Fakulteta veterinarske medicine na predmetima Ishrana i Botanika i aktivno učestvuje u radu laboratorije. Kao autor i koautor učestvovao je u izradi 30 naučnih radova. Od 2010. godine uključen je u projekat Ministarstva nauke i prosvete Republike Srbije 46002 III: Molekularno-genetička i ekofiziološka istraživanja u zaštiti autohtonih animalnih genetičkih resursa, očuvanju dobrobiti, zdravlja i reprodukcije gajenih životinja i proizvodnji bezbedne hrane.



**Prilog 1.**

**Izjava o autorstvu**

Potpisani-a \_\_\_\_\_ Stamen B. Radulović \_\_\_\_\_

broj indeksa \_\_\_\_\_ 15/13 \_\_\_\_\_

**Izjavljujem**

da je doktorska disertacija pod naslovom

\_\_\_\_\_  
"Ispitivanje uticaja prirodnih stimulatora rasta na zdravstveno stanje i proizvodne  
rezultate prasadi u odgoju"  
\_\_\_\_\_

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

**Potpis doktoranda**

U Beogradu, 25. april 2014.



\_\_\_\_\_

Prilog 2.

## Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora : Stamen B. Radulović

Broj indeksa : 15/13

Studijski program: Veterinarska preventivna medicina

Naslov rada

``Ispitivanje uticaja prirodnih stimulatora rasta na zdravstveno stanje i proizvodne rezultate prasadi u odgoju``

Mentor : dr Dragan Šefer

Potpisani/a : Stamen B. Radulović

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

**Potpis doktoranda**

U Beogradu, 25. april, 2014.



---

### Prilog 3.

## Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

„Ispitivanje uticaja prirodnih stimulatora rasta na zdravstveno stanje i proizvodne rezultate prasadi u odgoju“

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poleđini lista).

**Potpis doktoranda**

U Beogradu, 25. april, 2014.



---

1. Autorstvo - Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. Autorstvo – nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
3. Autorstvo - nekomercijalno – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
4. Autorstvo - nekomercijalno – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
5. Autorstvo – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.