ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΘΡΕΨΕΩΣ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

ΜΕΛΕΤΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ ΕΠΙ ΤΗΣ ΣΥΣΤΑΣΗΣ ΤΗΣ ΕΝΤΕΡΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΧΛΩΡΙΔΑΣ ΟΡΝΙΘΙΩΝ ΚΡΕΟΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

ΙΡΙΔΑ ΠΑΛΑΜΙΔΗ

Συμβουλευτική επιτροπή:

Μουντζούρης Κ. Επίκουρος Καθηγητής
Μπιζέλης Ι. Αναπληρωτής Καθηγητής
Οικονομόπουλος Ι. Επίκουρος Καθηγητής

Αθήνα, Σεπτέμβριος 2011

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΘΡΕΨΕΩΣ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

ΜΕΛΕΤΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ ΕΠΙ ΤΗΣ ΣΥΣΤΑΣΗΣ ΤΗΣ ΕΝΤΕΡΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΧΛΩΡΙΔΑΣ ΟΡΝΙΘΙΩΝ ΚΡΕΟΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

ΙΡΙΔΑ ΠΑΛΑΜΙΔΗ

Εξεταστική επιτροπή:

Μουντζούρης Κ. Επίκουρος Καθηγητής
Μπιζέλης Ι. Αναπληρωτής Καθηγητής
Οικονομόπουλος Ι. Επίκουρος Καθηγητής

Αθήνα, Σεπτέμβριος 2011

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θεωρώ μεγάλη μου υποχρέωση και επιθυμώ ειλικρινά να ευχαριστήσω όσους με τον τρόπο τους συνέβαλαν στην πραγματοποίηση και ολοκλήρωση της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης.

Ευχαριστώ θερμά :

- Τον Καθηγητή Ζέρβα Γ., τον Καθηγητή Κ. Φεγγερό και τον Λέκτορα κ. Παπαδομιχελάκη Γ.
- Τον κ. Μπιζέλη Ι. Αναπληρωτή καθηγητή καθώς και τον κ. Οικονομόπουλο Ι. Επίκουρο καθηγητή για την συμμετοχή τους στην εξεταστική επιτροπή και τις πολύτιμες υποδείξεις τους.
- Τον κ. Τσιρτσίκο Π. υποψήφιο διδάκτορα για τη βοήθεια του κατά τη διάρκεια του πειραματικού μέρους και για την υποστήριξη που μου παρείχε καθόλη τη διάρκεια της μεταπτυχιακής μου μελέτης.
- Την οικογένεια μου και τους φίλους μου για την συμπαράσταση τους

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα το κ. Μουντζούρη Κ. Επίκουρο Καθηγητή, που μου έδωσε για ακόμα μια φορά την ευκαιρία να εξελιχθώ σε επιστημονικό επίπεδο, που ήταν πάντα δίπλα μου, με καθοδηγούσε και μου έδινε συνέχεια εναύσματα να πετύχω το καλύτερο δυνατό αποτέλεσμα.

Περιεχόμενα

Α. *Περίληψη* ..... - 1 -

Β. *Abstract* ..... - 3 -

Γ. Θεωρητικό μέρος ..... - 5 -

1. Εισαγωγή ..... - 5 -

2. Εντερικό οικοσύστημα ..... - 7 -

2.1. Αποίκηση και κατανομή της μικροχλωρίδας στον εντερικό σωλήνα ..... - 7 -

2.2. Ποσοτική και ποιοτική εκτίμηση της μικροχλωρίδας του εντερικού σωλήνα ..... - 8 -

2.2.1. Παράγοντες που επιδρούν στη σύσταση της εντερικής μικροχλωρίδας ... - 8 -

2.2.2. Διαφοροποίηση της σύστασης κατά μήκος του εντερικού σωλήνα ..... - 9 -

2.2.3. Μεταβολική δραστηριότητα της μικροχλωρίδας στο τυφλό έντερο ..... - 13 -

3. Αναλυτικές τεχνικές διερεύνησης της μικροχλωρίδας ..... - 15 -

3.1. Συμβολή 16S rRNA γονιδίου στην διερεύνηση της μικροχλωρίδας ..... - 15 -

3.2. Μοριακές αναλυτικές τεχνικές και διερεύνηση της σύστασης της εντερικής μικροχλωρίδας ορνιθίων ..... - 16 -

4. Προβιοτικά ..... - 18 -

4.2. Ιστορική αναδρομή ..... - 18 -

4.3. Ορισμός και κριτήρια επιλογής ..... - 18 -

4.4. Εφαρμογή στην πράξη ..... - 19 -

4.5. Μηχανισμοί δράσεις των προβιοτικών ..... - 22 -

4.5.2. Αντιμικροβιακή δράση ..... - 23 -

4.5.3. Ενίσχυση της λειτουργίας του εντερικού φραγμού ..... - 24 -

4.5.4. Ρύθμιση της ανοσοποιητικής απάντησης ..... - 25 -

4.6. Επιδράσεις των προβιοτικών στα ορνίθια ..... - 26 -

Δ. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ ..... - 28 -

1. Σκοπός ..... - 28 -

2. Υλικά και Μέθοδοι ..... - 28 -

2.1. Χώρος διεξαγωγής του πειράματος ..... - 28 -

2.2. Πειραματικό Ζωικό Υλικό- Πειραματικός Σχεδιασμός ..... - 28 -

2.3. Παράμετροι που προσδιορίστηκαν ..... - 31 -

2.4. Μικροβιολογικές αναλύσεις ..... - 33 -

2.4.1. Φθορίζουσα in situ υβριδοποίηση (FISH) ..... - 33 -

2.4.2. Καλλιέργεια ..... - 36 -

2.4.3. Διαδικασία προσδιορισμού της συγκέντρωσης των πτητικών λιπαρών οξέων (Π.Λ.Ο) ..... - 38 -

2.5. Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων ..... - 38 -

3. Αποτελέσματα ..... - 39 -

3.1. Παραγωγικά χαρακτηριστικά ..... - 39 -

3.2. Συγκέντρωση βακτηριακών πληθυσμών ..... - 42 -

3.2.1. Φθορίζουσα in situ υβριδοποίηση ..... - 42 -

3.2.2. Καλλιέργεια ..... - 48 -

3.3. Συγκέντρωση πτητικών λιπαρών οξέων ..... - 52 -

4. Σχολιασμός ..... - 59 -

Ε. Συμπεράσματα ..... - 64 -

ΣΤ. Βιβλιογραφία ..... - 66 -

ΜΕΛΕΤΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ ΕΠΙ ΤΗΣ ΣΥΣΤΑΣΗΣ ΤΗΣ ΕΝΤΕΡΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΧΛΩΡΙΔΑΣ ΟΡΝΙΘΙΩΝ ΚΡΕΟΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

ΙΡΙΔΑ ΠΑΛΑΜΙΔΗ

Τμήμα Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής και Υδατοκαλλιεργειών,
Εργαστήριο Φυσιολογίας Θρέψεως και Διατροφής, Ιερά Οδός 75, Αθήνα 118 55
email: kmountzouris@aua.gr

Α. *Περίληψη*

Σκοπός του πειράματος ήταν η μελέτη της επίδρασης του επιπέδου προσθήκης ενός προβιοτικού σκευάσματος στη διατροφή ορνιθίων κρεοπαραγωγής επί των παραγωγικών χαρακτηριστικών, της σύστασης και της μεταβολικής δραστηριότητας της μικροχλωρίδας των τυφλών εντέρων. Σε 448 ορνίθια Cobb ηλικίας $1^{ας}$ ημέρας αποτελούμενα από ίσο αριθμό αρσενικών (♂) και θηλυκών (♀) ορνιθίων χορηγήθηκε βασικό σιτηρέσιο (ΒΣ) με βάση τον αραβόσιτο και τη σόγια και ανάλογα με το είδος της προσθήκης κατανεμήθηκαν στις ακόλουθες 4 επεμβάσεις με 4 επαναλήψεις η καθεμιά (2 επαναλήψεις ♂ και 2 επαναλήψεις ♀ ανά επέμβαση): α) του μάρτυρα (C) χωρίς καμία επιπλέον προσθήκη στο ΒΣ, β) του προβιοτικού συγκέντρωσης 10^8 CFU/ kg τροφής (PL), γ) του προβιοτικού συγκέντρωσης 10^9 CFU/ kg τροφής (PH) και δ) του αντιβιοτικού με προσθήκη 2,5 mg αβιλαμυκίνης / kg τροφής (A). Η χρονική διάρκεια του πειράματος ήταν 6 εβδομάδες. Προσδιορίστηκαν η αύξηση του ζώντος βάρους (ΣΑΖΒ), η κατανάλωση της τροφής (ΣΚΤ), και ο συντελεστής εκμετάλλευσης (ΣΕ) για όλη τη διάρκεια του πειράματος. Επίσης προσδιορίστηκε η σύσταση της μικροχλωρίδας των τυφλών εντέρων σε ορνίθια ηλικίας 42 ημερών με τη βοήθεια φθορίζουσας *in situ* υβριδοποίησης (FISH) και καλλιεργειών, καθώς και η συγκέντρωση των πτητικών λιπαρών οξέων (ΠΛΟ) στο εντερικό περιεχόμενο. Η ΣΑΖΒ και ΣΚΤ αυξήθηκε σημαντικά (P=0,002 και P=0,005) με την προσθήκη του προβιοτικού στο σιτηρέσιο σε σχέση με το μάρτυρα. Ανεξάρτητα από την επέμβαση, τα αρσενικά ορνίθια είχαν υψηλότερη ΣΑΖΒ και ΣΚΤ (P<0,001 και P<0,001) και καλύτερο ΣΕ (P=0,003) από τα θηλυκά ορνίθια. Στο μεικτό πληθυσμό (♂ και ♀) καθώς και στα αρσενικά ορνίθια παρουσιάστηκε γραμμική αύξηση (P=0,001 και P=0,001, αντίστοιχα) στη συγκέντρωση του γένους *Bifidobacterium* με το επίπεδο προσθήκης του προβιοτικού. Η καλλιέργεια

της εντερικής μικροχλωρίδας σε επιλεκτικά θρεπτικά υλικά έδειξε ότι το γένος *Clostridium* στα αρσενικά ορνίθια είχε υψηλότερη συγκέντρωση (P≤0,05) στην επέμβαση του μάρτυρα. Το επίπεδο προσθήκης του προβιοτικού στο σιτηρέσιο οδήγησε σε γραμμική αύξηση (P=0,036) της ολικής συγκέντρωσης Π.Λ.Ο. και γραμμική μείωση της μοριακής αναλογίας του προπιονικού (P=0,009). Τέλος, προέκυψε γραμμική και τετραγωνική επίδραση στη μοριακή αναλογία του βουτυρικού (P≤0,001 και P=0.011) και του οξικού οξέος (P=0,009 και P=0,037) με το επίπεδο προσθήκης του προβιοτικού στο σιτηρέσιο. Συμπερασματικά, τα παραγωγικά χαρακτηριστικά, η σύσταση και η μεταβολική δραστηριότητα της εντερικής μικροχλωρίδας των τυφλών εντέρων επηρεάστηκαν από το επίπεδο προσθήκης του προβιοτικού.

Λέξεις κλειδιά: προβιοτικό, ορνίθια κρεοπαραγωγής, εντερική μικροχλωρίδα, πτητικά λιπαρά οξέα.

EFFECT OF PROBIOTIC ADMINISTRATION IN BROILER NUTRITION ON THE COMPOSITION OF THE INTESTINAL MICROFLORA

IRIS PALAMIDI

Faculty of Animal Science & Aquaculture, Department of Nutritional Physiology and Feeding, Iera Odos 75, Athens 118 55
email: kmountzouris@aua.gr

B. *Abstract*

The aim of this experiment was to investigate the effect of the inclusion level of a probiotic on broiler growth performance and on the composition and metabolic activity of cecal microflora. Four hundred and forty-eight, 1-day-old, Cobb broilers consisting of equal numbers of male (♂) and female (♂) broilers received a maize-soybean meal basal diet (BD) and depending on the type of addition in the BD were allocated in the following 4 experimental treatments with four replicates each (2 replicates ♂ and two replicates ♀ per treatment): a) BD no-additions (C), b) 10^8 CFU probiotic /kg BD (PL), c) 10^9 CFU probiotic /kg BD (PH) and d) 2,5 mg avilamycin/kg BD (A). The duration of the experiment was 6 weeks. Treatment effects on body weight gain (BWG), feed intake (FI) and feed conversion ratio (FCR) were determined for the whole experiment. The cecal microflora of 42-d old broilers was determined via fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and culture methods. In addition, the concentration and molar ratios of cecal volatile fatty acids (VFA) were determined. BWG and FI were higher (P=0,003 and P=0,007) in probiotic and antibiotic treatments, than C. Regardless of treatment, male broilers had higher BWG and FI (P<0,001 and P<0,001) and improved FCR (P=0,003) compared with female broilers. In mixed broilers (♂ and♀), as well as in male broilers a linear increase (P=0,001 and P=0,001, respectively) was shown for the concentration of *Bifidobacterium* with increasing probiotic level. Concentration of *Clostridium* of male broilers was higher (P≤0, 05) in treatment C as determined by the culture method. The increase of the inclusion level of the probiotic in feed led to linear increase (P=0,036) of total VFA and linear decrease (P=0,004) of propionic acid. Linear and quadratic effects of probiotic inclusion were observed on molar ration of butyric acid (P≤0,001 and P=0.011) and acetic acid (P=0,009 and P=0,037). In conclusion, the inclusion level of the probiotic

affected broiler performance of as well as the composition and the metabolic activity of cecal microflora.

Keywords: probiotic, broiler, performance, cecal microflora, volatile fatty acids.

Γ. Θεωρητικό μέρος

1. Εισαγωγή

Ο γαστρεντερικός σωλήνας των θερμόαιμων ζώων που η διατροφή τους περιέχει σύνθετους υδατάνθρακες φιλοξενεί ένα μεγάλο αριθμό βακτηριακών πληθυσμών. Η πολύπλοκη αυτή συλλογή βακτηριακών ειδών που αποικίζει σε όλο του το μήκος τον πεπτικό σωλήνα αναφέρεται ως εντερική μικροχλωρίδα (Perry 2006).

Παρόλο που οι περισσότεροι μικροοργανισμοί που αποικίζουν το γαστρεντερικό σωλήνα θεωρούνται ως επωφελείς ή συμβιωτικοί, συγκεκριμένα βακτηριακά είδη (παθογόνα ή δυνητικά παθογόνα) επιφέρουν αρνητικές επιδράσεις στην υγεία των ζώων προκαλώντας θνησιμότητα ή/και σαφή ελάττωση της ανάπτυξης (Perry 2006). Συνεπώς η σχέση που αναπτύσσεται ανάμεσα στο ξενιστή (θηλαστικό, πτηνό) και στην εντερική του μικροχλωρίδα θεωρείται ότι βρίσκεται σε μια ισορροπία ανάμεσα στην επωφελή συμβίωση και στην παθογένεια (Dumonceaux *et al.,* 2006).

Η προσθήκη των αντιβιοτικών στη διατροφή των ζώων αποτέλεσε επί δεκαετίες μέσο ρύθμισης της εντερικής μικροχλωρίδας, μειώνοντας τις βακτηριακές λοιμώξεις και βελτιώνοντας με αυτό τον τρόπο τα παραγωγικά χαρακτηριστικά των ορνιθίων (Vidanarachchi *et al.,* 2010). Η απαγόρευση τους όμως έκρινε επιτακτική την ανάγκη να διερευνηθεί εις βάθος η ακριβής σύσταση της εντερικής μικροχλωρίδας και να γίνει κατανοητός ο τρόπος που μπορεί να τροποποιηθεί, ιδιαίτερα μέσω της διατροφής. Η διατροφή παίζει καθοριστικό ρόλο στο εντερικό μικροβιακό πρότυπο. Παράγοντες όπως η σύσταση, η αναλογία των θρεπτικών συστατικών, τα φυσικά χαρακτηριστικά, η επεξεργασία και οι πρόσθετες ύλες του σιτηρεσίου διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη δυναμική του παραπάνω (Oviedo-Rondon *et al.,* 2010).

Από τους παραπάνω διαιτητικούς χειρισμούς μεγαλύτερο ενδιαφέρον για την προαγωγή της ανάπτυξης της ωφέλιμης μικροχλωρίδας των ορνιθίων έχουν λάβει οι πρόσθετες ύλες, εκ των οποίων σημαντικό ποσοστό καταλαμβάνει η χρήση των προβιοτικών. Τα προβιοτικά συντελούν στη διατήρηση ενός υγιούς γαστρεντερικού

περιβάλλοντος και στη βελτίωση της εντερικής λειτουργίας μέσω της πρόληψης επαρκών ποσοτήτων ζωντανών ωφέλιμων μικροοργανισμών (Mountzouris *et al.,* 2010). Παρόλο που σε πλήθος εργασιών έχουν παρατηρηθεί οι ευεργετικές τους ιδιότητες, εντούτοις έως και σήμερα δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως ο τρόπος δράσης τους. Σημαντική συμβολή προβλέπεται να προσφέρει η χρήση μοριακών αναλυτικών τεχνικών. Η εξέλιξη των αναλυτικών μέσων αναμένεται να κάνει εφικτή την ακριβή ποσοτική και ποιοτική ταυτοποίηση των διαφόρων βακτηριακών πληθυσμών που αποικούν στο γαστρεντερικό σύστημα των ορνίθων και να γίνει δυνατή η ανίχνευση τροποποιήσεων που επιδέχονται αυτοί μετά από τη χορήγηση προβιοτικών .

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της επίδρασης του επιπέδου προσθήκης προβιοτικών επί της σύστασης της εντερικής μικροχλωρίδας ορνιθίων κρεοπαραγωγής. Για το σκοπό της μελέτης η ανάλυση της μικροχλωρίδας των τυφλών εντέρων των ορνιθίων έγινε με τη χρήση δυο διαφορετικών αναλυτικών τεχνικών.

2. Εντερικό οικοσύστημα

Ο εντερικός σωλήνας των ζώων είναι ένα ιδιαίτερα σημαντικό όργανο του σώματος. Κύριος σκοπός του είναι η αφομοίωση των θρεπτικών συστατικών για να καλυφθούν οι ανάγκες συντήρησης, ανάπτυξης και αναπαραγωγής. Παράλληλα θεωρείται ως ένα σύνθετο οικοσύστημα διότι, αποικίζεται από μια πολύπλοκη και σε μεγάλο βαθμό εξελισσόμενη μικροβιακή κοινότητα. που αποτελείται από εκατοντάδες είδη βακτηρίων (Rehman *et al.,* 2007 b). Επίσης δεν μπορεί να παραληφθεί ότι είναι ίσως το μεγαλύτερο όργανο του ανοσοποιητικού συστήματος στο σώμα. Συνεπώς, η ομοιοστασία και η υγεία του εντερικού οικοσυστήματος είναι μια εξαιρετικά πολύπλοκη διαδικασία, η οποία αφορά στη μακρό και μικρό – δομική του ακεραιότητα, την ισορροπία της μικροχλωρίδας και την κατάσταση του ανοσοποιητικού συστήματος (Choct 2009).

Ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο για την υγεία και την παραγωγική ικανότητα των ορνιθίων λαμβάνει ο αποικισμός του εντερικού σωλήνα από τους διαφόρους μικροβιακούς πληθυσμούς διότι, επηρεάζει την εντερική ανάπτυξη, την βιοχημεία, την ανοσολογία, την φυσιολογία και ανθεκτικότητα σε μολύνσεις (Torok *et al.,* 2008). Τα παραπάνω αποδεικνύονται από έρευνες που έχουν διεξαχθεί σε ζώα απαλλαγμένα μικροβίων όπου παρουσίασαν διευρυμένο τυφλό έντερο, λεπτότερο βλεννογόνο, μικρότερου ύψους λάχνες και κρύπτες, μειωμένη κινητικότητα εντέρου, μικρότερη θερμοκρασία σώματος και ανεπαρκώς ανεπτυγμένο ανοσοποιητικό σύστημα (Niba *et al.,* 2009).

2.1. Απoίκηση και κατανομή της μικροχλωρίδας στον εντερικό σωλήνα

Ο εντερικός σωλήνας των νεοσσών είναι στείρος κατά τη διάρκεια της εκκόλαψης. Η αποίκηση του αποτελεί μια διαδικασία και αρχίζει κατά την έξοδο τους από το αυγό (Apajalahti 2005). Οι μικροοργανισμοί που υπάρχουν στο κέλυφος του αυγού και στο περιβάλλον εκκόλαψης προσλαμβάνονται αμέσως από τα νεαρά ορνίθια. Οι αερόβιοι καθώς και οι προαιρετικά αναερόβιοι βακτηριακοί πληθυσμοί εγκαθίστανται πρώτοι. Οι εν λόγω μικροοργανισμοί θεωρείται ότι μειώνουν το διαθέσιμο οξυγόνο που

υπάρχει στον εντερικό σωλήνα, το οποίο επιτρέπει την επακόλουθη αποίκηση από αυστηρά αναερόβιους πληθυσμούς (Dibner *et al.,* 2008).

Η κατανομή της μικροχλωρίδας στο γαστρεντερικό σωλήνα δεν αποτελεί μια τυχαία διαδικασία. Ποιοτικά καθώς και ποσοτικά οι διάφοροι βακτηριακοί πληθυσμοί οργανώνονται στα διαμήκη και στα κάθετα τμήματα του πεπτικού σωλήνα. Η διαμήκη οργάνωση της μικροχλωρίδας παραπέμπει στην κατανομή των βακτηρίων από τη στοματική κοιλότητα (ράμφος) προς το κόλον, με τη συγκέντρωση των βακτηριακών πληθυσμών να διαφέρει συντριπτικά από τμήμα σε τμήμα (Thompson and Applegate 2005).

Η οριζόντια οργάνωση αφορά τα 4 μικροπεριβάλλοντα που σχηματίζονται εντός κάθε τμήματος του εντερικού σωλήνα και αποικίζονται από τους μικροβιακούς πληθυσμούς : α) τον εντερικό χυμό, β) το στρώμα της βλέννης που έρχεται σε επαφή με τον εντερικό αυλό, γ) το στρώμα της βλέννης που καλύπτει τις κρύπτες και δ) την επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων (Dibner *et al.,* 2008). Κάθε τμήμα και κάθε οριζόντιο στρώμα του εντερικού σωλήνα φιλοξενεί συγκεκριμένους βακτηριακούς πληθυσμούς το οποίο αποδίδεται κυρίως στους φυσικοχημικούς παράγοντες (χολικά άλατα, διαθέσιμο οξυγόνο, εντερικό pH) που επιδρούν σε κάθε ένα από αυτά.

2.2. Ποσοτική και ποιοτική εκτίμηση της μικροχλωρίδας του εντερικού σωλήνα

2.2.1 Παράγοντες που επιδρούν στη σύσταση της εντερικής μικροχλωρίδας

Η σύσταση της εντερικής μικροχλωρίδας δεν είναι απόλυτη αλλά θεωρείται ως ένα δυναμικό σύστημα που μεταβάλλεται ανάλογα το είδος του υπό ανάπτυξη ζωικού πληθυσμού και τις συνθήκες που επιδρούν σε αυτόν. Διαφοροποιείται ανάλογα με τη φυλή, το γένος , το περιβάλλον ανατροφής (Gabriel *et al.,* 2006), την ατομικότητα (Van der Wielen *et al.,* 2000), την ηλικία και τη διατροφή που εφαρμόζεται. Η ηλικία καθώς και η διατροφή είναι δύο από τους παράγοντες που επηρεάζουν ιδιαίτερα τη φύση και το

μέγεθος του μικροβιακού φορτίου που αποικίζει τον εντερικό σωλήνα (Mead 2005), για αυτό και η παρακάτω ανάλυση αφορά κυρίως αυτούς τους δύο παράγοντες.

2.2.2. Διαφοροποίηση της σύστασης κατά μήκος του εντερικού σωλήνα

Βακτηριακή δραστηριότητα κατά μήκος του εντερικού σωλήνα εντοπίζεται στον πρόλοβο στον ειλεό και κυρίως στα τυφλά έντερα (Gabriel *et al.,* 2006). Η παρουσία οξέων και χολικών αλάτων, ο υψηλός βαθμός απορροφητικής ικανότητας θρεπτικών συστατικών, η ταχεία διέλευση του περιεχομένου, η συνεχής ανανέωση των επιθηλιακών κυττάρων και της βλέννης και οι μηχανισμοί ανοσολογικής άμυνας παρεμποδίζουν τον πολλαπλασιασμό βακτηριακών κυττάρων στον εγγύς εντερικό σωλήνα (Perry 2006).

Πρόλοβος

Σύμφωνα με τους Guan *et al.* (2003), η μικροχλωρίδα του προλόβου των ορνιθίων κυμαίνεται στο επίπεδο του 10^8 κύτταρα/γρ περιεχομένου μετά την $14^η$ ημέρα της ζωής τους και απαρτίζεται κυρίως από είδη που ανήκουν στο γένος *Lactobacillus.* Η σύσταση της ποικίλει με τα είδη *L. reuteri*, *L. johnsonii*, *L. crispatus*, *L. gallinarum*, και *L.amylovorus* να ανιχνεύονται από την πρώτη βδομάδα ζωής έως και την $42^η$ μέρα ζωής ενώ τα είδη *L.acidophilus* και *L. salivarius* να εμφανίζονται μετά την $7^η$ και $14^η$ ημέρα αντίστοιχα (Guan *et al.,* 2003).

Ειλεός

Παρόμοια με τη μικροχλωρίδα του προλόβου ποσοτικά (10^8-10^9 κύτταρα / g περιεχομένου Olsen *et al.* 2008) και ποιοτικά διαμορφώνεται και αυτή του ειλεού, με κυρίαρχο γένος να αποτελεί και πάλι αυτό του *Lactobacillus (Lu et al., 2003; Bjerrum et al., 2006; Wise and Siragusa 2007).* Σε έρευνα που διεξήγαγαν οι Lu *et al*., (2003) σε ορνίθια κρεοπαραγωγής που χορηγήθηκε σιτηρέσιο βασισμένο στον αραβόσιτο χωρίς τη προσθήκη αντιβιοτικών και κοκκιδιοστατικών, διαπίστωσαν ότι, από τους 614 16S rDNA κλώνους που ανιχνεύτηκαν στον ειλεό το 67,5 % απαρτίζονταν από βακτηριακούς

πληθυσμούς του γένους *Lactobacillus,* το 9,69 % από είδη του γένους *Clostridium*, το 6,63% και το 6,43 % από είδη των γενών *Streptococcus* και *Enterococcus* αντίστοιχα. Σε παρόμοια εργασία των Bjerrum *et al.* (2006), που σκοπό της είχε τη διερεύνηση της μικροχλωρίδας ορνιθίων, που είχαν διατραφεί με συμβατικό (προσθήκη σαλινομυκίνης και εξωγενών ενζύμων) ή με οργανικό σιτηρέσιο επιβεβαιώνεται η κυριαρχία του γένους *Lactobacillus* και τονίζεται ότι, τα είδη που ανιχνεύτηκαν σε μεγαλύτερο ποσοστό ήταν τα *L. salivarius* και *L. Johnsonni,* 44% και 30% των ολικών κλώνων των γαλακτοβακίλλων αντίστοιχα, στα συμβατικής διατροφής ορνίθια και τα *L. cripatus* και *L. salivarius,* 61% και 20% των ολικών κλώνων των γαλακτοβακίλλων αντίστοιχα, στα ορνίθια οργανικής διατροφής.

Τυφλό έντερο

Τα τυφλά θεωρείται ότι προσφέρουν ένα αρκετά σταθερό περιβάλλον για την εγκατάσταση ενός σύνθετου μικροβιακού οικοσυστήματος (Ziprin *et al.,* 2004). Το γεγονός αυτό αποδίδεται στην αργή ανανέωση του περιεχομένου του τυφλού εντέρου που έχει ως αποτέλεσμα να διατηρούνται σταθερές συνθήκες για την ευνοϊκή ανάπτυξη μικροβιακών πληθυσμών (Mead 2005). Εκτιμάται ότι τουλάχιστον 640 διαφορετικά είδη που ανήκουν σε 140 διαφορετικά γένη ανευρίσκονται εντός των τυφλών εντέρων (Apajalahti *et al.,* 2004).

Μελέτες επί της σύστασης της εντερικής μικροχλωρίδας του τυφλού εντέρου χρονολογούνται από τις αρχές του 1970 (Jozefiak *et al.,* 2004) παρόλα αυτά μέχρι και σήμερα δεν έχει ταυτοποιηθεί πλήρως η ακριβής σύνθεση της πολύπλοκης αυτής μικροβιακής κοινότητας. Τη τελευταία δεκαετία βέβαια, λόγω της ανάπτυξης μοριακών αναλυτικών τεχνικών (Κεφάλαιο 3.) που μπορούν να ανιχνεύουν βακτηριακούς πληθυσμού σε σύνθετα οικοσυστήματα έχει σχηματιστεί μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα.

Κατά τις δεκατέσσερις πρώτες μέρες ζωής ενός υγιούς ορνιθίου η σύσταση της μικροχλωρίδας του τυφλού εντέρου είναι σχετικά απλή και αποτελείται από είδη που ανήκουν στα φύλα *Firmicutes* και *γ-Proteobacteria.* Αναλυτικότερα μέχρι και τις τέσσερεις πρώτες μέρες ζωής ενός ορνιθίου το είδος *E. coli* κυριαρχεί σε σχέση με οποιοδήποτε άλλο, ενώ μετά τις 5 πρώτες μέρες μπορούν να ανιχνευτούν βακτήρια που ανήκουν στις οικογένειες *Lachnospiraceae* και *Clostridiaceae* (Tanikawa *et al.,* 2011).

Αντιθέτως, τα τυφλό έντερα ενήλικων ορνιθίων αποικίζονται κυρίως από υποχρεωτικά αναερόβια και σε πολύ μικρότερο ποσοστό από προαιρετικά αναερόβια βακτήρια, με τη συγκέντρωση τους να κυμαίνεται στο επίπεδο του 10^{11} cfu / g εντερικού περιεχομένου. Το μεγαλύτερο ποσοστό των βακτηριακών πληθυσμών που ανιχνεύονται ανήκουν στο φύλο *Firmicutes* (Gong *et al.,* 2002; Zhu *et al.,* 2002; Lu *et al.,* 2003; Bjerrum *et al.,* 2006; Dumonceaux *et al.,* 2006), ενώ δεν απουσιάζουν και βακτηριακά είδη που ανήκουν στα φύλα *Bacteroidetes, Actinobacteria* και *Proteobacteria*. Τα είδη που ανήκουν στην τάξη των *Clostridiales (Firmicutes)* και πιο συγκεκριμένα στο σύμπλεγμα των *Clostridium* XIVa και VI υπερέχουν σε σχέση με οποιοδήποτε άλλο βακτηριακό πληθυσμό (Πίνακας 2.2.2.1.). Αναφορικά με τους Lu *et al.* (2003), το 65,6% από τους 619 κλώνους που ανιχνεύτηκαν στο τυφλό έντερο ορνιθίων ήταν ομόλογοι με τον πληθυσμό *Clostridiacaea* (*Clostridium, Ruminococcus και Eubacterium*), ακολούθησε, το γένος *Fusobacterium* με 13,9 % και εν συνεχεία το γένος των *Lactobacillus* σε ποσοστό 7,75 %, ενώ βακτηριακά είδη που ανήκουν στα φύλα *Proteobacteria*, *Bacteroides* και *Actinobacteria* ανιχνεύτηκαν μόλις σε ποσοστό 2,8%, 5,1% και 0 % αντίστοιχα. Ανάλογα οι Zhu *et al.* (2002), οι οποίοι ανέλυσαν τον εντερικό χυμό καθώς και τη βλέννη που καλύπτει το εντερικό επιθήλιο στο τυφλό έντερο θηλυκών ορνιθίων 42 ημερών αναφέρουν ότι, το 47,3% των αλληλουχιών που απομονώθηκαν ανήκουν στα *C. leptum* και *C .coccoides,* ενώ επισημαίνουν ότι το 20,8% αντιπροσωπεύεται από βακτηριακά είδη που ανήκουν στο φύλο Proteobacteria. Παρόμοια οι Gong *et al.* (2007), οι οποίοι μελέτησαν βακτηριακούς πληθυσμούς που σχετίζονται με τη βλέννη του επιθηλίου του τυφλού εντέρου αναφέρουν ότι το γένος *Clostridium* αντιπροσωπεύει το 40% των αλληλουχιών που ανίχνευσαν.

Όπως προαναφέρθηκε η σύσταση της μικροχλωρίδας δεν είναι απόλυτη και παραλλάσει ποικιλοτρόπως. Οι διαφορές στα ποσοστά των διαφόρων βακτηριακών πληθυσμών που παρατηρούνται παραπάνω αποδίδονται σε παράγοντες όπως, η μέθοδος ανάλυσης της μικροχλωρίδας, το περιβάλλον ανατροφής, το είδος της διατροφής και το γονότυπο του ορνιθίου (Bjerrum *et al.,* 2006) καθώς και το τμήμα του εντέρου (διαμήκες ή κάθετο) που εξετάζεται.

Πίνακας 2.2.2.1.Ποσοστιαία αναλογία των κυριότερων βακτηριακών πληθυσμών στο τυφλό έντερο ορνιθίων.

Βιβλιογραφία	Διατροφή	Ηλικία (ημέρες)	Μέθοδος	Αναλογία βακτηριακών πληθυσμών
Lu *et al.*, 2003	Αραβόσιτος-σόγια	49	Αλληλουχιση του 16S r RNA	*Clostridium 39,26%, Ruminococcus 16,48%, Eubacterium 9,85%, Fusobacterium 13, 89%, Lactobacillus 7,75%, Bacteroides 5,01 %*
Zhu *et al.*, 2002	Αραβόσιτος-σόγια, προσθήκη ζωικής πρωτεΐνης	42	16S rRNA	*C. Coccoides 27,1 %, Sporomusa 21,2%, Enterics and relatives 20,8%, C leptum 20,2 %, Atopobium 3,6%, Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus 1,5 %, Actinomyces 1,3 %, Bacteroides 1,9%, Pseudomonas 0,7%.*
Dumonnceaux *et al.*, 2006	Αραβόσιτος-σόγια	47	Chaperonin 60 gene sequencing	*Clostridiales 68%, Lactobacillales 25%, Bacteroidetes 6%*
Bjerrum *et al.*, 2006	Σιτάρι, μπιζέλι, ελαιοκράμβη, σόγια, ιχθυέλαιο, συνθετικά αμινοξέα, εξωγενή ένζυμα (Ξυλανάση και ενδογλυκανάση, Σαλινομυκίνη.	40	16S rDNA	*C. leptum 62%, Eubacterium 15,5%,Lactobacillus 5%*
	Σιτάρι, κριθάρι, πίτυρα σίτου, αραβόσιτος, βρώμη, ελαιοκράμβη, άλεσμα μηδικής, ιχθυέλαιο.			*C.leptum 53%, Eubacterium 35.5%, Lactobacillus 8%*
Gong *et al.*, 2007	Σιτάρι-αραβόσιτος-σόγια	35	16r RNA	*Clostridia 40%, F. prausnitsii 14%,E.coli 11%, Lactobacillus spp 7%, Ruminococcus spp 6%*

2.2.3. Μεταβολική δραστηριότητα της μικροχλωρίδας στο τυφλό έντερο

Όπως προαναφέρθηκε αξιοσημείωτη μεταβολική δραστηριότητα της μικροχλωρίδας εντοπίζεται στο τυφλό έντερο (αναερόβιο περιβάλλον, βραδεία ανανέωση του περιεχομένου και διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών). Τα θρεπτικά συστατικά που ξεφεύγουν από τη πέψη και απορρόφηση στο λεπτό έντερο, οι εκκρίσεις του ξενιστή (π.χ. βλεννίνες) και τα αποβληθέντα επιθηλιακά κύτταρα μεταβολίζονται από τους μικροβιακούς πληθυσμούς ώστε να καλύψουν τις ανάγκες τους σε ενέργεια (Walter 2008) και άζωτο. Η ζυμωτική αντίδραση είναι παρόμοια με αυτή ενός φυτοφάγου ζώου και περιλαμβάνει υδρόλυση πολυσακχαριτών, ολιγοσακχαριτών, δισακχαριτών, άπεπτων πρωτεϊνών και λιπών καθώς και διάσπαση των ούρων, προερχόμενα από την αντιπερισταλτική κίνηση της αμάρας (Tellez *et al.,* 2006).

Η α και β- γαλακτοσιδάση, η α και β-γλυκοσιδάση και η β- γλυκουρονιδάση είναι ένζυμα που παράγουν οι βακτηριακοί πληθυσμοί για να υδρολύσουν μερικά από τα παραπάνω συστατικά (Mountzouris *et al.,* 2007). Ανάλογα με το τύπο του βακτηρίου (σακχαρολυτικό ή πρωτεολυτικό) που προσβάλει τα παραπάνω διαθέσιμα συστατικά διαμορφώνονται και τα τελικά προϊόντα. Τα σακχαρολυτικά βακτήρια παράγουν κυρίως οργανικά οξέα όπως, γαλακτικό οξύ και λιπαρά οξέα μικρής αλύσου (οξικό, προπιονικό και βουτυρικό), ενώ τα πρωτεολυτικά βακτήρια παράγουν διακλαδισμένα λιπαρά οξέα, αμμωνία αμίνες, ινδόλες και φαινόλες (Apajalahti 2005; Rehman *et al.,* 2007 a). Παρόλα αυτά, η βακτηριακή ζύμωση είναι μια πολύπλοκη διαδικασία λόγω της ποικιλομορφίας των ειδών και της μεταβολικής ικανότητας της μικροχλωρίδας του τυφλού εντέρου, όπου τα μεταβολικά τελικά προϊόντα ενός είδους μπορεί να χρησιμοποιούνται ως ουσίες για να αναπτυχθεί ένα άλλο είδος (Rehman *et al.,* 2007 a). Τα στελέχη *Lactobacillus* παράγουν κυρίως γαλακτικό οξύ το οποίο καταβολίζεται από προπιονιοβακτηρια σε προπιονικό οξύ (Timmerman *et al.,* 2004).

Η παρουσία των σακχαρολυτικών βακτηρίων στο έντερο και σε προέκταση η σακχαρολυτική ζύμωση είναι περισσότερο επιθυμητή σε σχέση με αυτή των πρωτεολυτικών βακτηρίων, διότι η αμμωνία οι φαινόλες και οι αμίνες έχουν τοξική επίδραση και συνεπάγεται ενεργειακό κόστος για αποτοξίνωση. Αναλυτικότερα, η υψηλή συγκέντρωση αμμωνίας σχετίζεται με μειωμένη ανάπτυξη του ζώου λόγω του

ότι προκαλεί αυξημένη ανανέωση επιθηλιακών κυττάρων (Dibner and Richards 2005). Σε αντίθεση τα οργανικά οξέα που παράγονται από τα σακχαρολυτικά βακτήρια έχουν την τάση να μειώνουν το pH του περιεχομένου του εντέρου, φαινόμενο που σχετίζεται με την παρεμπόδιση παθογόνων βακτηρίων λόγω της ευαισθησίας τους να ανταπεξέλθουν σε όξινες συνθήκες (Van der Wielen *et al.,* 2000; Apajalahti 2005). Ο μηχανισμός της βακτηριοστατικής τους δράσης δεν είναι πλήρως διευκρινισμένος, θεωρείται όμως ότι διαχέονται ελεύθερα εγκαρσίως της βακτηριακής μεμβράνης στο εσωτερικό του κυττάρου, όπου εκεί διίστανται μειώνοντας έτσι το pH με συνέπεια να προκαλείται εσωτερική καταστροφή (Van der Wielen *et al.,* 2000). Η συνεισφορά τους στον οργανισμό εκτός από την παρεμπόδιση παθογόνων αφορά τόσο την ενεργειακή τροφοδοσία του οργανισμού, όσο και την διέγερση του πολλαπλασιασμού των επιθηλιακών κυττάρων του εντέρου, αυξάνοντας το μέγεθος των λαχνών, που έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της απορροφητικής του επιφάνειας (Dibner and Richards 2005). Συνεπώς, η επίδραση των μικρής αλύσου πτητικών λιπαρών οξέων στη λειτουργία του εντέρου είναι αδιαμφισβήτητη, ειδικά μετά από πρόσφατη έρευνα που επισημάνει ότι επηρεάζουν το έντερο και σε επίπεδο γονιδιακής έκφρασης (Yin *et al.,* 2009).

3. Αναλυτικές τεχνικές διερεύνησης της μικροχλωρίδας

Ένας μεγάλος αριθμός βακτηρίων που απαρτίζουν την εντερική μικροχλωρίδα παραμένει έως σήμερα αδιευκρίνιστος (Torok *et al.,* 2008). Εκτιμάται ότι το 80% των βακτηριακών πληθυσμών του εντερικού περιεχομένου δεν μπορεί να προσδιοριστεί με τις συμβατικές μεθόδους καλλιέργειας (Hume *et al.,* 2003) λόγω (Zoetendal *et al.,* 2004):

- άγνωστων αναγκών ανάπτυξης των μικροοργανισμών
- εκλεκτικότητας των θρεπτικών υλικών
- καταπόνησης των μικροοργανισμών από την διαδικασία καλλιέργειας
- απουσίας αυστηρώς αναερόβιων συνθηκών

Επιπρόσθετα οι βασιζόμενες στην καλλιέργεια τεχνικές εμφανίζουν 2 μεγάλα προβλήματα. Τα εξής (Oviedo-Rondon 2009):

1) Απουσία φυλογενετικής ταξινόμησης
2) Ανέφικτη ανίχνευση βακτηρίων που είναι αδύνατο να καλλιεργηθούν ή είναι πολύ απαιτητικά στις συνθήκες καλλιέργειας ή βρίσκονται σε πολύ μικρή συγκέντρωση με συνέπεια να μην μπορούν να ανιχνευτούν.

Τα παραπάνω μειονεκτήματα είναι δυνατό να αντιμετωπιστούν με την εφαρμογή διαφόρων μοριακών τεχνικών προσδιορισμού της μικροχλωρίδας. Οι σύγχρονες μοριακές αυτές τεχνικές βασίζονται στη σύγκριση αλληλουχιών των νουκλεϊκών οξέων (DNA, RNA). Είναι σχετικά γρήγορες, χαμηλού κόστους και ικανές να καταγράφουν γονιδιακές περιοχές πολύπλοκων πληθυσμών (Torok *et al.,* 2008).

3.1Συμβολή 16S rRNA γονιδίου στην διερεύνηση της μικροχλωρίδας

Τα γονίδια που κωδικοποιούν το ριβοσωμικο RNA (rRNA) προμηθεύουν μία μεγάλη ποσότητα από αξιόλογες πληροφορίες στη μικροβιακή φυλογένεση, ποικιλομορφία και εξέλιξη (Perry 2006). Το βακτήριακό ριβοσώμα αποτελείται από δύο υπομονάδες, την 50S και την 30S υπομονάδα. Η 50S υπομονάδα περιέχει το 5S

rRNA και το 23S rRNA, ενώ η 30S υπομονάδα περιέχει το 16S rRNA. Οι ριβοσωμικές αλληλουχίες θεωρούνται άριστα μόρια για την εκτίμηση της εξελικτικής σχέσης μεταξύ των μικροοργανισμών (Blaut *et al.,* 2002). Έχουν κρίσιμες λειτουργίες όπως, την καθολική τους κατανομή μεταξύ όλων των κυτταρικών τύπων που υπάρχουν στη ζωή, τις υψηλά διατηρημένες αλληλουχίες κωδικοποίησης του rRNA και τέλος την εξελικτική τους διαφοροποίηση. Ο πιο συχνός τύπος rRNA που χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της μικροβιακής ποικιλομορφίας είναι 16S rRNA (1500 nt), διότι το 5S rRNA (300 nt) παρέχει περιορισμένες πληροφορίες, ενώ το 23S rRNA (3000 nt) παρόλο που δίνει περισσότερες πληροφορίες, χρειάζεται περαιτέρω αλληλούχιση (Mackie and Cann 2005).

3.2 Μοριακές αναλυτικές τεχνικές και διερεύνηση της σύστασης της εντερικής μικροχλωρίδας ορνιθίων

Η εντερική μικροχλωρίδα των ορνιθίων έχει μελετηθεί εκτενώς με συμβατικές μεθόδους καλλιέργειας (Kabir *et al.,* 2005; Rehman *et al.,* 2007 b). Παρόλα αυτά, όπως προαναφέρθηκε υστερούν σε βασικά σημεία. Έτσι η μέχρι τώρα εικόνα για τη σύσταση της μικροχλωρίδας ίσως είναι ανακριβής και ελλιπής (Gong *et al.,* 2007).

Μέχρι σήμερα αρκετές μοριακές τεχνικές έχουν εφαρμοστεί για τον προσδιορισμό της μικροχλωρίδας ορνιθίων που περιλαμβάνουν: α) την φθορίζουσα *in situ* υβριδοποιήση (Zhu and Joerger 2003; Collado and Sanz 2007; Gerard *et al.,* 2008; Olsen *et al.,* 2008; Jozefiak *et al.,* 2010), β) την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real time PCR) (Wise and Siragusa 2005; Harrow *et al.,* 2007; Wise and Siragusa 2007), γ) την ηλεκτροφόρηση πηκτώματος με διαβαθμισμένη αποδιατακτική σύσταση (DGGE) (Guan *et al.,* 2003; Zhou *et al.,* 2007; Nava *et al.,* 2009; Tanikawa *et al.,* 2011), δ) τον πολυμορφισμό μήκους περιοριστικών τεμαχίων (T-RFLP) (Gong *et al.,* 2002; Lan *et al.,* 2004; Czerwinski *et al.,* 2010) και ε) την αλληλούχιση του 16S rRNA γονιδίου (Lu *et al.,* 2003; Bjerrum *et al.,* 2006; Gong *et al.,* 2007).

Η συνεχής εξέλιξη των αναλυτικών μέσων πρόκειται να προσφέρει καινούριες προοπτικές για την απάντηση βασικών ερωτημάτων που αφορούν το εντερικό μικροβιακό οικοσύστημα και περιλαμβάνουν τα εξής: 1) την πραγματική έκταση της μικροβιακής ποικιλομορφίας, συμπεριλαμβανομένης της ανίχνευσης μη καλλιεργήσιμων οργανισμών 2) την επίδραση της διατροφής και των διακυμάνσεων μεταξύ ξενιστών όσον αφορά τη σύσταση της εντερικής μικροχλωρίδας 3) την ακολουθία του πρωίμου αποικισμού και 4) τον αποικισμό συγκεκριμένων βακτηριακών επιθηλιακών θέσεων προσκόλλησης στα διαφορετικά τμήματα του εντέρου (Perry 2006).

4. Προβιοτικά

4.2. Ιστορική αναδρομή

Ο όρος προβιοτικά, Ελληνικής προέλευσης, σημαίνει <<για τη ζωή>>, εισήχθη από τους Lilli και Stillwell για να περιγράψει τις ουσίες που εκκρίνονται από έναν μικροοργανισμό και διεγείρουν την ανάπτυξη ενός άλλου (Soccol *et al.,* 2010). Η συνεισφορά τους στην ανθρώπινη υγεία αναγνωρίστηκε περίπου ένα αιώνα πριν από τον φερόμενο ως εφευρέτη τους Metchnikoff (Cross 2002), οποίος συσχέτισε τη μακροβιότητα των Βούλγαρων χωρικών με τη συχνή κατανάλωση ζυμωθέντων γαλακτοκομικών προϊόντων και την προστασία που επέφεραν τα οξυγαλακτικά βακτήρια όταν προστίθενται ως μέσο ζύμωσης στα τρόφιμα έναντι των πρωτεολυτικών μικροοργανισμών (Walter 2008). Στη πτηνοτροφία πρωτοπόρος της χρήσης σκευασμάτων που περιείχαν ζωντανά βακτήρια θεωρείται ο Tortuero, ο οποίος απέδειξε ότι η χορήγηση γαλακτοβακίλλων είχε ίδια αποτελέσματα με αυτά που λαμβάνονται όταν χορηγήθηκαν αντιβιοτικά, π.χ. αύξηση σωματικού βάρους και βελτίωση του συντελεστή εκμετάλλευσης της τροφής. Την ίδια χρονική περίοδο οι Nurmi και Rantala παρατήρησαν ότι η χορήγηση περιττωμάτων προερχόμενα από ενήλικα ορνίθια περιόρισε την αποίκηση του είδους *Salmonella infantis* στο τυφλό έντερο νεοεκκολαπτόμενων ορνιθίων (Jin *et al.,* 1997).

Σήμερα η χρήση των προβιοτικών είναι ευρέως διαδεδομένη ως πρόσθετα, στη διατροφή των ζώων, σε φαρμακευτικά σκευάσματα, σε γαλακτοκομικά προϊόντα ακόμα και σε προϊόντα κρέατος (Musa *et al.,* 2009). Ενδεικτικά αναφέρεται ότι η εμπορική αξία της κατηγορίας των προβιοτικών ανέρχονταν σε 14.9 δισεκατομμύρια δολάρια το 2007, και αναμένεται να φτάσει τα 19,6 δισεκατομμύρια δολάρια το 2013 (Soccol *et al.,* 2010).

4.3. Ορισμός και κριτήρια επιλογής

Κατά την πάροδο των ετών η λέξη προβιοτικά έχει λάβει διάφορους ορισμούς με τον πιο πρόσφατο να αποτελεί τον εξής: ζωντανοί μικροοργανισμοί οι οποίοι, όταν χορηγηθούν σε επαρκείς ποσότητες, ωφελούν την υγεία του ξενιστή (Kabir 2009).

Για να θεωρηθεί ένας μικροοργανισμός ως προβιοτικός θα πρέπει να κατέχει συγκεκριμένα χαρακτηριστικά και να τηρεί και συγκεκριμένα κριτήρια ασφάλειας, τα οποία περιλαμβάνουν τα εξής (Gaggia *et al.,* 2010):

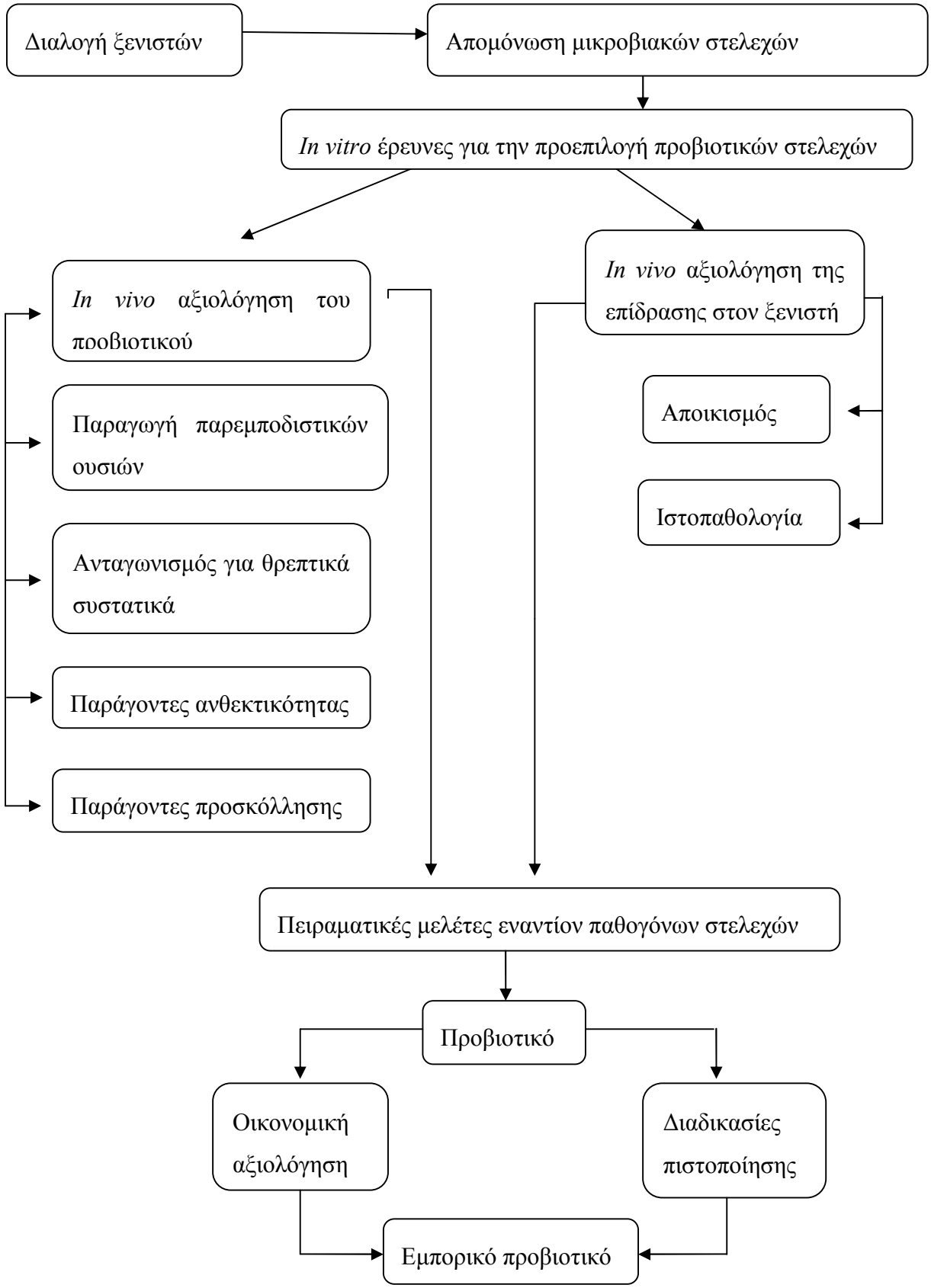
- Να μην είναι τοξικός
- Να μην είναι παθογόνος
- Να έχει προέλευση από το ξενιστή
- Να επιζεί, να αποικίζει και να είναι μεταβολικά ενεργός στη θέση στόχο, που συνεπάγεται να είναι ανθεκτικό στη γαστρική οξύτητα και στα χολικά άλατα, να προσκολλάται στο εντερικό επιθήλιο ή στη βλέννη και να ανταγωνίζεται με την ενδογενή μικροχλωρίδα.
- Να παράγει αντιμικροβιακές ουσίες
- Να ανταγωνίζεται παθογόνα βακτήρια
- Να ρυθμίζει την ανοσολογική απάντηση
- Να είναι ικανός να ασκεί ένα τουλάχιστον επιστημονικά υποστηριζόμενο χαρακτηριστικό για την προαγωγή της υγείας
- Να είναι γενετικά σταθερός
- Να διατηρεί σταθερά τα επιθυμητά χαρακτηριστικά του κατά την επεξεργασία, αποθήκευση και διανομή
- Να διατηρεί τη βιωσιμότητα του σε υψηλούς πληθυσμούς
- Να έχει επιθυμητά οργανοληπτικά και τεχνολογικά χαρακτηριστικά όταν επιδέχεται βιομηχανική κατεργασία

4.4. Εφαρμογή στην πράξη

Η εφαρμογή ενός μικροοργανισμού στην πράξη αποτελεί μια σύνθετη διαδικασία που πρέπει να εξασφαλίσει τη βιοασφάλεια του προϊόντος. Σε επίπεδο Ευρωπαϊκές Ένωσης η ασφαλής χρήση νέων μικροοργανισμών πριν ενσωματωθούν στις ζωοτροφές επιβεβαιώνεται από μία σειρά μελετών που εξετάζουν, α) τα προτεινόμενα είδη σε δοκιμές αντοχής και επίδρασης στη μικροχλωρίδα, β) τους εργαζόμενους που θα έρθουν σε επαφή με το προϊόν για δερματικό και οφθαλμικό ερεθισμό, τοξικότητα στο αναπνευστικό σύστημα και συστεμική τοξικότητα, γ) τους καταναλωτές του προϊόντος σε δύο διαφορετικές γενοτοξικές δοκιμές, δύο μεταλλαξιογένετικές δοκιμές και σε 90 ημερών στοματική τοξική μελέτη και δ) το

περιβάλλον, δηλαδή εάν ο μικροοργανισμός δεν έχει εντερική προέλευση και δεν είναι παρόν στο περιβάλλον. Μέχρι σήμερα δώδεκα είδη έχουν πάρει έγκριση από την Ευρωπαϊκή ένωση ως πρόσθετες ύλες ζωοτροφών και είναι τα εξής: *Bacillus cereus, Bacillus licheniformis, Bacillus subtilis, Enterococcus faecium, Pediococcus acidilactici, Lactobacillus farciminis, Lactobacillus rhamnosus, Lactobacillus casei, Lactobacillus plantarum, Streptococcus infantarius and Saccharomyces cerevisia (Applegate et al., 2010).*

Φυσικά, σε ερευνητικό επίπεδο τα είδη που έχουν χρησιμοποιηθεί ως προβιοτικοί μικροοργανισμοί στη διατροφή των ζώων απαριθμούνται σε πολύ περισσότερα (Ohashi and Ushida 2009), αφού η πρωταρχική διερεύνηση των ειδών από την επιστημονική κοινότητα αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι της δημιουργίας ενός εμπορικού προϊόντος. Σύμφωνα με τους Kabir *et al*. (2009), η διαδικασία επιλογής ενός προβιοτικού μικροοργανισμού που θα εισαχθεί στο κλάδο της πτηνοτροφίας περιγράφεται στο διάγραμμα που ακολουθεί (4.3.1).

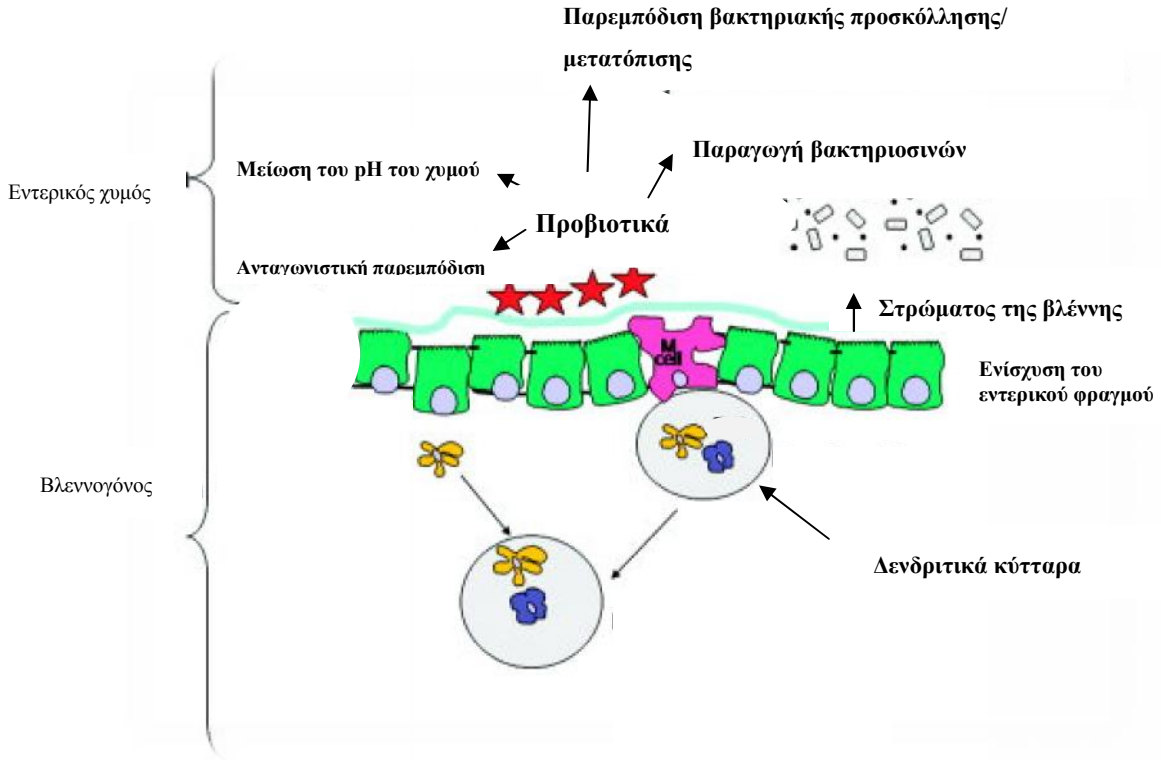


Διάγραμμα 4.3.1 Διαγραμματική απεικόνιση της επιλογής ενός προβιοτικού για το κλάδο της πτηνοτροφίας (Kabir 2009).

4.5. Μηχανισμοί δράσεις των προβιοτικών

Ο μηχανισμός που τα προβιοτικά δρουν και επιτυγχάνουν τη διατήρηση της ωφέλιμης μικροχλωρίδας δεν είναι πλήρως αποσαφηνισμένος. Παρόλα αυτά αναφέρεται ότι επηρεάζουν τη λειτουργικότητα του εντερικού σωλήνα σε τρία διαφορετικά επίπεδα, επιδρώντας: α) στο περιβάλλον του εντερικού χυμού, β) στη λειτουργία του επιθηλιακού και βλεννογόνιου φραγμού και γ) στο ανοσοποιητικό σύστημα (Ng *et al.,* 2009). Αναλυτικότερα τα προβιοτικά :

- ασκούν αντιμικροβιακή δράση
- ενισχύουν τη λειτουργία του εντερικού φραγμού
- ρυθμίζουν την ανοσοποιητική απάντηση



Διάγραμμα 4.4.2 Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού των προβιοτικών (Τροποποιήθηκε από: Ng *et al* ., 2009).

4.5.2. Αντιμικροβιακή δράση

Τα προβιοτικά τροποποιούν το εντερικό περιβάλλον με τέτοιο τρόπο που τα παθογόνα βακτήρια αδυνατούν να επιζήσουν. Η τροποποίηση αυτή επιτυγχάνεται μέσω: α) της παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών (οργανικών οξέων και βακτηριοσυνών), β) του ανταγωνισμού για θέσεις προσκόλλησης στο εντερικό επιθήλιο και γ) του ανταγωνισμού για θρεπτικά συστατικά (Brown 2011).

4.5.2.1. Παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών

Βακτηριοσίνες

Οι βακτηριοσίνες είναι πρωτεϊνικές ουσίες που παράγονται από τα βακτήρια, με σκοπό να παρεμποδίσουν την αύξηση άλλων βακτηρίων. Δεν δρουν όπως τα αντιβιοτικά και διαφέρουν σε κρίσιμα σημεία που τις διαφοροποιούν (π.χ. είναι πρωτεϊνικά μόρια) (Salminen *et al.,* 2004). Ιδιαίτερη έμφαση έχει δοθεί στις βακτηριοσίνες που παράγονται από τα οξυγαλακτικά βακτήρια (Joerger 2003). Αναφέρεται ότι, το είδος *Lactobacillus acidophilus* παράγει ενδιαφέρουσες βακτηριοσίνες (*acidophilin, lactocidin* και *acidolin*). *In vitro* έρευνες αποδεικνύουν την παρεμποδιστική τους δράση σε μια μεγάλο εύρος βακτηρίων πληθυσμών όπως *Bacillus, Klebsiella, Pseudomonas, Proteus, Salmonella, Shigella, Staphylococcus, Vibrio* και στο είδος *E. coli* (Brown 2011). Το σημαντικότερο όμως στοιχείο που υποδεικνύει ότι μπορεί να εμπλέκονται στην παρεμπόδιση των παθογόνων είναι η απομόνωση τους από το εντερικό σύστημα των διαφόρων ζώων (Nava *et al.,* 2007).

Οργανικά οξέα

Η προσθήκη προβιοτικών στα σιτηρέσια των παχυνόμενων ορνιθίων συνεισφέρει στην αύξηση της παραγωγής των οργανικών οξέων στον εντερικό σωλήνα. Τα οργανικά οξέα, όπως το οξικό και το γαλακτικό οξύ, είναι τελικά προϊόντα μεταβολισμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων. Παρεμποδίζουν την ανάπτυξη πολλών βακτηρίων περικλειόμενων και των Gram-αρνητικών παθογόνων. Η δραστικότητα τους εξαρτάται από τις τιμές που λαμβάνει το pH του εντερικού χυμού. Όταν το pH λαμβάνει τιμές κάτω από 6 προκαλείται διάσταση των οξέων. Η μορφή αυτή του οξέος έχει ισχυρή αντιβακτηριακή δράση (Nava *et al.,* 2007).

4.5.2.2. Ανταγωνισμός για θέσεις προσκόλλησης στο εντερικό επιθήλιο

Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό πολλών μικροοργανισμών, παθογόνων και ωφέλιμων, είναι η ικανότητα της προσκόλλησης τους στα απορροφητικά κύτταρα του εντερικού επιθηλίου (θέσεις προσκόλλησης). Με αυτόν τον τρόπο αποφεύγουν την απομάκρυνση τους μέσω της περίσταλσης του εντέρου και επιτυγχάνουν να παραμείνουν στον εντερικό σωλήνα (Ewing and Cole 1994). Η προσκόλληση των παθογόνων στο εντερικό επιθήλιο μπορεί να οδηγήσει στην είσοδο τους στον οργανισμό του ξενιστή. Για παράδειγμα μελέτες επιβεβαιώνουν ότι η σαλμονέλα εισχωρεί στον οργανισμό των ορνιθίων διαμέσου των εντερικών κυττάρων (Jin *et al.,* 1997).

Η χορήγηση ωφέλιμων βακτηριακών πληθυσμών σε ορνίθια με ηλικία μίας ημέρας οδηγεί στην αποίκηση του εντερικού βλεννογόνου σχηματίζοντας ένα στρώμα μικροχλωρίδας που καταλαμβάνει τις θέσεις προσκόλλησης, προστατεύοντας τα ορνίθια έναντι της μόλυνσης από την σαλμονέλα (Jin *et al.,* 1997). Η παρατήρηση αυτή ενισχύει την θεωρία ότι ο ανταγωνισμός για τις θέσεις προσκόλλησης είναι ο κύριος μηχανισμός παρεμπόδισης των παθογόνων βακτηρίων από τους προβιοτικούς μικροοργανισμούς, διότι την πρώτη μέρα ζωής των ορνιθίων η προστασία έναντι των παθογόνων μικροοργανισμών δεν μπορεί να είναι αποτέλεσμα της μικροβιακής δραστηριότητας (π.χ. βακτηριοσίνες, λιπαρά οξέα μικρής αλύσου).

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια έχουν αυξημένη ικανότητα προσκόλλησης στο εντερικό επιθήλιο, που επιτυγχάνεται με παθητικές, υδροφοβικές και πολυμερικές δυνάμεις και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις (Bouzaine *et al.,* 2005).

4.5.3. Ενίσχυση της λειτουργίας του εντερικού φραγμού

Φυσιολογικά η εντερική ακεραιότητα επιτυγχάνεται με δύο τρόπους. Πρώτον από την ικανότητα των εντεροκυττάρων να παράγουν ένα παχύ στρώμα βλέννης, που εκκρίνεται από τα καλυκοειδή κύτταρα και διασκορπίζεται σε όλο το εντερικό επιθήλιο και δεύτερον από την ιδιαίτερη δομή-κατασκευή του επιθηλίου που χαρακτηρίζεται από εντεροκύτταρα που συνδέονται μέσω στενοσυνδέσμου (tight junction)

(Chichlowski *et al.,* 2007 a). Τα προβιοτικά φαίνεται να ενισχύουν και να διατηρούν τη λειτουργία του εντερικού φραγμού αυξάνοντας την έκκριση της βλέννης (Brown 2011) και διατηρώντας σταθερή τη δομή του στενοσυνδέσμου στον εντερικό σωλήνα.

Ερεύνα σε επίμυες αναφέρει ότι τα επιθηλιακά κύτταρα του στενοσυνδέσμου ήταν άθικτα στη επέμβαση του προβιοτικού όταν αυτά μελετήθηκαν με τη χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου (Chichlowski *et al.,* 2007 a).

Αναφορικά με τούς Smirnov *et al*. (2005), η γονιδιακή έκφραση του mRNA καθώς και τα επίπεδα των βλεννινών αυξήθηκαν μετά την προσθήκη πολυστέλεχων προβιοτικών σε σιτηρέσιο ορνιθίων κρεοπαραγωγής. Επιπρόσθετα παρατηρήθηκε αύξηση των καλυκοειδών κυττάρων στις εντερικές λάχνες ορνιθίων μετά την χορήγηση προβιοτικού που περιείχε *lactobacillus, Bifidobacterium thermophilum και Enterococcus faecium (Chichlowski et al., 2007b)*.

4.5.4. Ρύθμιση της ανοσοποιητικής απάντησης

Οι μικροοργανισμοί στο εντερικό σύστημα έρχονται σε στενή επαφή με τα εντεροκύτταρα και τους τοπικούς κλάδους του ανοσοποιητικού συστήματος. Η αλληλεπίδραση μεταξύ των κυττάρων του ξενιστή και των βακτηριακών κυττάρων οδηγεί στην διαμόρφωση της ανοσολογικής απάντησης από τα Τ- ή Β- λεμφοκύτταρα. Η προσθήκη προβιοτικών στην διατροφή των ορνιθίων ενισχύει την ανοσολογική απάντηση σε τοπικό και συστεμικό επίπεδο (ορός και αίμα). Είναι πολύ πιθανό η μείωση των παθογόνων που παρατηρείται κατά την κατανάλωση προβιοτικών να οφείλεται εν μέρει στην διέγερση των αντισωμάτων που προκαλούν (Haghighi *et al.,* 2006). Συμφώνα με τους Dunham *et al.* (1993), η χορήγηση σιτηρεσίου που περιείχε *Lactobacillus reuteri* ενίσχυσε την παραγωγή IgM αντισωμάτων εξειδικευμένων προς την σαλμονέλα και τη λειτουργία των Τ-λεμφοκυττάρων σε νεοεκκολαπτόμενα ορνίθια (Dunham *et al.,* 1993).

Ο ακριβής μηχανισμός της ρύθμισης της ανοσολογικής απάντησης δεν είναι ακόμα διευκρινισμένος. Παρόλα αυτά έρευνες δείχνουν, ότι τα προβιοτικά διεγείρουν διαφορετικά υποσύνολα του ανοσοποιητικού συστήματος στο να παράγουν κυτοκίνες,

οι οποίες παίζουν ρόλο στην επαγωγή και στη ρύθμιση της ανοσολογικής απάντησης (Haghighi *et al.,* 2006).

4.6. Επιδράσεις των προβιοτικών στα ορνίθια

Στις συμβατικές εκτροφές τα νεοεκκολαπτόμενα ορνίθια στερούνται επαφής με τις ενήλικες όρνιθες, με συνέπεια να μην εγκαθίσταται αμέσως προστατευτική μικροχλωρίδα και τα ορνίθια να είναι επιρρεπή στη αποίκηση από παθογόνα. Επιπρόσθετα, τα ορνίθια υποκύπτουν σε διαφόρων ειδών καταπονήσεις που προκαλούνται από πρακτικές που εφαρμόζονται στην εντατική εκτροφή όπως αλλαγές στη διατροφή, μεταφορά και υψηλή πυκνότητα πληθυσμού. Σε καταστάσεις καταπόνησης (stress) η ωφέλιμη μικροχλωρίδα και συγκεκριμένα οι γαλακτοβάκιλοι έχουν την τάση να μειώνονται και να αυξάνονται υπερβολικά τα μη ωφέλιμα βακτήρια, γεγονός που ίσως προδιαθέτει την εμφάνιση νόσου ή την υποκλινική παρουσία της και συνεπώς τη χειροτέρευση παραγωγικών χαρακτηριστικών. Τα προβιοτικά λοιπόν αποτελούν μια πιθανή στρατηγική για να ελέγχουν την ανάπτυξη παθογόνων βακτηρίων και να διατηρήσουν μια ωφέλιμη ενδογενή μικροχλωρίδα.

Οι ευεργετικές επιδράσεις των προβιοτικών στα ορνίθια έχουν αναφερθεί σε πλήθος εργασιών. Αναφορικά με τους Mountzouris *et al.* (2010), τα προβιοτικά βελτιώνουν τα παραγωγικά χαρακτηριστικά, αυξάνουν την πεπτικότητα των θρεπτικών συστατικών, ρυθμίζουν την εντερική μικροχλωρίδα, παρεμποδίζουν την ανάπτυξη παθογόνων και τέλος ρυθμίζουν την ανοσοποιητική απάντηση. Στον πίνακα (4.5.2) που ακολουθεί παρουσιάζονται εργασίες που μετά την εισαγωγή των προβιοτικών στη διατροφή ορνιθίων η μικροχλωρίδα έλαβε τροποποιήσεις.

Πίνακας 4.5.2. Επίδραση της διαιτητικής προσθήκης προβιοτικών στη μικροχλωρίδα ορνιθίων.

Μικροοργανισμός	Επίδραση στη μικροχλωρίδα	Ηλικία (ημέρες)	Βιβλιογραφία
L. agilis, ***L. salivarius subsp. Salicinius***	↑ ολικού βακτηριακου φορτίου, ↑ *Lactobacillus*	7	Lan *et al*., 2003
	↓ *Enterobacteriaceae*	40	
***Bacillus subtilis* PB6**	↓ *Clostridium sp.* ↓ *E. coli*	21	Teo and Tan 2007
Lactobacillus reuteri, Enterococcus faecium, Bifidobacterium animalis, Pediococcus acidilactici, Lactobacillus salivarius	↑ *Bifidobacterium,* ↑ *Lactobacillus,* ↑ Gram + κόκκοι	42	Mountzouris *et al.,* 2007
***Lactobacillus reuteri* Pg4**	↑ ολικών αερόβιων και αναερόβιων, ↑ *Lactobacillus*	37	Yu *et al.,* 2008
	↓ C*oliforms*	3,7,21	
Lactobacillus reuteri, Enterococcus faecium, Bifidobacterium animalis, Pediococcus acidilactici, Lactobacillus salivarius	↑ *Lactobacillus* ↑ *Bifidobacterium*	42	Mountzouris *et al.,* 2010

Δ. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Σκοπός

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής μελέτης ήταν ο προσδιορισμός της επίδρασης του επιπέδου προσθήκης ενός προβιοτικού σκευάσματος στη διατροφή των ορνιθίων κρεοπαραγωγής επί των παραγωγικών χαρακτηριστικών, της σύνθεσης και της μεταβολικής δραστηριότητας της εντερικής μικροχλωρίδας αυτών.

2. Υλικά και Μέθοδοι

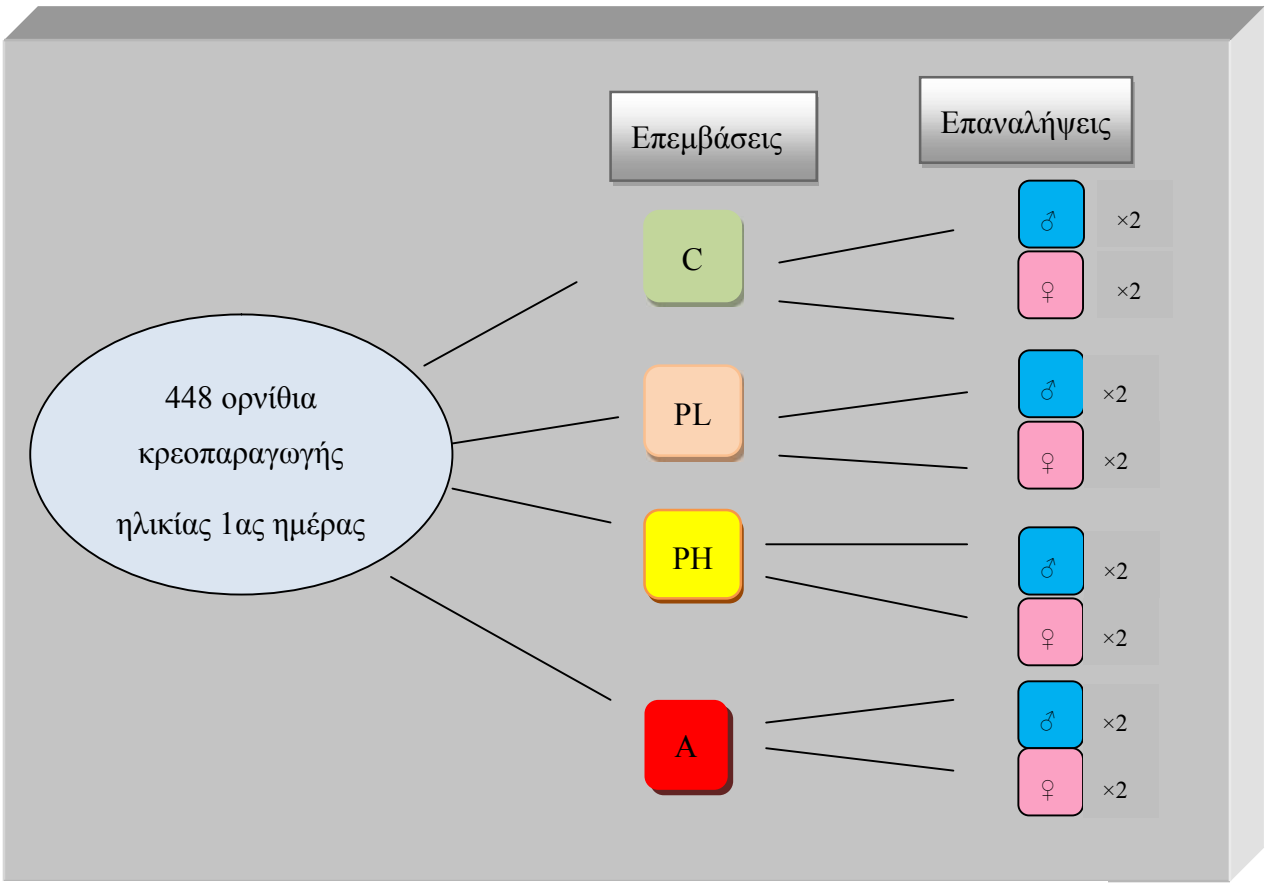
2.1. Χώρος διεξαγωγής του πειράματος

Το πείραμα και οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν στις πειραματικές εγκαταστάσεις και τους εργαστηριακούς χώρους του εργαστηρίου Φυσιολογίας θρέψεως και Διατροφής του Τμήματος Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής & Υδατοκαλλιεργειών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Ο κυρίως χώρος εκτροφής κατασκευάστηκε σύμφωνα με τα διεθνή πρότυπα για στείρους χώρους ISO 14644-1 και F.S 209E. Συγκεκριμένα, είναι στεγανός, ανήκει στη κλάση 10.000 και διαθέτει 8 φίλτρα κλάσης H14 κατά EN1822 (Κλιμαθέρμικα Ε.Π.Ε, Αθήνα).

2.2. Πειραματικό Ζωικό Υλικό- Πειραματικός Σχεδιασμός

Για τη διεξαγωγή του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν 448 ορνίθια κρεοπαραγωγής Cobb ηλικίας 1ας ημέρας, αποτελούμενα από ίσο αριθμό αρσενικών (♂) και θηλυκών (♀) ορνιθίων (Διάγραμμα 2.2.3). Τα ορνίθια διαιρέθηκαν σε 4 επεμβάσεις (112 ορνίθια / επέμβαση). Κάθε επέμβαση είχε 4 επαναλήψεις των 28 ορνιθίων (2 επαναλήψεις με αρσενικά ♂ και 2 επαναλήψεις με θηλυκά ♀ ανά επέμβαση). Τα ορνίθια της κάθε επανάληψης τοποθετήθηκαν εντός ανεξάρτητων κλωβών εμβαδού $2m^2$ με στρωμνή από άχυρο. Κάθε κλωβός είχε ανεξάρτητη ταΐστρα, ποτίστρα και λάμπα για θέρμανση, ενώ γίνονταν καθημερινά εργασίες φροντίδας και καθαριότητας.



Διάγραμμα 2.2.3. Σχηματική απεικόνιση της κατανομή ορνιθίων στις πειραματικές επεμβάσεις.

Τα ορνίθια έλαβαν βασικό σιτηρέσιο (ΒΣ) βασισμένο στον αραβόσιτο και στο σογιάλευρο για κάθε φάση ανάπτυξης (π.χ. εναρκτήριο 1-14 ημέρες, ανάπτυξης 15-28 ημέρες και τελικής πάχυνσης 29-42 ημέρες, πινάκας 2.2.3). Το πείραμα περιελάμβανε τις ακόλουθες τέσσερις επεμβάσεις (Πίνακας 2.2.4): την επέμβαση του μάρτυρα (C) χωρίς καμία επιπλέον προσθήκη στο ΒΣ, την επέμβαση PL με προσθήκη του προβιοτικού σε συγκέντρωση 10^8 CFU/ kg τροφής, την επέμβαση PH με προσθήκη του προβιοτικού σε συγκέντρωση 10^9 CFU/ kg τροφής και την επέμβαση A με προσθήκη του αντιβιοτικού ως αυξητικού παράγοντα αβιλαμυκίνη σε συγκέντρωση 2,5 mg / kg τροφής.

Πίνακας 2.2.3 Σύσταση βασικού σιτηρεσίου.

Συστατικά %	Βασικό σιτηρέσιο		
	Εναρκτήριο 1-14 ημέρες	**Ανάπτυξης 15-28 ημέρες**	**Τελικής πάχυνσης 29-42 ημέρες**
Αραβόσιτος	53,74	57,11	62,21
Σογιάλευρο	30,14	28,57	26,73
Πρωτεΐνη σόγιας	7,5	5,00	2,5
Φωσφορικό μονοασβέστιο	1,9	1,84	1,73
Φυτικό Λίπος	4,10	5,05	4,61
Μαρμαρόσκονη	1,40	1,33	1,19
NaCl	0,41	0,38	0,33
L-λυσίνη	0,18	0,13	0,05
DL-Μεθειονίνη	0,24	0,19	0,16
Βιταμίνες	0,20	0,20	0,20
Ιχνοστοιχεία	0,20	0,20	0,20
Εκτιμηθείσα Ανάλυση (%)			
Ενέργεια (MJ ME/kg τροφής)	12,4	12,7	12,7
Ολική πρωτεΐνη	22,0	20,0	18,0
Ολικές λιπαρές	6,9	7,9	7,5
Ινώδεις ουσίες	3,72	3,54	3,77

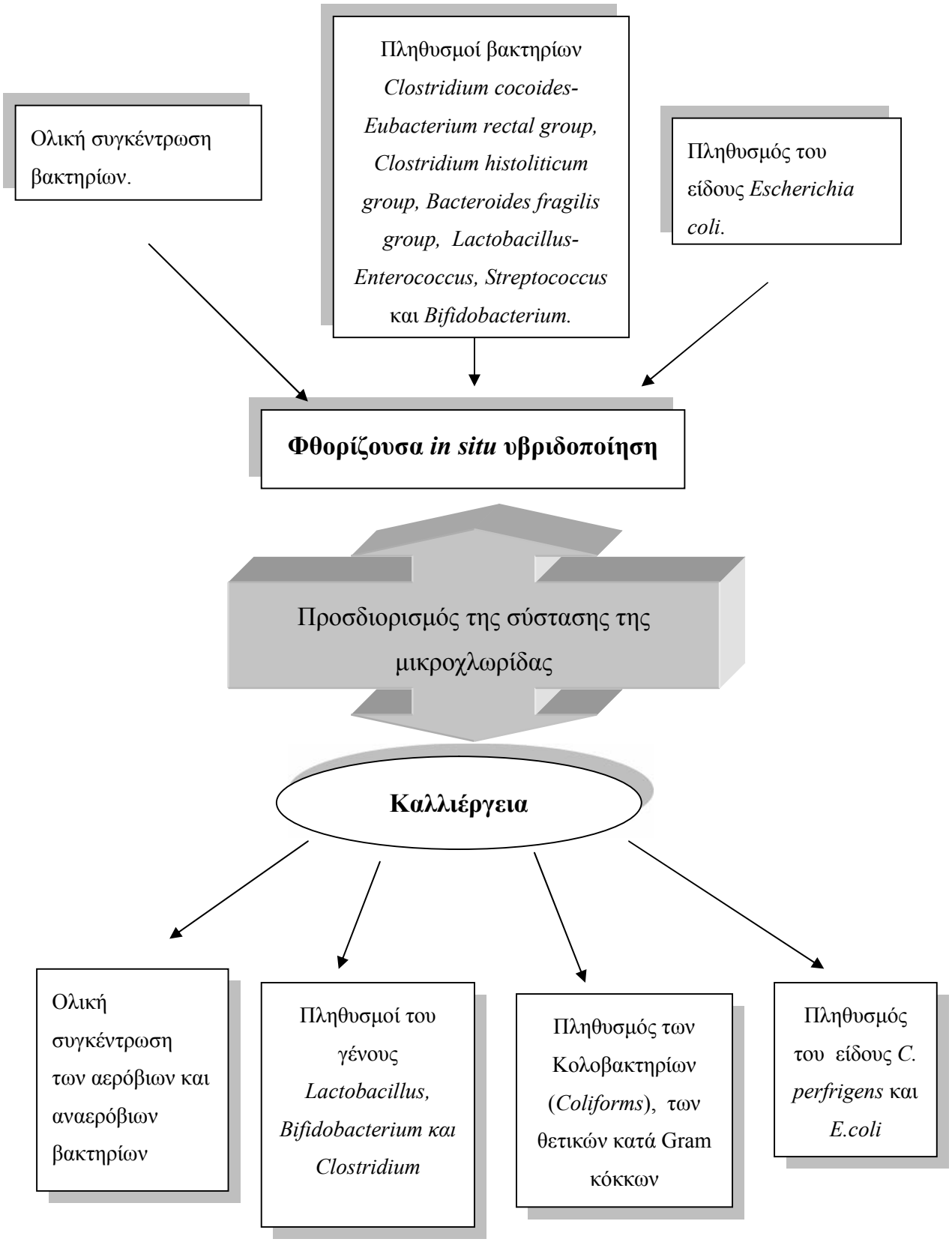
Το προβιοτικό που χρησιμοποιήθηκε αποτελούνταν από 3 μικροβιακά στελέχη (*Enterococcus faecium, Bifidobacterium animalis* και *Lactobacillus salivarium).* Η συγκέντρωση του προβιοτικού ορίστηκε σε 10^8 και 10^9 CFU/kg τροφής, συγκεντρώσεις που ενδείκνυνται προκειμένου να αξιολογηθεί η αποτελεσματικότητα των περισσότερων μικροοργανισμών (Thongsong *et al.,* 2008).

Πίνακας 2.2.4. Κατανομή πειραματικών επεμβάσεων με βάση τη τελική σύνθεση σιτηρεσίου που χρησιμοποιήθηκε.

Επεμβάσεις	C	PL	PH	A
Σιτηρεσίου	ΒΑΣΙΚΟ ΣΙΤΗΡΕΣΙΟ (Πίνακας 2.2.3)			
Προβιοτικό (1g/kg τροφής)	-	10^8 CFU/kg τροφής	10^9 CFU/kg τροφής	-
Αντιβιοτικό	-	-	-	2,5 mg αβιλαμυκίνης/kg τροφής

2.3 Παράμετροι που προσδιορίστηκαν

Στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας προσδιορίστηκαν η συνολική αύξηση του ζώντος βάρους (ΣΑΖΒ), η συνολική κατανάλωση τροφής (ΣΚΤ) και ο συντελεστής εκμετάλλευσης (ΣΕ) της τροφής. Για τον προσδιορισμό της σύστασης της μικροχλωρίδας χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικές τεχνικές και ανάλογα προσδιορίστηκαν και τα σχετικά μικροβιακά γένη / είδη (Διάγραμμα 2.3.4). Ως δείκτης της μεταβολικής δραστηριότητας προσδιορίστηκε η συγκέντρωση των πτητικών λιπαρών οξέων.



Διάγραμμα 2.3.4. Σχηματική παράσταση των αναλυτικών μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν για το προσδιορισμό της σύστασης της μικροχλωρίδας του τυφλού εντέρου ορνιθίων κρεοπαραγωγής.

2.4 Μικροβιολογικές αναλύσεις

2.4.1 Φθορίζουσα in situ υβριδοποίηση (FISH)

Η φθορίζουσα *in situ* υβριδοποίηση (FISH) ανιχνεύει αλληλουχίες νουκλεικών οξέων με τη βοήθεια φθοριζόντων σημασμένων ανιχνευτών που είναι συμπληρωματικοί στις αλληλουχίες στόχους μέσα στο βακτηριακό κύτταρο (Moter and Gobel 2000). Η αναλυτική τεχνική αποτελείται από τα ακόλουθα βήματα α) Μονιμοποίηση κυττάρων β) Υβριδοποίηση γ) Έκπλυση και τέλος δ) Καταμέτρηση.

Η μονιμοποίηση των βακτηριακών κυττάρων είναι το πρώτο βήμα της FISH, κατά το οποίο διατηρείται το κυτταρικό DNA και RNA στην αρχική του κατάσταση, και αποσκοπεί στην αύξηση της διαπερατότητας του κυτταρικού τοιχώματος για να μπορέσει να διεισδύσει ο ανιχνευτής (Zwirglmaier 2005). Η επεξεργασία των μονιμοποιημένων κυττάρων με λυτικά ένζυμα (π.χ λυσοζύμη) στοχεύει στην περαιτέρω αύξηση της διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης τους (Amann *et al.,* 1995). Η υβριδοποίηση, το δεύτερο βήμα της FISH, έχει ως σκοπό την πρόσδεση του ανιχνευτή στην αλληλουχία στόχο (π.χ 16S rRNA ή 23S rRNA). Οι ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται αποτελούνται από 15-30 νουκλεοτίδια όπου στο 5΄ άκρο τους είναι προσδεμένη μία φθορίζουσα χρωστική. Το στάδιο της έκπλυσης εφαρμόζεται για να απομακρυνθεί η ποσότητα του ανιχνευτεί που δεν έχει υβριδοποιηθεί στη θέση στόχο (Amann *et al.,* 2001). Τέλος, τα υβριδοποιημένα κύτταρα καταμετρούνται με κατάλληλο μικροσκόπιο φθορισμού.

Η ανάλυση Φθορίζουσα *in situ* υβριδοποίηση εκτελέστηκε όπως περιγράφεται από τους Franks *et al.* (1998) με μικρές τροποποιήσεις.

<u>Προετοιμασία δειγμάτων</u>

Τα κατεψυγμένα σε βαθιά κατάψυξη (-80 ^{o}C) δείγματα τυφλών εντέρων των ορνιθίων αποψύχθηκαν πάνω σε πάγο. Από κάθε τυφλό έντερο έγινε λήψη 1g περιεχομένου κάτω από άσηπτες συνθήκες και αραιώθηκε με κρύο (4 ^{o}C) αποστειρωμένο φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα (PBS, 0,1 M, pH 7.0) σε συγκέντρωση 1:10 w/v. Ακολούθησε ομογενοποίηση των δειγμάτων σε ειδική συσκευή για 3 min και εν συνεχεία φυγοκέντρηση (700 g για 2 min, 4 ^{o}C) με σκοπό την εναιώρηση των βακτηρίων. Το υπερκείμενο αναμίχθηκε με 4% διάλυμα παραφορμαλδεύδης (4°C για

16 ώρες) με σκοπό τη μονιμοποίηση των βακτηρίων. Η ανάκτηση των κυττάρων έγινε με φυγοκέντρηση (10.000 x g , για 5 λεπτά). Κατόπιν έγινε έκπλυση (x3) σε PBS πριν την τελική τους αποθήκευση σε διάλυμα αιθανόλης (EtOH) 96% / PBS (1:1) στους -20 ^{o}C.

Υβριδοποίηση

Πριν αρχίσει η διαδικασία της υβριδοποίησης έγινε επεξεργασία των βακτηριακών κυττάρων με διάλυμα λυσοζύμης (1mg λυσοζύμης / ml Tris-HCl). Εν συνεχεία, ανακτήθηκαν με φυγοκέντρηση και αραιώθηκαν σε διάλυμα EtOH:PBS. Στο εναιώρημα των κυττάρων προστέθηκε ρυθμιστικό διάλυμα υβριδοποίησης [20mM Tris-HCl, 0,9M NaCl, 0,1 % SDS (w/v) pH 7,2] η οποία διενεργήθηκε σε θερμοκρασία που προσδιορίστηκε ειδικά για τον κάθε μοριακό ανιχνευτή για διάστημα 16 ωρών. Η θερμοκρασία επώασης καθώς και η περιεκτικότητα σε φορμαμίδιο για τον κάθε μοριακό ανιχνευτή αναφέρεται στον Πίνακα 2.4.1.5. Οι ανιχνευτές που χρησιμοποιήθηκαν επιλέχθηκαν από τη βιβλιογραφία (Πίνακας 2.4.1.5.), συντέθηκαν και σημάνθηκαν με φθορίζουσα χρωστική Cy3 (VBC AUSTRIA). Το υβριδοποιημένο βακτηριακό εναιώρημα φιλτραρίστηκε υπό κενό. Ακολούθως έγινε έκπλυση με 25 ml διαλύματος (20mM Tris-HCl, 0,9M NaCl) και κατόπιν το φίλτρο τοποθετήθηκε πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα για μικροσκοπική εξέταση.

Καταμέτρηση βακτηριακών κυττάρων

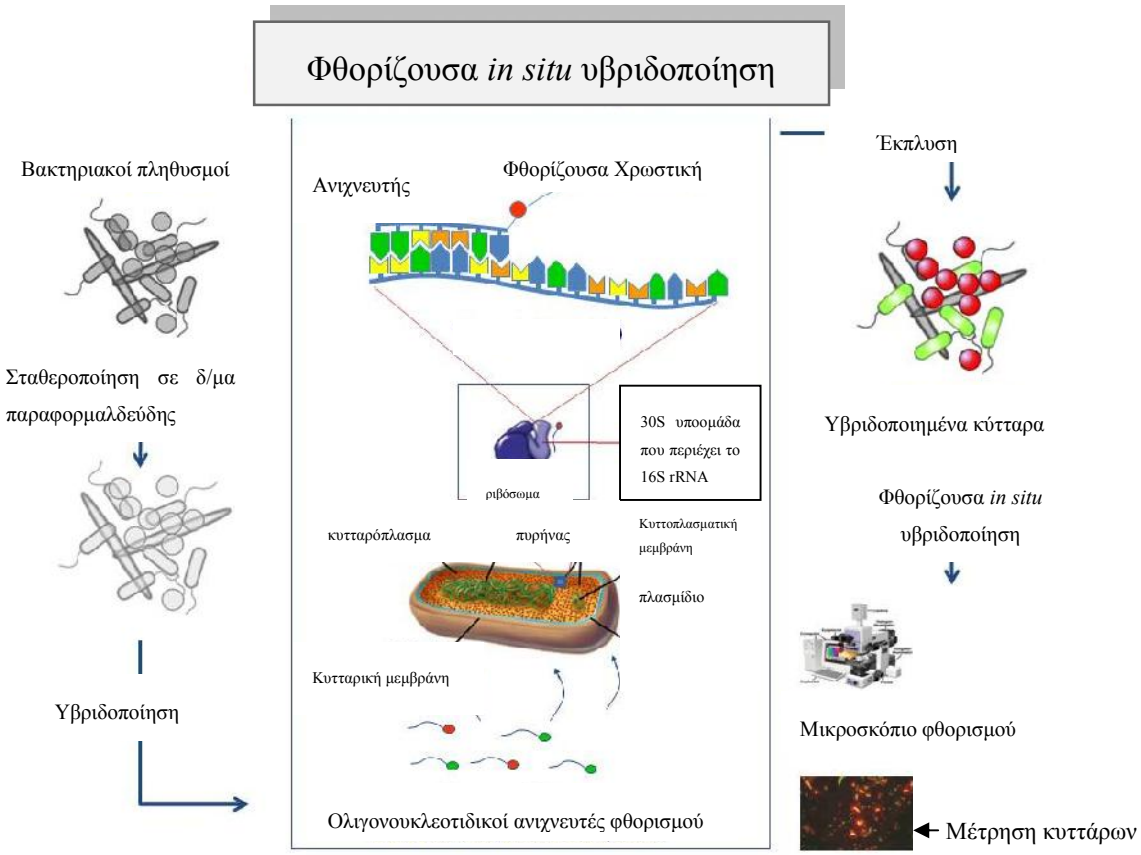
Η καταμέτρηση των βακτηριακών πληθυσμών του περιεχομένου τυφλού εντέρου έγινε σε μικροσκόπιο φθορισμού σύμφωνα με τους Mountzouris *et al.*(2006). Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε log10 βακτήρια / g περιεχομένου.

.

Πίνακας 2.4.1.5. Ολιγονουκλεοτιδικοί ανιχνευτές που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση του περιεχομένου του τυφλού εντέρου με την τεχνική της φθορίζουσας *in situ* υβριδοποίηση

Ανιχνευτής	Αλληλουχία (5΄-3΄)	Βακτηριακός πληθυσμός	Θερμοκρασία υβριδοποίησης (^{o}C)	Συγκέντρωση φορμαμιδίου (%)	Βιβλιογραφία
Eub338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	Ολικά βακτήρια	**50**	**0**	**Amann *et al.*, (1990)**
Erec482	GCTTCTTAGTCA(A/G)GTACCG	*Clostridium coccoides-Eubacterium rectale* group (*Clostridium* cluster XIVa and XIVb)	**50**	**0**	**Franks *et al.*, (1998)**
Bfra	GAGCCGCAAACTTTCACAA	*Bacteroides fragilis* group	**45**	**30***	**Franks *et al.*, (1998)**
Chis150	TTATGC GGTATT AATCT(C/T)CCT TT	*Clostridium histolyticum* group (*Clostridium* cluster I and II)	**45**	**30***	**Franks *et al* ., (1998)**
Lab158	GGTATTAGCA(C/T)CTGTTTCCA	*Lactobacillus-Enterococcus*	**50**	**0**	**Harmsen *et al.*., (1999)**
Bif662	CCACCGTTACACCGGGAA	*Bifidobacterium sp.*	**50**	**10***	**Langendijk *et al.*, (1995)**
Str	CACTCTCCCCTTCTGCAC	*Streptococcus spp*	**45**	**30**	**Trebesius *et al*., (2000)**
Eco1167	GCATAAGCGTCGCTGCCG	*Escherichia coli*	**37**	**40**	**Neef *et al.*, (1995)**

*Η άριστη συγκέντρωση φορμαμιδίου προσδιορίστηκε στα πλαίσια της παρούσας εργασίας.



Διάγραμμα 2.4.1.5 Διάγραμμα ροής της φθορίζουσας *in situ* υβριδοποίησης. (Τροποποίηση από: http://www.biovisible.com/indexRD.php?page=fish).

2.4.2 Καλλιέργεια

Παρασκευή θρεπτικών υλικών

Για την παρασκευή των θρεπτικών υλικών χρησιμοποιήθηκαν φιάλες Duran των 500 και 1000 ml, καθώς και τρυβλία Petri τα οποία πληρώθηκαν με το κατάλληλα αποστειρωμένο θρεπτικό υλικό. Για την αποφυγή μολύνσεων η πλήρωση των τρυβλίων έλαβε χώρα μέσα σε θάλαμο νηματικής ροής.

Τα θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την καλλιέργεια των διαφόρων βακτηριακών πληθυσμών ήταν σύμφωνα με τους (Tuohy *et al.,* 2002; Mountzouris *et al.,* 2007) και παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (2.4.2.6).

Πίνακας 2.4.2.7 Αντιστοιχία βακτηριακών πληθυσμών και θρεπτικών υλικών

Βακτηριακός πληθυσμός	**Θρεπτικό υλικό**	**Προσθήκες**
Ολικά αερόβια	Nutrient Agar	
Ολικά αναερόβια	Wilkins-Chalgren Anaerobe Agar	
Lactobacillus	Rogosa Agar	
Bifidobacterium	Beerens Agar	
Clostridium	Clostridıen Agar (RCM)	Polymyxin B Sulfate
C. perfrigens	Perfrigens agar base	SFP SR0093
***E.coli* /Κολοβακτηρίδια (*Coliforms*)**	Brilliance E.coli/ Coliforms selective agar	
Gram-θετικοί κόκκοι	Bile Esculin Azide Agar	

Όλα τα θρεπτικά υλικά ήταν του οίκου Oxoid (Basingstoke, UK).

Παρασκευή αραιωτικών

Για την πραγματοποίηση διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων χρησιμοποιήθηκε διάλυμα πεπτόνη στο οποίο είχε προστεθεί άνυδρη υδροχλωρική κυστεΐνη. Το διάλυμα πεπτόνης κατανεμήθηκε σε φιαλίδια ανά 9 ml και ακολούθησε αποστείρωση για 15 min στους 121° C.

Διαδικασία καλλιέργειας δειγμάτων

Έγιναν δεκαδικές αραιώσεις (10^{-1} έως την 10^{-7}) για κάθε δείγμα ομογενοποιημένου εντερικού περιεχόμενου τυφλού εντέρου. Κατόπιν γίνονταν ενοφθαλμισμός της κάθε αραίωσης στα θρεπτικά υλικά για όλα τα υπό εξέταση βακτήρια. Τα τρυβλία για την καλλιέργεια των ολικών αερόβιων των κολοβακτηρίων και του είδους *E. coli* επωάζονταν αερόβια για 24 ώρες στους 39 ^{o}C. Τα τρυβλία για την

καλλιέργεια των ολικών αναερόβιων, Gram + κόκκων των γενών *Lactobacillus, Bifidobacterium, Clostridium* και του είδους *C. perfrigens* επωάζονταν αναερόβια για 48-96 ώρες στους 39 ^{o}C. Για την αναερόβια επώαση έγινε χρήση ειδικών καταλυτών και δοχείων που εξασφαλίζουν αναερόβιο περιβάλλον (Oxoid Basingstoke, UK).

2.4.3 Διαδικασία προσδιορισμού της συγκέντρωσης των πτητικών λιπαρών οξέων (Π.Λ.Ο)

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των Π.Λ.Ο. στο περιεχόμενο του τυφλού εντέρου, από τα ομογενοποιημένα δείγματα του τυφλού εντέρου έγινε λήψη του υπερκειμένου κατόπιν φυγοκέντρησης (12,000 × g για 10 min στους 4° C).

Η συγκέντρωση των ΠΛΟ (οξικό, προπιονικό, βουτυρικό, ισοβουτυρικό, βαλερικό, ισοβαλερικό, καπροϊκό και ισοκαπροϊκό) στο υπερκείμενο προσδιορίστηκε με τη χρήση αέριου χρωματογράφου σύμφωνα με τους Mountzouris *et al.* (2007).

2.5 Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Τα δεδομένα των παραγωγικών χαρακτηριστικών (συνολική αύξηση ζώντος βάρους, συνολική κατανάλωση τροφής και συντελεστής εκμετάλλευσης) αναλύθηκαν χρησιμοποιόντας το κλωβό ως πειραματική μονάδα (επανάληψη), ενώ η ανάλυση των δεδομένων της σύστασης της εντερικής μικροχλωρίδας και της μεταβολικής δραστηριότητας αναλύθηκε χρησιμοποιώντας το ορνιθίο ως πειραματική μονάδα. Τα πειραματικά δεδομένα αναλύθηκαν με τη χρήση του γενικού γραμμικού προτύπου για την εκτίμηση της επίδρασης της επέμβασης (Ε), του φύλου (Φ) και της αλληλεπίδρασης (Ε × Φ) και πραγματοποιήθηκε ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) με τη χρήση του στατιστικού πακέτου S.P.S.S (Έκδοση 16.0, S.P.S.S USA). Με βάση το πειραματικό σχέδιο δεν πραγματοποιήθηκε η ανάλυση της αλληλεπίδραση για την περίπτωση των παραγωγικών χαρακτηριστικών. Όπου προέκυψαν στατιστικά σημαντικές διαφορές, η σύγκριση των μέσων όρων μεταξύ των επεμβάσεων έγινε με το κριτήριο Duncan και ως επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε το 5% ($P \leq 0,05$). Τέλος με τη βοήθεια πολυωνυμικών αντιθέσεων προσδιορίστηκε η γραμμική και η τετραγωνική επίδραση του επιπέδου προσθήκης του προβιοτικού στο σιτηρέσιο για τις παραμέτρους που εξετάστηκαν.

3. Αποτελέσματα

3.1 Παραγωγικά χαρακτηριστικά

Στον πίνακα (3.1.7) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της συνολικής αύξησης του ζώντος βάρους (ΣΑΖΒ), της συνολικής κατανάλωσης της τροφής (ΣΚΤ) και του συντελεστή εκμετάλλευσης (ΣΕ) για τη χρονική περίοδος 1-42 ημέρες που διήρκησε το πείραμα.

Σημαντικές διαφορές μεταξύ των επεμβάσεων αναφορικά με την αύξηση του σωματικού βάρους και την κατανάλωση της τροφής, παρατηρήθηκαν ως αποτέλεσμα της χορήγησης του προβιοτικού (PL, PH) και του αντιβιοτικού σε σχέση με το μάρτυρα. Πιο συγκεκριμένα, από τις επεμβάσεις του προβιοτικού και του αντιβιοτικού προέκυψαν στατιστικώς υψηλότερες τιμές (P=0,002) στη ΣΑΖΒ σε σχέση την επέμβαση του μάρτυρα, ενώ η επέμβαση του αντιβιοτικού είχε υψηλότερη τιμή και από την επέμβαση PH και C. Επίσης υψηλότερες τιμές (P=0,005) στη ΣΚΤ παρουσιάστηκαν από την προσθήκη του προβιοτικού (PL, PH) και του αντιβιοτικού στο σιτηρέσιο σε σχέση με το μάρτυρα. Γραμμική και τετραγωνική επίδραση (P=0,003, P=0,012) στη ΣΑΖΒ και γραμμική επίδραση στη ΣΚΤ (και P=0,007) σημειώθηκε με την αύξηση της συγκέντρωσης του προβιοτικού στο σιτηρέσιο (Διαγράμματα 3.1.6, 3.1.7).

Αντίθετα δεν σημειώθηκε σημαντική (P>0,05) διαφορά στο ΣΕ της τροφής μεταξύ των επεμβάσεων. Ανεξάρτητα από την επέμβαση, τα αρσενικά ορνίθια είχαν υψηλότερη ΣΑΖΒ και ΣΚΤ (P<0,001 και P<0,001) και χαμηλότερο ΣΕ (P=0,003) από τα θηλυκά ορνίθια. Τέλος, δεν εμφανίστηκαν σημαντικές αλληλεπιδράσεις (P>0,05) μεταξύ επέμβασης και φύλου για καμία από τις παραπάνω ζωοτεχνικές παραμέτρους.

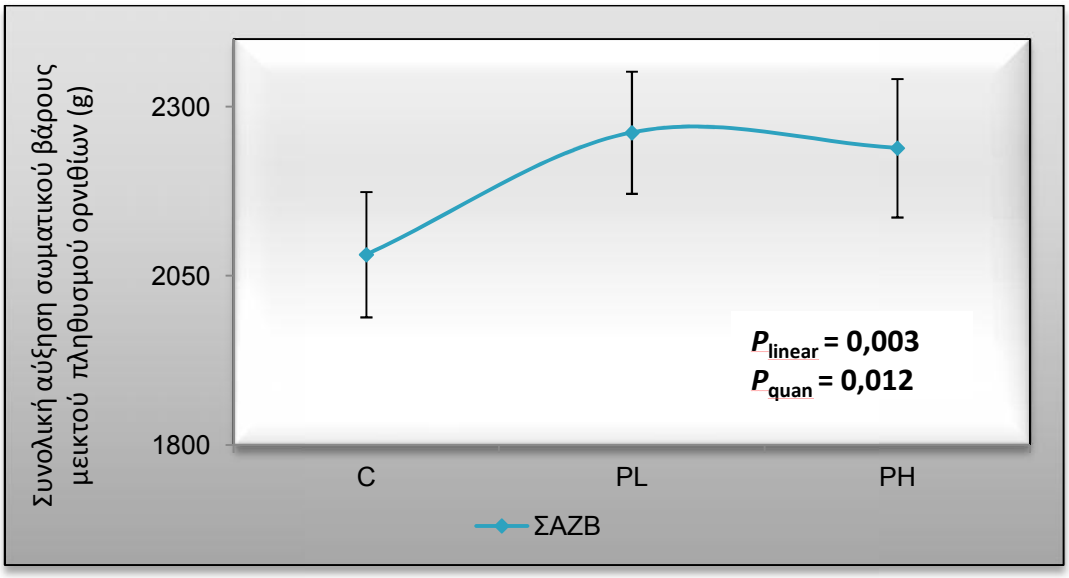
Πίνακας 3.1.8 Συνολική αύξηση ζώντος βάρους (ΣΑΖΒ), κατανάλωση της τροφής (ΣΚΤ) και συντελεστής εκμετάλλευσης (ΣΕ).

Παραγωγικά χαρακτηριστικά	Επέμβαση[2]				Φύλο		SEM[3]	Σημαντικότητα	
								Επίδραση	
	C	PL	PH	A	Άρρεν	Θήλυ		Επέμβαση	Φύλο
ΣΑΖΒ[1] (g)	2081,6[a]	2261,8[bc]	2238,9[b]	2340,6[c]	2393,4	2068,0	41,75	0,002	0,000
ΣΚΤ(g)	3866,9[a]	4074,5[b]	4097,0[b]	4184,1[b]	4267,6	3843,7	60,36	0,005	0,000
ΣΕ (ΣΑΖΒ/ΣΚΤ)	1,86	1,81	1,83	1,79	1,79	1,86	0,025	0,104	0,003

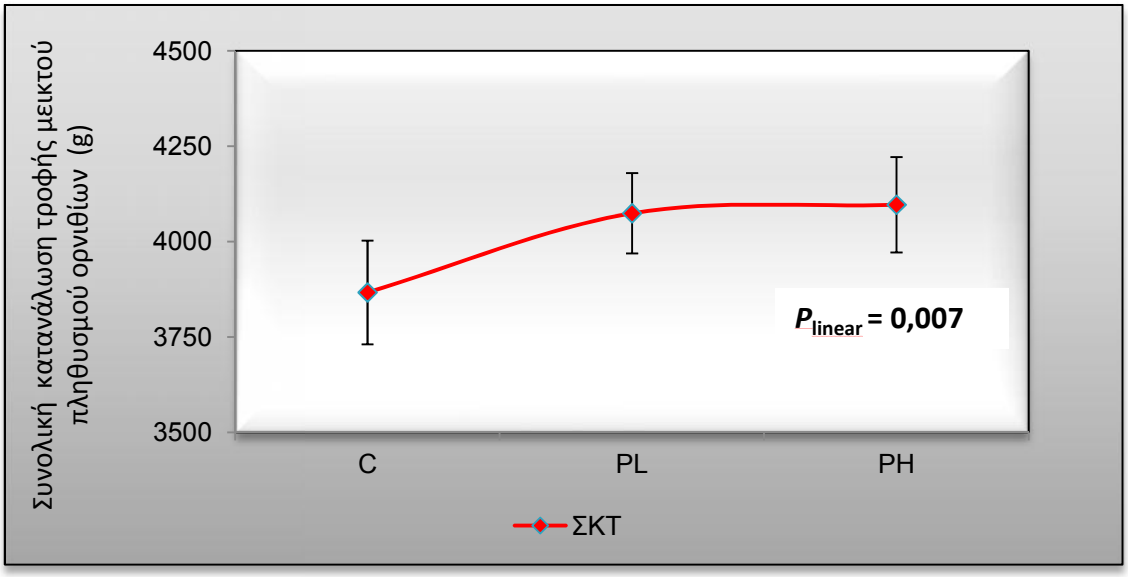
[1]Μέσος όρος μετρήσεων 4 επαναλήψεων ανά επέμβαση. Σε κάθε γραμμή, μέσοι όροι με διαφορετικούς εκθέτες (a, b, c) διαφέρουν σημαντικά ($P \leq 0,05$).

[2]C= μάρτυρας, PL= προβιοτικό σε συγκέντρωση 10^8 cfu/kg τροφής, PH= προβιοτικό σε συγκέντρωση 10^9 cfu/kg τροφής, A= αβιλαμυκίνη σε συγκέντρωση 2,5 mg/kg τροφής.

[3]Συγκεντρωτικό τυπικό σφάλμα των μέσων όρων.



Διάγραμμα 3.1.6 Επίδραση του επιπέδου προσθήκης προβιοτικού επί της συνολικής αύξησης του ζώντος βάρους ορνιθίων. C= μάρτυρας, PL= προβιοτικό σε συγκέντρωση 10^8 cfu/kg τροφής, PH= προβιοτικό σε συγκέντρωση 10^9 cfu/kg τροφής.



Διάγραμμα 3.1.7 Επίδραση του επιπέδου προσθήκης προβιοτικού επί της συνολικής κατανάλωσης τροφής. C=μάρτυρας, PL=προβιοτικό σε συγκέντρωση 10^8 cfu/kg τροφής, PH=προβιοτικό σε συγκέντρωση 10^9 cfu/kg τροφής.

3.2. Συγκέντρωση βακτηριακών πληθυσμών

3.2.1. Φθορίζουσα in situ υβριδοποίηση

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων στο μεικτό πληθυσμό (♂ και ♀) έδειξε ότι, σημαντική διαφορά (P=0,001) μεταξύ των επεμβάσεων παρουσιάστηκε μόνο στη συγκέντρωση του γένους *Bifidobacterium* (Πίνακας 3.2.1.8). Συγκεκριμένα η επέμβαση PH είχε υψηλότερη συγκέντρωση (P=0,001) από τις επεμβάσεις C και A.

Ανεξαρτήτως επέμβασης, παρουσιάστηκε επίδραση του φύλου. Αναλυτικότερα, τα αρσενικά ορνίθια είχαν υψηλότερη συγκέντρωση των βακτηριακών πληθυσμών *Clostridium histolyticum* (P=0,001), *Bacteroides fragilis* (P=0,008) group και *Streptococcus* (P=0,001) (Πίνακας 3.2.1.8) σε σύγκριση με των θηλυκών. Επιπροσθέτως, για το γένος *Bifidobacterium* σημειώθηκε σημαντική (P=0,022) αλληλεπίδραση της επέμβασης με το φύλο, όπου τα θηλυκά ορνίθια στην επέμβαση PH είχαν μικρότερη τιμή σε σχέση με τα αρσενικά.

Ακόμα παρουσιάστηκε γραμμική επίδραση (P=0,048 και P=0,006) στη συγκέντρωση των βακτηριακών πληθυσμών *C. coccoides - E. rectale* και του γένους *Bifidobacterium* με το επίπεδο προσθήκης του προβιοτικού στο σιτηρέσιο (Διάγραμμα 3.2.1.8).

Στο περιεχόμενο του τυφλού εντέρου των αρσενικών ορνιθίων (Πίνακας 3.2.1.9), η συγκέντρωση του γένους *Bifidobacterium* εμφάνισε γραμμικό μοτίβο αύξησης (P=0,001) με την συγκέντρωση του προβιοτικού στο σιτηρέσιο. Η επέμβαση A διέφερε σημαντικά (P ≤0,05) από τις επεμβάσεις PL και PH, αλλά όχι από την επέμβαση C.

Στα θηλυκά ορνίθια (Πίνακας 3.2.1.10) σημαντική διαφορά (P ≤0,05) σημειώθηκε μόνο στη συγκέντρωση του γένους *Bifidobacterium* με την επέμβαση A να λαμβάνει χαμηλότερη τιμή, σε σχέση με όλες τις υπόλοιπες επεμβάσεις.

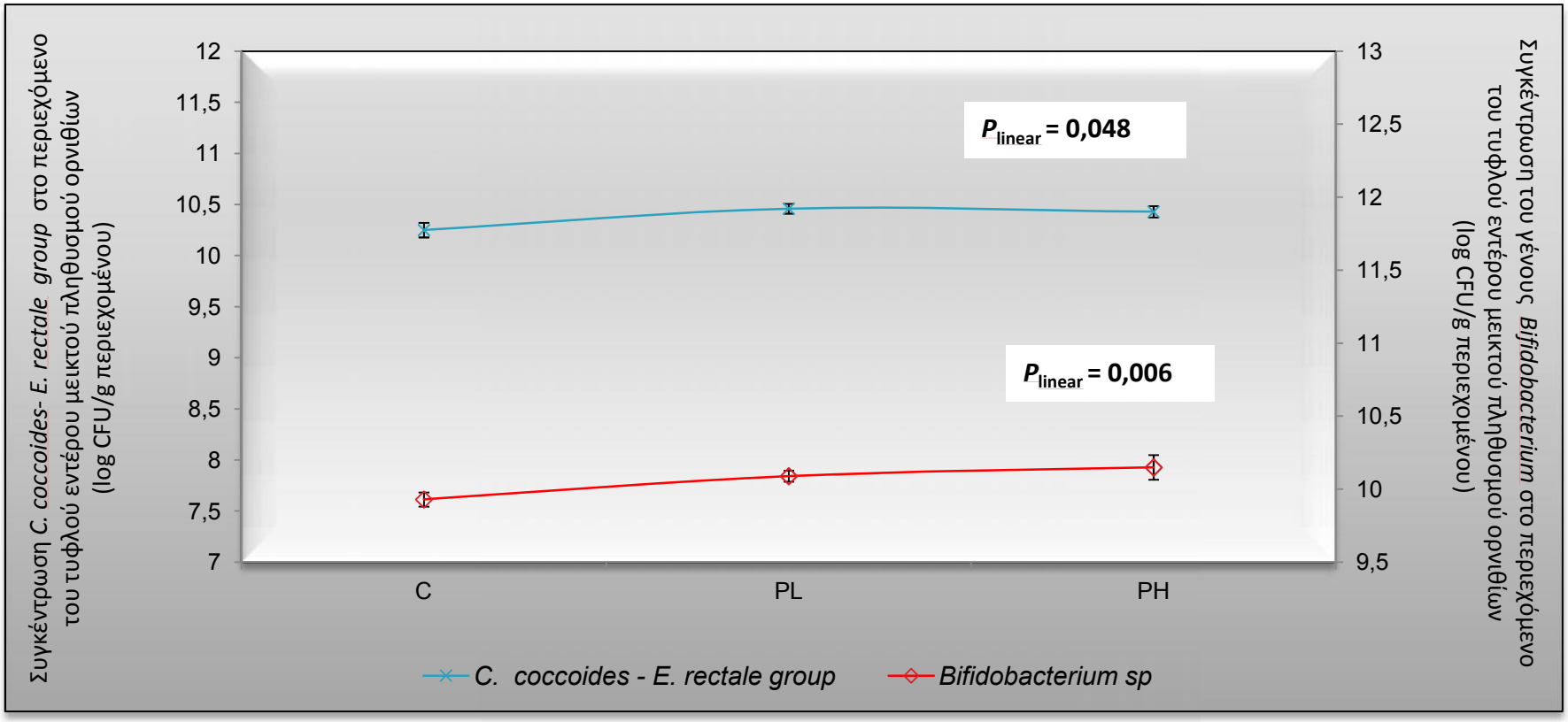
Πίνακας 3.2.1.9. Συγκέντρωση των υπό μελέτη βακτηριακών πληθυσμών που προσδιορίστηκαν στο περιεχόμενο τυφλού εντέρου ορνιθίων ηλικίας 42 ημερών.

Βακ. Πληθυσμός	Επέμβαση[2]				Φύλο		SEM[3]	Σημαντικότητα		
								Επίδραση		Αλληλεπίδραση
	C	PL	PH	A	Άρρεν	Θήλυ		Επέμβαση	Φύλο	Επέμβαση × φύλο
Ολικά βακτήρια[1]	11,15	11,30	11,26	11,37	11,33	11,21	0,124	0,362	0,175	0,577
C. coccoides - E. rectale group	10,25	10,46	10,43	10,42	10,38	10,39	0,099	0,154	0,811	0,815
C. histolyticum group	8,86	9,06	9,03	8,94	9,18	8,77	0,154	0,580	0,001	0,945
B. fragilis group	8,89	8,97	8,79	8,90	9,00	8,77	0,119	0,476	0,008	0,328
Lactobacillus sp. - Enterococcus sp.	9,40	9,32	9,47	9,50	9,46	9,39	0,073	0,082	0,151	0,336
Bifidobacterium sp.	9,93[ab]	10,09[bc]	10,12[c]	9,79[a]	10,05	9,94	0,086	0,001	0,084	0,022
Streptococcus sp.	9,90	9,88	9,93	9,86	10,02	9,77	0,098	0,894	0,001	0,243
E. coli	8,59	8,72	8,78	8,80	8,71	8,74	0,086	0,384	0,751	0,321

[1]Μέσος όρος μετρήσεων 12 ορνιθίων ανά επέμβαση. Σε κάθε γραμμή, μέσοι όροι με διαφορετικούς εκθέτες (a, b, c) διαφέρουν σημαντικά ($P \leq 0,05$) .

[2]C= μάρτυρας, PL= προβιοτικό σε συγκέντρωση 10^8 cfu/kg τροφής, PH= προβιοτικό σε συγκέντρωση 10^9 cfu/kg τροφής, A= αβιλαμυκίνη σε συγκέντρωση 2,5 mg/kg τροφής.

[3]Συγκεντρωτικό τυπικό σφάλμα των μέσων όρων.



Διάγραμμα 3.2.1.8 Επίδραση του επιπέδου του προβιοτικού επί της συγκέντρωσης των βακτηριακών πληθυσμών *C.coccoides-E.rectale* και του γένους *Bifidobacterium* στο περιεχόμενο του τυφλού εντέρου στο μεικτό πληθυσμό(♂ και ♀) ορνιθίων. C= μάρτυρας, PL= προβιοτικό σε συγκέντρωση 10^8 cfu/kg τροφής, PH= προβιοτικό σε συγκέντρωση 10^9 cfu/kg τροφής.

Πίνακας 3.2.1.10 Συγκέντρωση των υπό μελέτη βακτηριακών πληθυσμών στο περιεχόμενο του τυφλού εντέρου αρσενικών ορνιθίων ηλικίας 42 ημερών.

Βακτηριακός. Πληθυσμός	Επέμβαση[2]				SEM[3]	Πολυωνυμικές αντιθέσεις[4]	
	C	PL	PH	A		Γραμμική	Τετραγωνική
Ολικά βακτήρια[1]	11,14	11,40	11,39	11,38	0,207	0,260	0,477
C. coccoides – E. rectale group	10,25	10,43	10,46	10,36	0,155	0,137	0,528
C. histolyticum group	9,06	9,22	9,28	9,14	0,279	0,463	0,853
B. fragilis group	9,11	9,04	8,80	9,06	0,197	0,296	0,623
Lactobacillus sp. - Enterococcus sp.	9,38	9,31	9,54	9,60	0,123	0,228	0,179
Bifidobacterium sp.	9,84[a]	10,11[ab]	10,31[b]	9,91[a]	0,133	0,001	0,766
Streptococcus sp.	9,97	9,92	10,09	10,09	0,139	0,426	0,396
E. coli	8,49	8,84	8,79	8,71	0,196	0,067	0,147

[1]Μέσος όρος μετρήσεων 6 ορνιθίων ανά επέμβαση. Σε κάθε γραμμή, μέσοι όροι με διαφορετικούς εκθέτες (a, b, c) διαφέρουν σημαντικά ($P \leq 0,05$).

[2]C= μάρτυρας, PL=προβιοτικό σε συγκέντρωση 10^8 cfu/kg τροφής, PH=προβιοτικό σε συγκέντρωση 10^9 cfu/kg τροφής, A=αβιλαμυκίνη σε συγκέντρωση 2,5 mg/kg τροφής

[3]Συγκεντρωτικό τυπικό σφάλμα των μέσων όρων.

[4]Οι πολυωνυμικές αντιθέσεις χρησιμοποιήθηκαν για να εξετάσουν τη γραμμική και τετραγωνική επίδραση της προσθήκης του προβιοτικού στο σιτηρέσιο χρησιμοποιώντας τις επεμβάσεις C, PL και PH.

Πίνακας 3.2.1.11 Συγκέντρωση των υπό μελέτη βακτηριακών πληθυσμών στο περιεχόμενο τυφλού εντέρου θηλυκών ορνιθίων ηλικίας 42 ημερών.

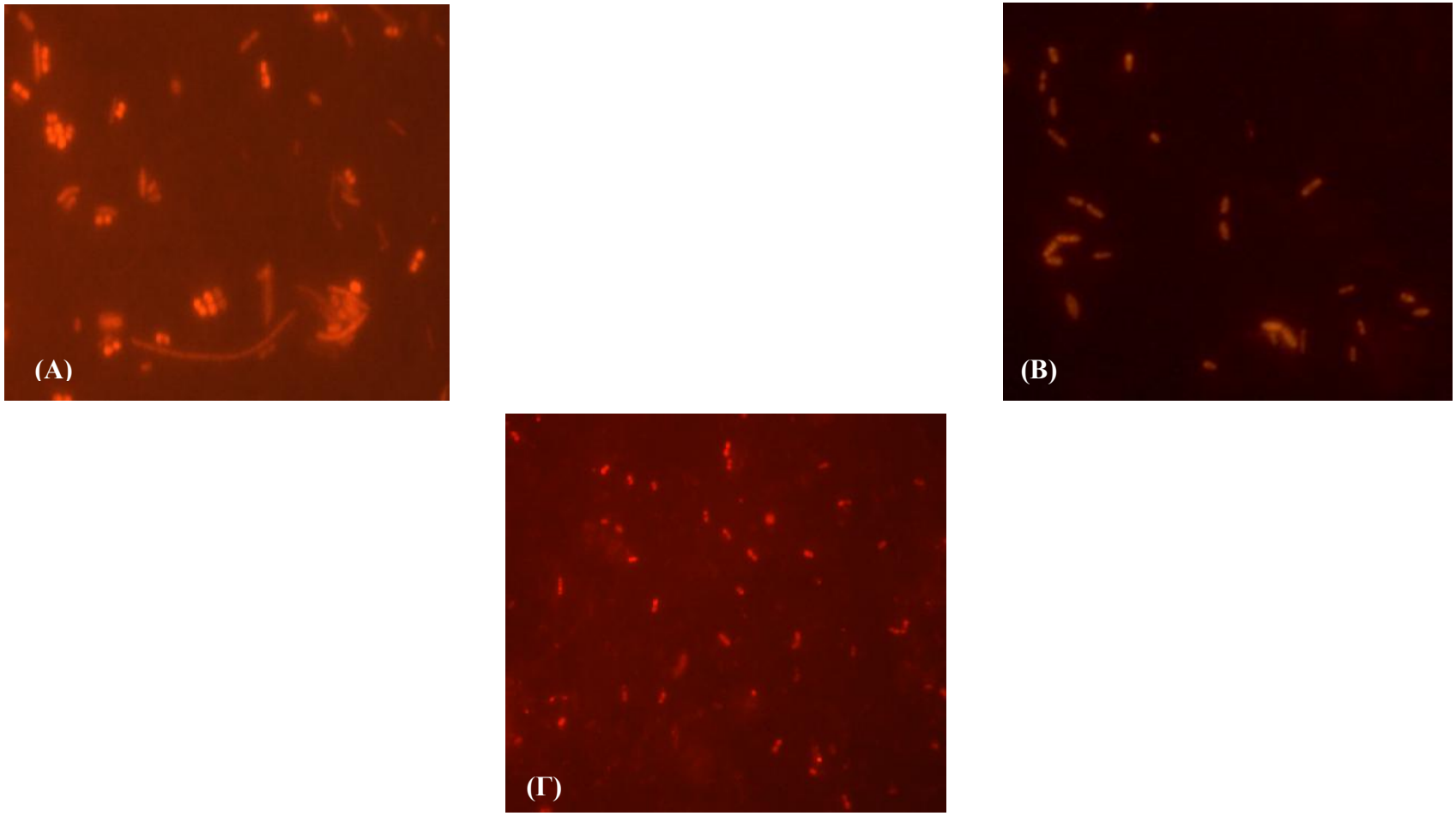
Βακτηριακός Πληθυσμός	Επέμβαση[2]				SEM[3]	Πολυωνυμικές αντιθέσεις[4]	
	C	PL	PH	A		Γραμμική	Τετραγωνική
Ολικά βακτήρια[1]	11,16	11,19	11,12	11,36	0,138	0,744	0,646
C. coccoides –E. rectale group	10,24	10,48	10,39	10,47	0,123	0,203	0,111
C. histolyticum group	8,67	8,90	8,78	8,73	0,130	0,468	0,173
B. fragilis group	8,67	8,91	8,77	8,73	0,133	0,505	0,161
Lactobacillus sp. - Enterococcus sp.	9,41	9,33	9,39	9,41	0,078	0,844	0,310
Bifidobacterium sp.	10,02[b]	10,07[b]	9,99[b]	9,66[a]	0,108	0,770	0,457
Streptococcus sp.	9,84	9,83	9.77	9,64	0,139	0,683	0,848
E. coli	8,68	8,60	8,78	8,90	0,188	0,625	0,420

[1]Μέσος όρος μετρήσεων 6 ορνιθίων ανά επέμβαση. Σε κάθε γραμμή, μέσοι όροι με διαφορετικούς εκθέτες (a, b, c) διαφέρουν σημαντικά ($P \leq 0,05$).

[2]C= μάρτυρας, PL= προβιοτικό σε συγκέντρωση 10^8 cfu/kg τροφής, PH= προβιοτικό σε συγκέντρωση 10^9 cfu/kg τροφής, A= αβιλαμυκίνη σε συγκέντρωση 2,5 mg/kg τροφής.

[3]Συγκεντρωτικό τυπικό σφάλμα των μέσων όρων.

[4]Οι πολυωνυμικές αντιθέσεις χρησιμοποιήθηκαν για να εξετάσουν τη γραμμική και τετραγωνική επίδραση της προσθήκης του προβιοτικού στο σιτηρέσιο χρησιμοποιώντας τις επεμβάσεις C, PL και PH.



Εικόνα 3.2.2.1. Απεικόνιση βακτηρίων που προσδιορίστηκαν με τα μέθοδο FISH στο περιεχόμενο ορνιθίων 42 ημερών και υβριδοποιήθηκαν με τον ανιχνευτή EUB 338 (A), BIF 622 (B) και STR (Γ).

3.2.2. Καλλιέργεια

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων της καλλιέργειας στο μεικτό πληθυσμό (♂ και ♀) ορνιθίων (Πίνακας 3.2.2.11) έδειξε ότι δεν υπήρχαν σημαντικές (P>0,05) διαφορές ανάμεσα στις επεμβάσεις για τους υπό εξέταση βακτηριακούς πληθυσμούς. Αντίθετα, ανεξαρτήτως επέμβασης, η συγκέντρωση των ολικών αναερόβιων βακτηρίων (P=0,001) καθώς και η συγκέντρωση του πληθυσμού *Clostridium* (P=0,026) επηρεάστηκε από το φύλο των ορνιθίων. Αναλυτικότερα, οι προαναφερθέντες βακτηριακοί πληθυσμοί είχαν υψηλότερη συγκέντρωση στο περιεχόμενο του τυφλού εντέρου των αρσενικών ορνιθίων σε σύγκριση με των θηλυκών. Επιπρόσθετα, δεν υπήρξαν σημαντικές αλληλεπιδράσεις της επέμβασης με το φύλο (P>0,05) για καμία από τις συγκεντρώσεις των υπό εξέταση βακτηριακών πληθυσμών.

Στο περιεχόμενο του τυφλού εντέρου των αρσενικών ορνιθίων (Πίνακας 3.2.2.12) η συγκέντρωση του πληθυσμού *Clostridium* επηρεάστηκε (P=0,011) με το επίπεδο προσθήκης του προβιοτικού στο σιτηρέσιο. Η επέμβαση PL είχε τη χαμηλότερη τιμή, ενώ η επέμβαση A διέφερε (P≤0,05) μόνο από την επέμβαση C. Όσον αφορά τη συγκέντρωση του είδους *C. perfrigens* δεν παρατηρήθηκε διαφορά (P>0,05) μεταξύ των επεμβάσεων. Παρόλα αυτά, η προσθήκη του προβιοτικού στο σιτηρέσιο επηρέασε (P=0,018) τη συγκέντρωση του είδους *C. perfrigens*, με την επέμβαση PL να λαμβάνει τη χαμηλότερη τιμή.

Καμία σημαντική διαφορά μεταξύ των επεμβάσεων δεν σημειώθηκε (P>0,05) στις συγκεντρώσεις των υπό εξέταση πληθυσμών στο περιεχόμενο του τυφλού εντέρου θηλυκών ορνιθίων (Πίνακας 3.2.2.13).

Πίνακας 3.2.2.12 Συγκέντρωση των υπό εξέταση βακτηριακών πληθυσμών στο περιεχόμενο τυφλού εντέρου ορνιθίων ηλικίας 42 ημερών.

Βακτηριακός Πληθυσμός	Επέμβαση[2]				Φύλο		SEM[3]	Σημαντικότητα		
								Επίδραση		Αλληλεπίδραση
	C	PL	PH	A	Άρρεν	Θήλυ		Επέμβαση	Φύλο	Επέμβαση × φύλο
Ολικά αερόβια [1]	7,87	7,67	8,02	7,84	7,90	7,80	0,197	0,361	0,433	0,933
Coliforms	7,14	6,73	6,97	6,92	7,03	6,85	0,241	0,404	0,280	0,448
E. coli	6,33	5,80	6,23	6,89	6,42	6,21	0,460	0,146	0,519	0,455
Ολικά αναερόβια	9,53	9,42	9,39	9,30	9,60	9,22	0,143	0,451	0,001	0,103
Clostridium sp.	8,83	8,43	8,51	8,46	8,71	8,41	0,183	0,133	0,026	0,115
C. perfrigens	6,99	6,89	7,60	7,35	7,25	7,16	0,294	0,071	0,645	0,372
Lactobacillus sp.	7,28	7,14	7,25	7,33	7,40	7,10	0,277	0,918	0,133	0,553
Bifidobacterium sp.	7,63	7,82	7,74	7,70	7,81	7,64	0,241	0,894	0,325	0,346
Gram$^+$ cocci	7,10	6,92	7,39	7,31	7,24	7,12	0,333	0,500	0,600	0,397

[1]Μέσος όρος μετρήσεων 12 ορνιθίων ανά επέμβαση. Σε κάθε γραμμή, μέσοι όροι με διαφορετικούς εκθέτες (a, b, c) διαφέρουν σημαντικά.

[2]C= μάρτυρας, PL= προβιοτικό σε συγκέντρωση 10^8 cfu/kg τροφής, PH= προβιοτικό σε συγκέντρωση 10^9 cfu/kg τροφής, A= αβιλαμυκίνη σε συγκέντρωση 2,5 mg/kg τροφής.

[3]Συγκεντρωτικό τυπικό σφάλμα των μέσων όρων.

Πίνακας 3.2.2.13 Συγκέντρωση των υπό εξέταση βακτηριακών πληθυσμών στο περιεχόμενο τυφλού εντέρου αρσενικών ορνιθίων ηλικίας 42 ημερών.

Βακτηριακός Πληθυσμός	Επέμβαση[2]				SEM[3]	Πολυωνυμικές αντιθέσεις[4]	
	C	PL	PH	A		Γραμμική	Τετραγωνική
Ολικά αερόβια [1]	7,99	7,65	8,06	7,91	0,272	0,793	0,154
Coliforms	7,38	6,80	6,85	7,10	0,291	0,114	0,282
E. coli	6,71	6,04	5,91	7,01	0,640	0,192	0,601
Ολικά αναερόβια	9,72	9,41	9,74	9,53	0,172	0,928	0,074
Clostridium sp.	9,13[b]	8,37[a]	8,82[ab]	8,50[a]	0,255	0,207	0,011
C. perfrigens	7,25	6,69	7,79	7,29	0,421	0,155	0,018
Lactobacillus sp.	7,59	7,20	7,51	7,29	0,395	0,813	0,198
Bifidobacterium sp.	7,81	7,64	7,99	7,80	0,258	0,453	0,221
Gram$^+$ cocci	7,22	6,64	7,62	7,50	0,547	0,508	0,146

[1]Μέσος όρος μετρήσεων 6 ορνιθίων ανά επέμβαση. Σε κάθε γραμμή, μέσοι όροι με διαφορετικούς εκθέτες (a, b, c) διαφέρουν σημαντικά ($P \leq 0,05$).

[2]C= μάρτυρας, PL= προβιοτικό σε συγκέντρωση 10^8 cfu/kg τροφής, PH= προβιοτικό σε συγκέντρωση 10^9 cfu/kg τροφής, A= αβιλαμυκίνη σε συγκέντρωση 2,5 mg/kg τροφής.

[3]Συγκεντρωτικό τυπικό σφάλμα των μέσων όρων.

[4]Οι πολυωνυμικές αντιθέσεις χρησιμοποιήθηκαν για να εξετάσουν τη γραμμική και τετραγωνική επίδραση της προσθήκης του προβιοτικού στο σιτηρέσιο χρησιμοποιώντας τις επεμβάσεις C, PL και PH.

Πίνακας 3.2.2.14 Συγκέντρωση των υπό εξέταση βακτηριακών πληθυσμών στο περιεχόμενο τυφλού εντέρου θηλυκών ορνιθίων ηλικίας 42 ημερών.

Βακτηριακός Πληθυσμός	Επέμβαση				SEM	Πολυωνυμικές αντιθέσεις[4]	
	C	PL	PH	A		Γραμμική	Τετραγωνική
Ολικά αερόβια [1]	7,76	7,68	7,98	7,77	0,284	0,431	0,430
Coliforms	6,91	6,66	7,10	6,72	0,385	0,647	0,346
E. coli	5,94	5,56	6,56	6,77	0,660	0,318	0,206
***Ολικά* αναερόβια**	9,34	9,43	9,04	9,07	0,230	0,221	0,258
Clostridium sp.	8,52	8,49	8,19	8,42	0,261	0,193	0,527
C. perfrigens	6,72	7,09	7,41	7,41	0,409	0,112	0,953
Lactobacillus sp.	6,97	7,08	6,98	7,36	0,388	0,959	0,738
Bifidobacterium sp.	7,46	7,99	7,50	7,61	0,408	0,884	0,078
Gram$^+$ cocci	6,98	7,21	7,16	7,12	0,380	0,624	0,665

[1]Μέσος όρος μετρήσεων 6 ορνιθίων ανά επέμβαση. Σε κάθε γραμμή, μέσοι όροι με διαφορετικούς εκθέτες (a, b, c) διαφέρουν σημαντικά ($P \leq 0,05$).

[2]C= μάρτυρας, PL= προβιοτικό σε συγκέντρωση 10^8 cfu/kg τροφής, PH= προβιοτικό σε συγκέντρωση 10^9 cfu/kg τροφής, A= αβιλαμυκίνη σε συγκέντρωση 2,5 mg/kg τροφής.

[3]Συγκεντρωτικό τυπικό σφάλμα των μέσων όρων.

[4]Οι πολυωνυμικές αντιθέσεις χρησιμοποιήθηκαν για να εξετάσουν τη γραμμική και τετραγωνική επίδραση της προσθήκης του προβιοτικού στο σιτηρέσιο χρησιμοποιώντας τις επεμβάσεις C, PL και PH.

3.3. Συγκέντρωση πτητικών λιπαρών οξέων

Από τη στατιστική ανάλυση της συγκέντρωσης των πτητικών λιπαρών οξέων (Π.Λ.Ο) στο περιεχόμενο του τυφλού εντέρου του μεικτού πληθυσμού (♂ και ♀) ορνιθίων (Πίνακας 3.3.14) δεν σημειώθηκαν σημαντικές διαφορές (P>0,05) όσον αφορά τη συγκέντρωση των ολικών πτητικών λιπαρών ανάμεσα στις επεμβάσεις. Προέκυψαν όμως διαφορές αναφορικά με την μοριακή αναλογία του οξικού (P=0,035), του προπιονικού (P =0,044) και του βουτυρικού οξέος (P =0,001). Συγκεκριμένα, στη μοριακή αναλογία του οξικού οξέος η επέμβαση του μάρτυρα διέφερε μόνο από τις επεμβάσεις PL και PH, έχοντας την υψηλότερη τιμή. Η μοριακή αναλογία του προπιονικού οξέος είχε υψηλότερη τιμή στο μάρτυρα σε σχέση με την επέμβαση PH. Οι επεμβάσεις PL και A πήραν ενδιάμεσες τιμές και δεν διέφεραν από τις επεμβάσεις C και PH. Τέλος η επέμβαση του μάρτυρα είχε χαμηλότερη μοριακή αναλογία βουτυρικού οξέος σε σχέση με τις υπόλοιπες επεμβάσεις.

Ανεξαρτήτως επέμβασης, δεν παρουσιάστηκε επίδραση του φύλου (P>0,05) στην ολική συγκέντρωση και στη μοριακή αναλογία των Π.Λ.Ο στο περιεχόμενο του τυφλού εντέρου των ορνιθίων. Εκτός από την περίπτωση του οξικού οξέος, για την μοριακή αναλογία των υπολοίπων Π.Λ.Ο. καθώς και την ολική συγκέντρωση τους υπήρξαν σημαντικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ της επέμβασης και του φύλου.

Το επίπεδο προσθήκης του προβιοτικού στο σιτηρέσιο επηρέασε τη συγκέντρωση των ολικών Π.Λ.Ο και τη μοριακή αναλογία του προπιονικού οξέος, τα οποία εμφάνισαν μοτίβο γραμμικής αύξησης (P=0,036) και γραμμικής μείωσης (P=0,004) αντίστοιχα. Επιπλέον, προέκυψε γραμμική και τετραγωνική επίδραση στη μοριακή αναλογία του βουτυρικού οξέος (P≤0,001 και P=0.011) και του οξικού οξέος (P=0,009 και P=0,037) με την αύξηση της συγκέντρωσης του προβιοτικού στο σιτηρέσιο (Διαγράμματα 3.3.9, 3.3.10, 3.3.11 και 3.3.12).

Η ολική συγκέντρωση Π.Λ.Ο στο περιεχόμενο του τυφλού εντέρου αρσενικών ορνιθίων (Πίνακας 3.3.15) παρουσίασε γραμμική αύξηση (P=0,016) με τη συγκέντρωση του προβιοτικού στο σιτηρέσιο. Η επέμβαση A διέφερε σημαντικά (P ≤0,05) από τις επεμβάσεις C και PL. Η μοριακή αναλογία του προπιονικού οξέος ήταν

χαμηλότερη στις επεμβάσεις PH και A σε σύγκριση με τις επεμβάσεις C και PL. Επίσης, γραμμική αύξηση (P<0,001) παρατηρήθηκε στη μοριακή αναλογία του βουτυρικού οξέος σε συνάρτηση με το επίπεδο χορήγησης προβιοτικού, ενώ η επέμβαση A διέφερε σημαντικά μόνο από την επέμβαση C.

Η ολική συγκέντρωση των Π.Λ.Ο στο περιεχόμενο του τυφλού εντέρου των θηλυκών ορνιθίων (Πίνακας 3.3.16) έλαβε υψηλότερη τιμή στην επέμβαση PL με την αύξηση της συγκέντρωσης του προβιοτικού στο σιτηρέσιο, με την επέμβαση A να διαφέρει σημαντικά (P≤0,05) μόνο από την επέμβαση PL. Η μοριακή αναλογία του προπιονικού οξέος μειώθηκε γραμμικά (P=0,009) σε συνάρτηση με την αύξηση της δόσης του προβιοτικού στο σιτηρέσιο. Η επέμβαση A διέφερε σημαντικά με τις επεμβάσεις του προβιοτικού (PL και PH). Τέλος η μοριακή αναλογία του βουτυρικού παρουσίασε γραμμική αύξηση (P=0,030) με την αύξηση του επίπεδου του προβιοτικού στο σιτηρέσιο, ενώ η επέμβαση A έλαβε μικρότερη τιμή σε σύγκριση με τις επεμβάσεις PL και PH.

Πίνακας 3.3.15 Συγκέντρωση και μοριακή αναλογία Πτητικών Λιπαρών Οξέων στο περιεχόμενο τυφλού εντέρου ορνιθίων ηλικίας 42 ημερών

Πτητικά Λιπαρά Οξέα	Επέμβαση[6]				Φύλο		SEM[7]	Σημαντικότητα		
								Επίδραση		Αλληλεπίδραση
	C	PL	PH	A	Άρρεν	Θήλυ		Επέμβαση	Φύλο	Επέμβαση × φύλο
Ολικά [1,2]	40,09	53,37	53,69	50,83	50,71	48,28	5,874	0,085	0,563	0,004
Οξικό[3]	63,32[b]	58,04[a]	58,82[a]	60,19[ab]	59,62	60,56	1,840	0,035	0,473	0,792
Προπιονικό[3]	10,76[b]	9,43[ab]	8,10[a]	9,18[ab]	9,14	9,60	0,907	0,044	0,479	0,006
Βουτυρικό[3]	17,34[a]	24,97[b]	24,93[b]	22,45[b]	23,37	21,48	1,880	0,001	0,163	0,009
Διακλαδισμένα[3,4]	3,84	3,57	3,87	3,78	3,50	4,04	0,556	0,947	0,173	0,025
Λοιπά[3,5]	4,73	4,00	4,28	4,40	4,38	4,33	0,842	0,858	0,939	0,007

[1]Μέσος όρος μετρήσεων 12 ορνιθίων ανά επέμβαση. Σε κάθε γραμμή, μέσοι όροι με διαφορετικούς εκθέτες (a, b, c) διαφέρουν σημαντικά ($P \leq 0,05$).

[2]Η συγκέντρωση των ολικών πτητικών λιπαρών οξέων μετρήθηκε σε mmol/kg νωπού τυφλικού περιεχομένου.

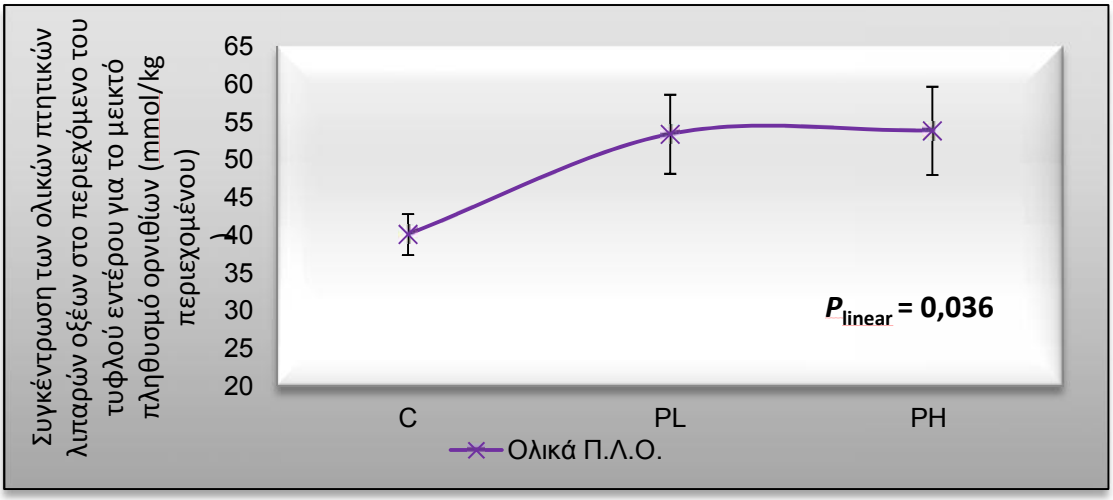
[3]Ο μέσος όρος αναφέρεται στην εκατοστιαία μοριακή αναλογία (συγκέντρωση πτητικών λιπαρών οξέων / συγκέντρωση ολικού όγκου).

[4]Διακλαδισμένα= Ισο-βουτυρικό+Ισο-καπροϊκό+Ισο-βαλερικό.

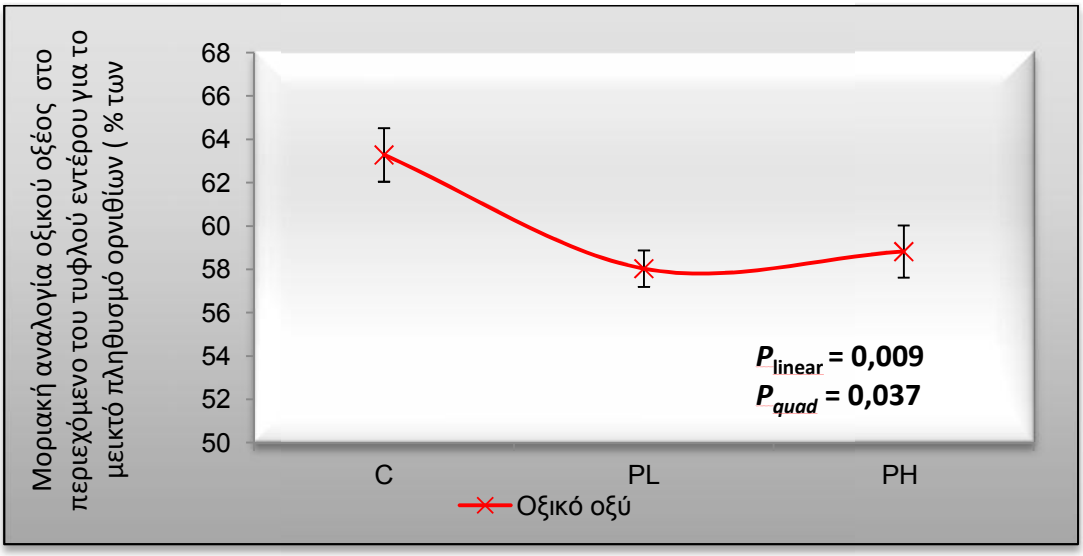
[5]Λοιπά= Καπροϊκό+Βαλερικό+Επτανοϊκό.

[6]C= μάρτυρας, PL= προβιοτικό σε συγκέντρωση 10^8 cfu/kg τροφής, PH= προβιοτικό σε συγκέντρωση 10^9 cfu/kg τροφής, A= αβιλαμυκίνη σε συγκέντρωση 2,5 mg/kg τροφής.

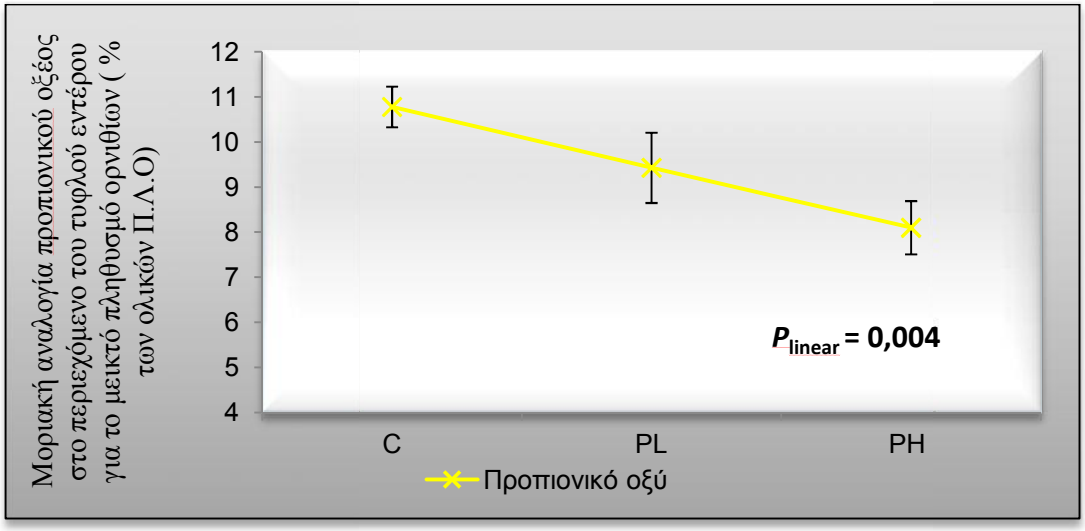
[7]Συγκεντρωτικό τυπικό σφάλμα των μέσων όρων.



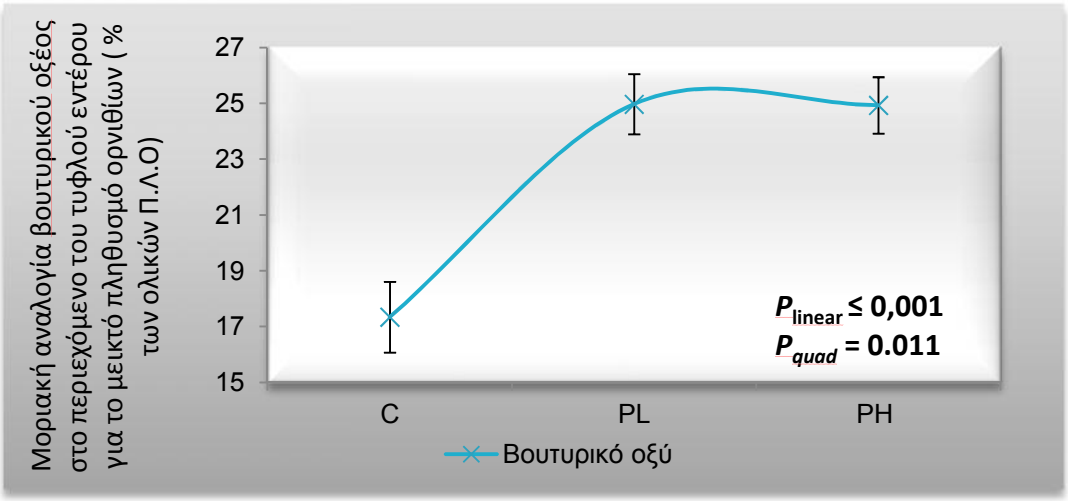
Διάγραμμα 3.3.9 Επίδραση του επιπέδου προσθήκης προβιοτικού στη μοριακή αναλογία οξικού οξέος στο περιεχόμενο του τυφλού εντέρου μεικτού πληθυσμού ορνιθίων. C= μάρτυρας, PL= προβιοτικό σε συγκέντρωση 10^8 cfu/kg τροφής, PH= προβιοτικό σε συγκέντρωση 10^9 cfu/kg τροφής.



Διάγραμμα 3.3.10 Επίδραση του επιπέδου προσθήκης προβιοτικού στη μοριακή αναλογία οξικού οξέος στο περιεχόμενο του τυφλού εντέρου μεικτού πληθυσμού ορνιθίων. C= μάρτυρας, PL= προβιοτικό σε συγκέντρωση 10^8 cfu/kg τροφής, PH= προβιοτικό σε συγκέντρωση 10^9 cfu/kg τροφής.



Διάγραμμα 3.3.11 Επίδραση του επιπέδου προβιοτικού προσθήκης στη μοριακή αναλογία προπιονικού οξέος στο περιεχόμενο του τυφλού εντέρου μεικτού πληθυσμού ορνιθίων. C= μάρτυρας, PL= προβιοτικό σε συγκέντρωση 10^8 cfu/kg τροφής, PH= προβιοτικό σε συγκέντρωση 10^9 cfu/kg τροφής.



Διάγραμμα 3.3.12 Επίδραση του επιπέδου προσθήκης προβιοτικού στη μοριακή αναλογία βουτυρικού οξέος στο περιεχόμενο του τυφλού εντέρου μεικτού πληθυσμού ορνιθίων. C= μάρτυρας, PL= προβιοτικό σε συγκέντρωση 10^8 cfu/kg τροφής, PH= προβιοτικό σε συγκέντρωση 10^9 cfu/kg τροφής.

Πίνακας 3.3.16 Συγκέντρωση και μοριακή αναλογία Πτητικών Λιπαρών οξέων στο περιεχόμενο του τυφλού εντέρου αρσενικών ορνιθίων ηλικίας 42 ημερών.

Πτητικά Λιπαρά Οξέα	Επέμβαση[6]				SEM[7]	Πολυωνυμικές αντιθέσεις[8]	
	C	PL	PH	A		Γραμμική	Τετραγωνική
Ολικά[1,2]	37,60[a]	42,75[a]	61,72[b]	60,77[b]	8,484	0,016	0,384
Οξικό[3]	63,32	56,52	58,28	60,35	2,543	0,065	0,069
Προπιονικό[3]	10,50[b]	10,48[b]	8,57[a]	7,02[a]	1,307	0,163	0,418
Βουτυρικό[3]	16,32[a]	24,32[b]	25,35[b]	27,48[b]	2,195	0,000	0,067
Διακλαδισμένα[3,4]	3,93	3,92	3,65	2,47	0,857	0,766	0,879
Λοιπά[3,5]	5,92	4,75	4,15	2,68	1,464	0,309	0,848

[1]Μέσος όρος μετρήσεων 6 ορνιθίων ανά επέμβαση. Σε κάθε γραμμή, μέσοι όροι με διαφορετικούς εκθέτες (a, b, c) διαφέρουν σημαντικά ($P \leq 0,05$).

[2]Η συγκέντρωση των ολικών πτητικών λιπαρών οξέων μετρήθηκε σε mmol/kg νωπού τυφλικού περιεχομένου.

[3]Ο μέσος όρος αναφέρεται στην εκατοστιαία μοριακή αναλογία (συγκέντρωση πτητικών λιπαρών οξέων / συγκέντρωση ολικού όγκου).

[4]Διακλαδισμένα= Ισο-βουτυρικό+Ισο-καπροϊκό+Ισο-βαλερικό.

[5]Λοιπά= Καπροϊκό+Βαλερικό+Επτανοϊκό.

[6]C= μάρτυρας, PL= προβιοτικό σε συγκέντρωση 10^8 cfu/kg τροφής, PH= προβιοτικό σε συγκέντρωση 10^9 cfu/kg τροφής, A= αβιλαμυκίνη σε συγκέντρωση 2,5 mg/kg τροφής.

[7]Συγκεντρωτικό τυπικό σφάλμα των μέσων όρων.

[8]Οι πολυωνυμικές αντιθέσεις χρησιμοποιήθηκαν για να εξετάσουν τη γραμμική και τετραγωνική επίδραση της προσθήκης του προβιοτικού στο σιτηρέσιο χρησιμοποιώντας τις επεμβάσεις C, PL και PH.

Πίνακας 3.3.17 Συγκέντρωση και μοριακή αναλογία Πτητικών Λιπαρών οξέων στο περιεχόμενο του τυφλού εντέρου θηλυκών ορνιθίων ηλικίας 42 ημερών

Πτητικά Λιπαρά Οξέα	Επέμβαση[6]				SEM[7]	Πολυωνυμικές αντιθέσεις[8]	
	C	PL	PH	A		Γραμμική	Τετραγωνική
Ολικά[1,2]	42,58[a]	63,98[b]	45,67[a]	40,90[a]	8,128	0,727	0,018
Οξικό[3]	63,27	59,57	59,37	60,03	2,660	0,063	0,314
Προπιονικό[3]	11,07[b]	8,37[a]	7,63[a]	11,33[b]	1,258	0,009	0,335
Βουτυρικό[3]	18,37[ab]	25,62[c]	24,52[bc]	17,42[a]	3,054	0,030	0,079
Διακλαδισμένα[3,4]	3,75	3,22	4,08	5,10	0,708	0,625	0,245
Λοιπά[3,5]	3,53	3,25	4,42	6,12	0,831	0,178	0,200

[1]Μέσος όρος μετρήσεων 6 ορνιθίων ανά επέμβαση. Σε κάθε γραμμή, μέσοι όροι με διαφορετικούς εκθέτες (a, b, c) διαφέρουν σημαντικά ($P \leq 0,05$).

[2]Η συγκέντρωση των ολικών πτητικών λιπαρών οξέων μετρήθηκε σε mmol/kg νωπού τυφλικού περιεχομένου.

[3]Ο μέσος όρος αναφέρεται στην εκατοστιαία μοριακή αναλογία (συγκέντρωση πτητικών λιπαρών οξέων / συγκέντρωση ολικού όγκου).

[4]Διακλαδισμένα= Ισο-βουτυρικό+Ισο-καπροϊκό+Ισο-βαλερικό.

[5]Λοιπά= Καπροϊκό+Βαλερικό+Επτανοϊκό.

[6]C=μάρτυρας, PL=προβιοτικό σε συγκέντρωση 10^8 cfu/kg τροφής, PH=προβιοτικό σε συγκέντρωση 10^9 cfu/kg τροφής, A=αβιλαμυκίνη σε συγκέντρωση 2,5 mg/kg τροφής.

[7]Συγκεντρωτικό τυπικό σφάλμα των μέσων όρων.

[8]Οι πολυωνυμικές αντιθέσεις χρησιμοποιήθηκαν για να εξετάσουν τη γραμμική και τετραγωνική επίδραση της προσθήκης του προβιοτικού στο σιτηρέσιο χρησιμοποιώντας τις επεμβάσεις C, PL και PH.

4. Σχολιασμός

Τα προβιοτικά ανήκουν στις πρόσθετες ύλες των ζωοτροφών (European Commission 2003). Η χρήση τους αποτελεί μια διατροφική προσέγγιση σύμφωνα με την οποία, όταν προσλαμβάνονται σε επαρκείς ποσότητες, προάγουν την καλή λειτουργία του γαστρεντερικού οικοσυστήματος και βελτιώνουν την εντερική λειτουργία (Mountzouris *et al.,* 2010). Η διατήρηση και η βελτίωση της λειτουργίας του πεπτικού συστήματος είναι απαραίτητη για την ευζωία και την παραγωγικότητα των ζώων. Ιδιαίτερα μετά την απαγόρευση των αντιβιοτικών ως πρόσθετων στη διατροφή των ζώων στην Ευρωπαϊκή Ένωση η σημασία των προβιοτικών έχει αυξηθεί (Choct 2009). Αναφέρεται ότι, τα προβιοτικά βοηθούν και διατηρούν θετική ισορροπία στην εντερική μικροχλωρίδα που έχει ως αποτέλεσμα τη προάσπιση της υγείας και την αύξηση του σωματικού βάρους στα ορνίθια (Raja *et al.,* 2009).

Η μικροχλωρίδα που αποικίζει τον γαστρεντερικό σωλήνα των θηλαστικών θεωρείται ένα μεταβολικά ενεργό όργανο του σώματος (O'Hara and Shanahan 2006). Σε φυσιολογικές συνθήκες, οι ενδογενείς βακτηριακοί πληθυσμοί αποτελούν ένα ουσιαστικό στοιχείο για την υγεία, με διατροφική και προστατευτική επίδραση επί της εντερικής δομής και ομοιοστασίας. Ο βακτηριακός ανταγωνισμός, η σύνθεση βιταμινών, η μετατροπή προκαρκινικών και καρκινογόνων ουσιών σε ουσίες με μη καρκινογόνο δράση και η διαμόρφωση της ανοσοποιητικής απάντησης αποτελούν μέρος της ωφέλιμης δράσης της ενδογενούς μικροχλωρίδας (Gabriel *et al.,* 2004). Παρόλο που η σύσταση της μικροχλωρίδας είναι σύνθετη και ο ωφέλιμος ρόλος των περισσοτέρων βακτηρίων δεν είναι ακόμα σαφής, βακτηριακά είδη που ανήκουν στα γένη *Lactobacillus* και *Bifidobacterium* έχει αποδειχτεί ότι παρέχουν προστασία έναντι εντερικών μολύνσεων (Gaggia *et al.,* 2010). Γενικά, τα βακτηριακά γένη που ασκούν ευεργετική δράση στην εντερική λειτουργία κατατάσσονται ως ωφέλιμοι μικροοργανισμοί και κάποιοι εντάσσονται στη κατηγορία των προβιοτικών.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να μελετηθεί η επίδραση του επιπέδου προσθήκης ενός προβιοτικού σκευάσματος αποτελούμενο από τρία μικροβιακά στελέχη (*Enterococcus faecium, Bifidobacterium animalis* και *Lactobacillus salivarius*) στη διατροφή παχυνόμενων ορνιθίων επί των συνολικών παραγωγικών

χαρακτηριστικών, της σύστασης και της μεταβολικής δραστηριότητας της εντερικής μικροχλωρίδας.

Εάν και δεν είναι εφικτό να γίνει άμεση σύγκριση διαφορετικών εργασιών όπου έγινε διαιτητική χορήγηση προβιοτικών, εντούτοις τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης όσον αφορά στη βελτίωση του ΣΑΖΒ είναι σε συμφωνία με πολλές εργασίες (Cavazzoni *et al.,* 1998; Huang *et al.,* 2004; Sun *et al.,* 2005; Apata 2008; Mountzouris *et al.,* 2010). Αναλυτικότερα, η ΣΑΖΒ ήταν βελτιωμένη κατά 8,65 % στην επέμβαση PL και κατά 7,5 % στην επέμβαση PH σε σχέση με το μάρτυρα. Η βελτίωση του ΣΑΖΒ στην επέμβαση του αντιβιοτικού δεν διέφερε με την επέμβαση του προβιοτικού σε συγκέντρωση 10^8 cfu/ kg τροφής και ήταν κατά 12,44 % υψηλότερη σε σχέση με το μάρτυρα. Όσον αφορά στο ΣΕ, παρόλο που δεν προέκυψαν σημαντικές διαφορές, ήταν βελτιωμένος κατά 2.6 % για την επέμβαση PL και 1,61 % για την επέμβαση PH σε σύγκριση με την επέμβαση C.

Στη παρούσα εργασία η προσθήκη προβιοτικών στη διατροφή συντέλεσε σε αύξηση των ωφέλιμων βακτηριακών πληθυσμών του γένους *Bifidobacterium* στο περιεχόμενο του τυφλού εντέρου. Συγκεκριμένα υπήρξε γραμμική αύξηση του γένους *Bifidobacterium* με την αύξηση του επιπέδου προσθήκης του προβιοτικού. Γενικά, η προσθήκη προβιοτικών στη διατροφή των ορνιθίων φαίνεται να οδηγεί στη τροποποίηση της σύστασης της εντερικής μικροχλωρίδας. Για παράδειγμα οι Li *et al*. (2009) παρατήρησαν αύξηση ωφέλιμων βακτηρίων (*Lactobacillus* και *Bifidobacterium*) στο περιεχόμενο του τυφλού εντέρου ορνιθίων 42 ημερών σε σχέση με το μάρτυρα μετά από τη χορήγηση προβιοτικού που αποτελούνταν από το είδος *Bacillus cereus* και είδη του γένους *Lactobacillus*. Παρόμοια, οι Mountzouris *et al*. (2007) αναφέρουν ότι, κατά την προσθήκη στο νερό και/ ή στη τροφή ενός πενταστέλεχου προβιοτικού σκευάσματος αυξήθηκε η συγκέντρωση των πληθυσμών *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* και των Gram θετικών κόκκων. Επιπρόσθετα, οι Mountzouris *et al.* (2010) διαπίστωσαν αύξηση των βακτηρίων του γένους *Lactobacillus* και *Bifidobacterium* στην επέμβαση με την υψηλότερη προσθήκη προβιοτικού (π.χ. σε συγκέντρωση 10^{10} cfu/kg τροφής) σε σχέση με το μάρτυρα. Τέλος οι Yu *et al*. (2008) αναφέρουν ότι, η προσθήκη του είδους *Lactobacillus reuteri* Pg4 σε σιτηρέσιο βασισμένο στο κριθάρι επηρέασε τη συγκέντρωση όλων των υπό εξέταση βακτηριακών πληθυσμών (ολικά αερόβια, ολικά αναερόβια, ολικά κολοβακτηρίδια και γαλακτοβάκιλλους) του τυφλού εντέρου.

Δεν σημειώθηκε σημαντική διαφορά στο μεικτό πληθυσμό και στα θηλυκά ορνίθια για τους εξετασθέντες βακτηριακούς πληθυσμούς που προσδιορίστηκαν με την τεχνική της καλλιέργειας. Σε παρόμοια αποτελέσματα κατέληξαν και οι Gerard *et al*., (2008) οι οποίοι δεν παρατήρησαν σημαντική διαφορά στη συγκέντρωση των πληθυσμών, *Lactobacillus spp*., *C. perfrigens και Coliforms* ανάμεσα στο μάρτυρα και στην επέμβαση του προβιοτικού (*Lactobacillus* σε συγκέντρωση $2,7x10^6$ cfu / ml νερού), όταν η μικροβιολογική ανάλυση έγινε με τη μέθοδο της καλλιέργειας στο περιεχόμενο του τυφλού εντέρου ορνιθίων κρεοπαραγωγής 19 ημερών.

Η υψηλή συγκέντρωση βακτηριακών πληθυσμών στο τυφλό έντερο έχει αναφερθεί από πλήθος ερευνών (Chichlowski *et al.,* 2007 a) καθώς, το τυφλό έντερο προσφέρει ιδανικό περιβάλλον για την ανάπτυξη ενός σύνθετου μικροβιακού οικοσυστήματος. Η ανάλυση του περιεχομένου του τυφλού εντέρου με τη χρήση της φθορίζουσας *in situ* υβριδοποίησης (FISH) επιβεβαιώνει την άποψη αυτή. Η ολική βακτηριακή μάζα στο περιεχόμενο του τυφλού εντέρου κυμάνθηκε σε αρκετά υψηλό επίπεδο και συγκεκριμένα σε συγκέντρωση 10^{11} κύτταρα/g εντερικού περιεχομένου, που έρχεται σε συμφωνία με τους Jozefiac *et al*., (2010), Olsen *et al.,* (2008) και Czerwinski *et al.,* (2010). Ανεξαρτήτως επέμβασης και φύλου, από τους επιμέρους πληθυσμούς που ανιχνεύτηκαν, κυρίαρχη ομάδα αποτέλεσε αυτή των *C. coccoides - E. rectale* (Σύμπλεγμα *Clostridium* XIVa και XIVb). Η ποσοτική κυριαρχία αυτών των πληθυσμών υποστηρίζεται από πλήθος ερευνών (Zhu and Joerger 2003; Gerard *et al.,* 2008; Jozefiak *et al.,* 2010).

Πρόσφατη έρευνα αναφέρει ότι το φύλο παίζει σημαντικό ρόλο στη ποικιλομορφία της εντερικής μικροχλωρίδας (Lumpkins *et al.,* 2008). Στο πλαίσιο αυτό, στην παρούσα έρευνα παρατηρήθηκε μεγαλύτερη συγκέντρωση πληθυσμών που ανήκουν στις ομάδες *Clostridium histolyticum, B. fragilis* και στο είδος *Streptococcus* στα αρσενικά ορνίθια σε σύγκριση με τα θηλυκά.

Η χορήγηση του προβιοτικού σε χαμηλή συγκέντρωση στα ορνίθια μείωσε το πληθυσμό του γένους *Clostridium sp.* στο περιεχόμενο του τυφλού εντέρου αρσενικών ορνιθίων. Όμοια, οι Teo και Tan (2007) παρατήρησαν τάση μείωσης ($P<0,1$) στη συγκέντρωση του γένους *Clostridium* μετά από χορήγηση προβιοτικού (*Bacillus subtilis* σε συγκέντρωση $1x10^3$ cfu/g τροφής) όταν ανέλυσαν το περιεχόμενο του ειλεού αρσενικών ορνιθίων 21 ημερών.

Σε γενικές γραμμές η συγκέντρωση των διαφόρων βακτηριακών πληθυσμών που ανιχνεύτηκαν με τη FISH ήταν ψηλότερη από εκείνες που προσδιορίστηκαν με την τεχνική της καλλιέργειας. Η καλλιέργεια σαν μέθοδος χρησιμοποιείται εδώ και δεκαετίες για να ανιχνεύει ζωντανά βακτηριακά κύτταρα. Παρόλα αυτά υπόκειται σε ορισμένα μειονεκτήματα όπως, επιλεκτικότητα των θρεπτικών μέσων, καταπόνηση των μικροοργανισμών κατά τη διαδικασία της ανάλυσης και δυσκολία να διατηρηθούν αυστηρώς αναερόβιες συνθήκες (Zoetendal *et al.,* 2004). Συνεπώς, τα αποτελέσματα που λαμβάνουμε από τη μέθοδο αυτή, υποδεικνύουν πόσα βακτηριακά κύτταρα μπορούν να ανιχνευτούν κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες ανάπτυξης με τη μορφή αποικιών. Η ανάλυση FISH προσδιορίζει βακτηριακούς πληθυσμούς μέσω της ανίχνευσης του 16S rRNA. Στη περίπτωση αυτή νεκρά βακτηριακά κύτταρα μπορεί να περιέχουν υπολείμματα rRNA και παρόλο που η ένταση του φθορίζοντος σήματος είναι πιθανό να μειώνεται μετά το κυτταρικό θάνατο ίσως αυτό να παραμένει αρκετά δυνατό έτσι ώστε να είναι οπτικά ορατά κατά την καταμέτρηση (Lahtinen *et al.,* 2006). Εν κατακλείδι η κάθε αναλυτική μέθοδος έχει ιδιαιτερότητες που επηρεάζουν και το τελικό αποτέλεσμα. Όσον αφορά το φυσιολογικό ρόλο των προβιοτικών, πρόσφατες έρευνες αναφέρουν τη σημασία των νεκρών προβιοτικών κυττάρων, τα οποία μπορούν να προκαλέσουν μεγάλη ποικιλία βιολογικών απαντήσεων, οι οποίες αφορούν κυρίως την ανοσολογική τους δράση (Adams 2010).

Ο προσδιορισμός των πτητικών λιπαρών οξέων αποτελεί έναν τρόπο για να ελεγχθεί η αλλαγή στο μικροβιακό μεταβολικό προφίλ . Όπως είναι γνωστό, τα πτητικά λιπαρά οξέα είναι τελικά προϊόντα μεταβολισμού των βακτηρίων. Το γεγονός όμως ότι τα μεταβολικά προϊόντα του ενός είδους μπορεί να χρησιμοποιηθεί από ένα άλλο είδος καθιστά τη βακτηριακή ζύμωση μια πολύπλοκη διαδικασία (Rehman *et al.,* 2007 a).

Ανεξάρτητα επέμβασης, η συγκέντρωση των ολικών πτητικών λιπαρών οξέων στο περιεχομένου του τυφλού εντέρου στην παρούσα πειραματική μελέτη είναι σύμφωνες με προηγούμενες έρευνες οι οποίες πραγματοποιήθηκαν σε παχυνόμενα ορνίθια (Mountzouris *et al.,* 2007; Czerwinski *et al.,* 2010). Το οξικό οξύ αποτέλεσε το κυριότερο προϊόν της βακτηριακής μεταβολικής δραστηριότητας καθότι η μοριακή του αναλογία ήταν υψηλότερη σε σχέση με τα υπόλοιπα Π.Λ.Ο (Rehman *et al.,* 2007 b). Η χορήγηση προβιοτικών συντέλεσε σε τάση αύξησης ($P<0,1$) των Π.Λ.Ο στο μεικτό πληθυσμό η οποία έγινε σημαντική ($P<0,05$) στα αρσενικά και στα θηλυκά ορνίθια. Η

αυξημένη συγκέντρωση πτητικών λιπαρών οξέων συνδέεται με τη μείωση βακτηρίων που ανήκουν στην οικογένεια *Enterobacteriaceae* (Van der Wielen *et al.,* 2000).

Η μοριακή αναλογία του βουτυρικού οξέος ήταν αυξημένη στις επεμβάσεις του προβιοτικού σε σχέση με το μάρτυρα. Το βουτυρικό οξύ θεωρείται σημαντικό για την φυσιολογική ανάπτυξη των επιθηλιακών κυττάρων του παχέος εντέρου. Παράλληλα φαίνεται να έχει βακτηριοστατική δράση και να διεγείρει την ανάπτυξη των λαχνών του εντέρου (Leeson *et al.,* 2005). Επίσης έχει αναφερθεί ότι, η αύξηση του βουτυρικού οξέος συνδέεται με την αύξηση του γένους *Bifidobacterium* διότι, θεωρείται ότι τα τελευταία διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό βακτηρίων που παράγουν βουτυρικό οξύ (Van Immerseel *et al.,* 2006). Παρόλα αυτά δεν μπορεί να επιβεβαιωθεί ένας τέτοιος ισχυρισμός στη παρούσα εργασία, διότι η αύξηση της μοριακής αναλογίας του βουτυρικού οξέος αφορούσε εκτός από τις επεμβάσεις του προβιοτικού και την επέμβαση του αντιβιοτικού στην οποία σημειώθηκαν σημαντικά χαμηλότερες συγκεντρώσεις βακτηρίων του γένους *Bifidobacterium* σε σύγκριση με τις επεμβάσεις του προβιοτικού.

Ε. Συμπεράσματα

- Η χορήγηση των προβιοτικών στη διατροφή κρεοπαραγωγών ορνιθίων επηρέασε θετικά την ανάπτυξη, βελτιώνοντας τη συνολική αύξηση του ζώντος βάρους. Η επίδραση του προβιοτικού συγκέντρωσης 10^8 CFU/kg τροφής στη ΣΑΖΒ ήταν παρόμοια με αυτή του αντιβιοτικού.

- Τα προβιοτικά συντέλεσαν στην αύξηση του πληθυσμού του γένους *Bifidobacterium* στο περιεχόμενο του τυφλού εντέρου ορνιθίων κρεοπαραγωγής ηλικίας 42 ημερών. Επιπροσθέτως, η συγκέντρωση του γένους *Bifidobacterium* αυξήθηκε γραμμικά με το επίπεδο προσθήκη του προβιοτικού στο σιτηρέσιο.

- Η συγκέντρωση των ολικών Π.Λ.Ο αυξήθηκε στο περιεχόμενο του τυφλού εντέρου αρσενικών και θηλυκών ορνιθίων με το επίπεδο προσθήκης του προβιοτικού στο σιτηρέσιο

- Η μοριακή αναλογία του προπιονικού οξέος μειώθηκε μετά από τη χορήγηση προβιοτικών σε όλους τους υπό εξέταση πληθυσμούς.

- Η προσθήκη προβιοτικών είχε γραμμική επίδραση στη μοριακή αναλογία του βουτυρικού οξέος στο περιεχόμενο του τυφλού εντέρου αρσενικών και θηλυκών ορνιθίων.

- Το φύλο είχε σημαντική επίδραση επί των παραμέτρων που μελετήθηκαν.

Συμπερασματικά, το υπό εξέταση προβιοτικό επηρέασε θετικά την ανάπτυξη, τη σύσταση και τη μεταβολική δραστηριότητα της εντερική μικροχλωρίδας ορνιθίων κρεοπαραγωγής. Περαιτέρω έρευνα κρίνεται ως αναγκαία έτσι ώστε να διερευνηθεί λεπτομερώς ο μηχανισμός που τα προβιοτικά δρουν και επηρεάζουν το εντερικό οικοσύστημα. Επιπρόσθετα, εξίσου σημαντική για την έρευνα που αφορά στη λειτουργία των πρόσθετων υλών είναι η πλήρης περιγραφή της σύστασης και της

λειτουργίας της εντερικής μικροχλωρίδας καθώς και η αλληλεπίδραση της με τον ξενιστή.

ΣΤ. Βιβλιογραφία

Adams, C. A. 2010. The probiotic paradox: live and dead cells are biological response modifiers. Nutrition research reviews 23:37-46.

Amann, R., B. Binder, R. Olson, S. Chisholm, R. Devereux and D. Stahl. 1990. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. Applied and Environmental Microbiology 56:1919-1925.

Amann, R., B. Fuchs and S. Behrens. 2001. The identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridisation. Current Opinion in Biotechnology 12:231-236.

Amann, R., W. Ludwig and K. Schleifer. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiology and Molecular Biology Reviews 59:143-169.

Apajalahti, J. 2005. Comparative Gut Microflora, Metabolic Challenges, and Potential Opportunities. The Journal of Applied Poultry Research 14:444-453.

Apajalahti, J., A. Kettunen and H. Graham. 2004. Characteristics of the gastrointestinal microbial communities, with special reference to the chicken. World's Poultry Science Journal 60:223-232.

Apata, D. F. 2008. Growth performance, nutrient digestibility and immune response of broiler chicks fed diets supplemented with a culture of Lactobacillus bulgaricus. Journal of the Science of Food and Agriculture 88:1253-1258.

Applegate, T., V. Klose, T. Steiner, A. Ganner and G. Schatzmayr. 2010. Probiotics and phytogenics for poultry: Myth or reality? 1. The Journal of Applied Poultry Research 19:194-210.

Bjerrum, L., R. Engberg, T. Leser, B. Jensen, K. Finster and K. Pedersen. 2006. Microbial community composition of the ileum and cecum of broiler chickens as revealed by molecular and culture-based techniques. Poultry science 85:1151-1164.

Blaut, M., M. Collins, G. Welling, J. Dore, J. Van Loo and W. De Vos. 2002. Molecular biological methods for studying the gut microbiota: the EU human gut flora project. British Journal of Nutrition 87:203-211.

Bouzaine, T., R. Dauphin, P. Thonart, M. Urdaci and M. Hamdi. 2005. Adherence and colonization properties of Lactobacillus rhamnosus TB1, a broiler chicken isolate. Letters in Applied Microbiology 40:391-396.

Brown, M. 2011. Modes of Action of Probiotics: Recent Developments. Journal of Animal and Veterinary Advances 10:1895-1900.

Cavazzoni, V., A. Adami and C. Castrovilli. 1998. Performance of broiler chickens supplemented with Bacillus coagulans as probiotic. British Poultry Science 39:526-529.

Chichlowski, M., J. Croom, B. McBride, G. Havenstein and M. Koci. 2007 a. Metabolic and physiological impact of probiotics or direct-fed-microbials on poultry: a brief review of current knowledge. International Journal of Poultry Science 6:694-704.

Chichlowski, M., W. Croom, F. Edens, B. McBride, R. Qiu, C. Chiang, L. Daniel, G. Havenstein and M. Koci. 2007 b. Microarchitecture and spatial relationship between bacteria and ileal, cecal, and colonic epithelium in chicks fed a direct-fed microbial, PrimaLac, and salinomycin. Poultry Science 86:1121-1132.

Choct, M. 2009. Managing gut health through nutrition. British Poultry Science 50:9-15.

Collado, M. and Y. Sanz. 2007. Characterization of the Gastrointestinal MucosaAssociated Microbiota of Pigs and Chickens Using Culture-Based and Molecular Methodologies. Journal of Food Protection 70:2799-2804.

Cross, M. 2002. Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. FEMS Immunology and Medical Microbiology 34:245-253.

Czerwinski, J., O. H jberg, S. Smulikowska, R. M. Engberg and A. Mieczkowska. 2010. Influence of dietary peas and organic acids and probiotic supplementation on performance and caecal microbial ecology of broiler chickens. British Poultry Science 51:258-269.

Dibner, J. and J. Richards. 2005. Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. Poultry Science 84:634-643.

Dibner, J., J. Richards and C. Knight. 2008. Microbial imprinting in gut development and health. The Journal of Applied Poultry Research 17:174-188.

Dumonceaux, T., J. Hill, S. Hemmingsen and A. Van Kessel. 2006. Characterization of intestinal microbiota and response to dietary virginiamycin supplementation in the broiler chicken. Applied and Environmental Microbiology 72:2815-2823.

Dunham, H., William, F. Edens, I. Casas and W. Dobrogosz. 1993. Lactobacillus reuteri immunomodulation of stressor-associated diseases in newly hatched chickens and turkeys'. Poultry Science 72:103-103.

European Commission. 2003. Regulation 1831 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition. Official Journal of the European Union L 268/29.

Ewing, W. and D. Cole (1994). The Living Gut: An Introduction to Micro-organisms in Nutrition, Context Dungannon, Co. Tyrone, N.(Ireland).

Franks, A., H. Harmsen, G. Raangs, G. Jansen, F. Schut and G. Welling. 1998. Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent in situ hybridization with group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. Applied and Environmental Microbiology 64:3336-3347.

Gabriel, I., M. Lessire, S. Mallet and J. Guillot. 2006. Microflora of the digestive tract: critical factors and consequences for poultry. World's Poultry Science Journal 62:499-511.

Gaggia, F., P. Mattarelli and B. Biavati. 2010. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. International Journal of Food Microbiology 141:S15-S28.

Gerard, P., C. Brezillon, F. Quere, A. Salmon and S. Rabot. 2008. Characterization of cecal microbiota and response to an orally administered lactobacillus probiotic strain in the broiler chicken. Journal of molecular microbiology and biotechnology 14:115-122.

Gong, J., R. Forster, H. Yu, J. Chambers, P. Sabour, R. Wheatcroft and S. Chen. 2002. Diversity and phylogenetic analysis of bacteria in the mucosa of chicken ceca and comparison with bacteria in the cecal lumen. FEMS microbiology letters 208:1-7.

Gong, J., W. Si, R. Forster, R. Huang, H. Yu, Y. Yin, C. Yang and Y. Han. 2007. 16S rRNA gene-based analysis of mucosa-associated bacterial community and phylogeny in the chicken gastrointestinal tracts: from crops to ceca. FEMS microbiology ecology 59:147-157.

Guan, L., K. Hagen, G. Tannock, D. Korver, G. Fasenko and G. Allison. 2003. Detection and identification of Lactobacillus species in crops of broilers of different ages by using PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and amplified ribosomal DNA restriction analysis. Applied and Environmental Microbiology 69:6750-6757.

Haghighi, H., J. Gong, C. Gyles, M. Hayes, H. Zhou, B. Sanei, J. Chambers and S. Sharif. 2006. Probiotics Stimulate Production of Natural Antibodies in Chickens. Clinical and Vaccine Immunology 13:975-980.

Harmsen, H., P. Elfferich, F. Schut and G. Welling. 1999. A 16S rRNA-targeted probe for detection of lactobacilli and enterococci in faecal samples by fluorescent in situ hybridization. Microbial Ecology in Health and Disease 11:3-12.

Harrow, S. A., V. Ravindran, R. C. Butler, J. W. Marshall and G. W. Tannock. 2007. Real-time quantitative PCR measurement of ileal Lactobacillus salivarius populations from broiler chickens to determine the influence of farming practices. Applied and Environmental Microbiology 73:7123-7127.

Huang, M., Y. Choi, R. Houde, J. Lee, B. Lee and X. Zhao. 2004. Effects of Lactobacilli and an acidophilic fungus on the production performance and immune responses in broiler chickens. Poultry Science 83:788-795.

Hume, M., L. Kubena, T. Edrington, C. Donskey, R. Moore, S. Ricke and D. Nisbet. 2003. Poultry digestive microflora biodiversity as indicated by denaturing gradient gel electrophoresis. Poultry science 82:1100-1107.

Jin, L., Y. Ho, N. Abdullah and S. Jalaludin. 1997. Probiotics in poultry: modes of action. World's Poultry Science Journal 53:351-368.

Joerger, R. 2003. Alternatives to antibiotics: bacteriocins, antimicrobial peptides and bacteriophages. Poultry Science 82:640-647.

Jozefiak, D., A. Rutkowski, S. Kaczmarek, B. Jensen, R. Engberg and O. H jberg. 2010. Effect of β-glucanase and xylanase supplementation of barley-and rye-based diets on caecal microbiota of broiler chickens. British poultry science 51:546-557.

Jozefiak, D., A. Rutkowski and S. Martin. 2004. Carbohydrate fermentation in the avian ceca: a review. Animal Feed Science and Technology 113:1-15.

Kabir, S. 2009. The role of probiotics in the poultry industry. International Journal of Molecular Sciences 10:3531-3546.

Kabir, S., M. Rahman, M. Rahman, M. Hosain, M. Akand and S. Das. 2005. Viability of Probiotics in Balancing Intestinal Flora and Effecting Histological Changes of Crop and Caecal Tissues of Broilers. Biotechnology 4: 325-330.

Lahtinen, S. J., M. Gueimonde, A. C. Ouwehand, J. P. Reinikainen and S. J. Salminen. 2006. Comparison of four methods to enumerate probiotic bifidobacteria in a fermented food product. Food microbiology 23:571-577.

Lan, P., T. Binh and Y. Benno. 2003. Impact of two probiotic Lactobacillus strains feeding on fecal lactobacilli and weight gains in chicken. The Journal of General and Applied Microbiology 49:29-36

Lan, P., M. Sakamoto and Y. Benno. 2004. Effects of two probiotic Lactobacillus strains on jejunal and cecal microbiota of broiler chicken under acute heat stress condition as revealed by molecular analysis of 16S rRNA genes. Microbiology and immunology 48:917-929.

Langendijk, P., F. Schut, G. Jansen, G. Raangs, G. Kamphuis, M. Wilkinson and G. Welling. 1995. Quantitative fluorescence in situ hybridization of Bifidobacterium spp. with genus-specific 16S rRNA-targeted probes and its application in fecal samples. Applied and Environmental Microbiology 61:3069-3075.

Leeson, S., H. Namkung, M. Antongiovanni and E. Lee. 2005. Effect of butyric acid on the performance and carcass yield of broiler chickens. Poultry Science 84:1418-1422.

Li, S., X. Zhao and J. Wang. 2009. Synergy of Astragalus polysaccharides and probiotics (Lactobacillus and Bacillus cereus) on immunity and intestinal microbiota in chicks. Poultry Science 88:519-525.

Lu, J., U. Idris, B. Harmon, C. Hofacre, J. Maurer and M. Lee. 2003. Diversity and succession of the intestinal bacterial community of the maturing broiler chicken. Applied and Environmental Microbiology 69:6816-6824.

Lumpkins, B., A. Batal and M. Lee. 2008. The Effect of Gender on the Bacterial Community in the Gastrointestinal Tract of Broilers. Poultry Science 87:964-967.

Mackie, R. and I. Cann. 2005. A review of gastrointestinal microbiology with special emphasis on molecular microbial ecology approaches. Applications of Gene-Based Technologies for Improving Animal Production and Health in Developing Countries175-198.

Mead, G. C. (2005). Food safety control in the poultry industry, CRC.

Moter, A. and U. Gobel. 2000. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. Journal of Microbiological Methods 41:85-112.

Mountzouris, K., C. Balaskas, F. Fava, K. Tuohy, G. Gibson and K. Fegeros. 2006. Profiling of composition and metabolic activities of the colonic microflora of growing pigs fed diets supplemented with prebiotic oligosaccharides. Anaerobe 12:178-185.

Mountzouris, K., P. Tsirtsikos, E. Kalamara, S. Nitsch, G. Schatzmayr and K. Fegeros. 2007. Evaluation of the Efficacy of a Probiotic Containing Lactobacillus, Bifidobacterium, Enterococcus, and Pediococcus Strains in Promoting Broiler Performance and Modulating Cecal Microflora Composition and Metabolic Activities. Poultry Science 86:309-317.

Mountzouris, K., P. Tsitrsikos, I. Palamidi, A. Arvaniti, M. Mohnl, G. Schatzmayr and K. Fegeros. 2010. Effects of probiotic inclusion levels in broiler nutrition on growth performance, nutrient digestibility, plasma immunoglobulins, and cecal microflora composition. Poultry Science 89:58-67.

Musa, H., S. Wu, C. Zhu, H. Seri and G. Zhu. 2009. The potential benefits of probiotics in animal production and health. J. Anim. Vet. Adv 8:313-321.

Nava, G., M. Attene-Ramos, H. Gaskins and J. Richards. 2009. Molecular analysis of microbial community structure in the chicken ileum following organic acid supplementation. Veterinary Microbiology 137:345-353.

Nava, G., L. Bielke, T. Callaway and M. Castapeda. 2007. Probiotic alternatives to reduce gastrointestinal infections: the poultry experience. Animal Health Research Reviews 6:105-118.

Neef, A., R. Amann and K. H. Schleifer. 1995. Detection of microbial cells in aerosols using nucleic acid probes. Systematic and applied microbiology 18:113-122.

Ng, S. C., A. L. Hart, M. A. Kamm, A. J. Stagg and S. C. Knight. 2009. Mechanisms of action of probiotics: Recent advances. Inflammatory Bowel Diseases 15:300-310.

Niba, A., J. Beal, A. Kudi and P. Brooks. 2009. Bacterial fermentation in the gastrointestinal tract of non-ruminants: Influence of fermented feeds and fermentable carbohydrates. Tropical animal health and production 41:1393-1407.

O'Hara, A. M. and F. Shanahan. 2006. The gut flora as a forgotten organ. EMBO reports 7:688-693.

Ohashi, Y. and K. Ushida. 2009. Health beneficial effects of probiotics: Its mode of action. Animal Science Journal 80:361-371.

Olsen, K., M. Henriksen, M. Bisgaard, O. Nielsen and H. Christensen. 2008. Investigation of chicken intestinal bacterial communities by 16S rRNA targeted fluorescence in situ hybridization. Antonie van Leeuwenhoek 94:423-437.

Oviedo-Rondon, E. 2009. Molecular methods to evaluate effects of feed additives and nutrients in poultry gut microflora. Revista Brasileira de Zootecnia 38:209-225.

Oviedo-Rondon, E. O., M. E. Hume, N. A. Barbosa, N. K. Sakomura, G. Weber and J. W. Wilson. 2010. Ileal and caecal microbial populations in broilers given specific essential oil blends and probiotics in two consecutive grow-outs. Avian Biology Research 3:157-169.

Perry, G. C. (2006). Avian gut function in health and disease, CABI Publishing.

Raja, M. M. M., A. Raja and M. M. Imran. 2009. Lactobacillus as a Probiotic Feed for Chickens. International Journal of Poultry Science 8:763-767.

Rehman, H., J. Bohm and J. Zentek. 2007 a. Effects of differentially fermentable carbohydrates on the microbial fermentation profile of the gastrointestinal tract of broilers. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition 92:471-480.

Rehman, H., W. Vahjen, W. Awad and J. Zentek. 2007 b. Indigenous bacteria and bacterial metabolic products in the gastrointestinal tract of broiler chickens. Arch Anim Nutr 61:319-335.

Salminen, S., A. von Wright and A. Ouwehand (2004). Lactic Acid Bacteria: Microbiological And Functional Aspects, CRC Press.

Smirnov, A., R. Perez, E. Amit-Romach, D. Sklan and Z. Uni. 2005. Mucin dynamics and microbial populations in chicken small intestine are changed by dietary probiotic and antibiotic growth promoter supplementation. The Journal of nutrition 135:187-192.

Soccol, C. R., L. P. De Souza Vandenberghe, M. R. Spier, A. B. P. Medeiros, C. T. Yamaguishi, J. D. D. Lindner, A. Pandey and V. Thomaz-Soccol. 2010. The Potential of Probiotics: A Review. Food technology and biotechnology 48:413-434.

Sun, X., A. McElroy, K. Webb, Jr, A. Sefton and C. Novak. 2005. Broiler performance and intestinal alterations when fed drug-free diets. Poult Sci 84:1294-1302.

Tanikawa, T., N. Shoji, N. Sonohara, S. Saito, Y. Shimura, J. Fukushima and T. Inamoto. 2011. Aging transition of the bacterial community structure in the chick ceca. Poultry Science 90:1004-1008.

Tellez, G., S. Higgins, A. Donoghue and B. Hargis. 2006. Digestive Physiology and the Role of Microorganisms. The Journal of Applied Poultry Research 15:136-144.

Teo, A. and H. M. Tan. 2007. Evaluation of the performance and intestinal gut microflora of broilers fed on corn-soy diets supplemented with Bacillus subtilis PB6 (CloSTAT). The Journal of Applied Poultry Research 16:296-303.

Thompson, K. L. and T. J. Applegate. 2005. Nutrients, nutritional state and small intestinal microbiota. Carolina Poultry Nutrition Conference Proceedings 23-37.

Thongsong, B., S. Kalandakanond-Thongsong and V. Chavananikul. 2008. Effects of the addition of probiotic containing both bacteria and yeast or an antibiotic on performance parameters, mortality rate and antibiotic residue in broilers. Board of Reviewing Editors 38:17-26.

Timmerman, H., C. Koning, L. Mulder, F. Rombouts and A. Beynen. 2004. Monostrain, multistrain and multispecies probiotics—A comparison of functionality and efficacy. International Journal of Food Microbiology 96:219-233.

Torok, V., K. Ophel-Keller, M. Loo and R. Hughes. 2008. Application of methods for identifying broiler chicken gut bacterial species linked with increased energy metabolism. Applied and Environmental Microbiology 74:783-791.

Trebesius, K., L. Leitritz, K. Adler, S. Schubert, I. Autenrieth and J. Heesemann. 2000. Culture independent and rapid identification of bacterial pathogens in necrotising fasciitis and streptococcal toxic shock syndrome by fluorescence in situ hybridisation. Medical microbiology and immunology 188:169-175.

Tuohy, K., C. Ziemer, A. Klinder, Y. Knφbel, B. Pool-Zobel and G. Gibson. 2002. A Human Volunteer Study to Determine the Prebiotic Effects of Lactulose Powder on Human Colonic Microbiota. Microbial Ecology in Health and Disease 14:165-173.

Van der Wielen, P., S. Biesterveld, S. Notermans, H. Hofstra, B. Urlings and F. van Knapen. 2000. Role of Volatile Fatty Acids in Development of the Cecal Microflora in Broiler Chickens during Growth. Applied and Environmental Microbiology 66:2536-2540.

Van Immerseel, F., J. Russell, M. Flythe, I. Gantois, L. Timbermont, F. Pasmans, F. Haesebrouck and R. Ducatelle. 2006. The use of organic acids to combat Salmonella in poultry: a mechanistic explanation of the efficacy. Avian Pathology 35:182-188.

Vidanarachchi, J., A. Elangovan, L. Mikkelsen, M. Choct and P. Iji. 2010. Effect of some plant extracts on growth performance, intestinal morphology, microflora composition and activity in broiler chickens. Animal Production Science 50:880-889.

Walter, J. 2008. The ecological role of lactobacilli in the gastrointestinal tract: Implications for fundamental and biomedical research. Applied and Environmental Microbiology 74: 4985–4996.

Wise, M. and G. Siragusa. 2007. Quantitative analysis of the intestinal bacterial community in one-to three-week-old commercially reared broiler chickens fed conventional or antibiotic-free vegetable-based diets. Journal of applied microbiology 102:1138-1149.

Wise, M. G. and G. R. Siragusa. 2005. Quantitative detection of Clostridium perfringens in the broiler fowl gastrointestinal tract by real-time PCR. Applied and Environmental Microbiology 71:3911-3916.

Wise, M. G. and G. R. Siragusa. 2007. Quantitative analysis of the intestinal bacterial community in one- to three-week-old commercially reared broiler chickens fed conventional or antibiotic-free vegetable-based diets. J Appl Microbiol 102:1138-49.

Yin, Y., F. Lei, L. Zhu, S. Li, Z. Wu, R. Zhang, G. F. Gao, B. Zhu and X. Wang. 2009. Exposure of different bacterial inocula to newborn chicken affects gut microbiota development and ileum gene expression. The ISME Journal 4:367-376.

Yu, B., J. Liu, F. Hsiao and P. Chiou. 2008. Evaluation of Lactobacillus reuteri Pg4 strain expressing heterologous [beta]-glucanase as a probiotic in poultry diets based on barley. Animal Feed Science and Technology 141:82-91.

Zhou, H., J. Gong, J. Brisbin, H. Yu, B. Sanei, P. Sabour and S. Sharif. 2007. Appropriate chicken sample size for identifying the composition of broiler intestinal microbiota affected by dietary antibiotics, using the polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis technique. Poultry science 86:2541-2549.

Zhu, X. and R. Joerger. 2003. Composition of microbiota in content and mucus from cecae of broiler chickens as measured by fluorescent in situ hybridization with group-specific, 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. Poultry science 82:1242-1249.

Zhu, X., T. Zhong, Y. Pandya and R. Joerger. 2002. 16S rRNA-based analysis of microbiota from the cecum of broiler chickens. Applied and Environmental Microbiology 68:124-137.

Ziprin, R., R. Beier, S. Pillai and T. Phillips (2004). Preharvest and Postharvest Food Safety: Contemporary Issues and Future Directions.

Zoetendal, E., C. Collier, S. Koike, R. Mackie and H. Gaskins. 2004. Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota: a review. Journal of Nutrition 134:465-472.

Zwirglmaier, K. 2005. Fluorescence in situ hybridisation (FISH)–the next generation. FEMS microbiology letters 246:151-158.