

Vplyv rôznych koncentrácií humínových látok na mikrobiálnu populáciu črevného obsahu u brojlerových kurčiat

Alena Hreško Šamudovská¹

Michaela Harčárová²

Stanislav Hreško³

Andrej Marcin⁴

Lukáš Bujňák⁵

¹ Katedra výživy a chovu zvierat, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach; Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika; alena.hreskosamudovska@uvlf.sk

² Katedra výživy a chovu zvierat, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach; Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika; michaela.harcarova@uvlf.sk

³ Katedra výživy a chovu zvierat, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach; Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika; stanislav.hresko@uvlf.sk

⁴ Katedra výživy a chovu zvierat, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach; Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika; andrej.marcin@uvlf.sk

⁵ Katedra výživy a chovu zvierat, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach; Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika; lukas.bujnak@uvlf.sk

Grant: VEGA č. 1/0698/24

Název grantu: Sledovanie účinku kŕmnych doplnkových látok prírodného pôvodu a alternatívnych kŕmnych komponentov na produkciu a zdravie monogastrických zvierat

Oborové zamčrení: GH - Výživa hospodárskych zvierat

© GRANT Journal, MAGNANIMITAS Assn.

Abstrakt Cieľom tejto štúdie bolo zhodnotenie vplyvu humínových látok na črevnú mikrobiotu na základe stanovenia počtu baktérií mliečneho kvasenia a enterobaktérií v obsahu slepých čriev brojlerových kurčiat. Deväťdesiat 1-dňových brojlerových kurčiat (hybrid Ross 308) bolo rozdelených do troch skupín. Humínové látky boli pridávané do kŕmnych zmesí pokusných skupín v množstve 6 alebo 9 g/kg v priebehu celého pokusného obdobia. Podávanie humínových látok vo vyššom množstve viedlo k signifikantnému zníženiu počtu enterobaktérií a pomeru počtu enterobaktérií k počtu baktérií mliečneho kvasenia v obsahu slepých čriev v porovnaní s kontrolnou skupinou ($P < 0,05$). Na základe výsledkov tejto štúdie je možné konštatovať, že humínové látky sú schopné modulovať črevnú mikrobiotu v prospech hostiteľa.

Kľúčové slova Hydina, prírodné kŕmne aditíva, črevná mikrobiota

1. ÚVOD

V posledných rokoch sa vo výskume v oblasti výživy hydiny zvýšil záujem o látky prírodného pôvodu, ktoré by boli vhodnou a bezpečnou alternatívou za antibiotické stimulatory rastu, keďže ukončením ich používania (v EÚ od roku 2006) sa zvýšil výskyt črevných problémov, ktoré negatívne ovplyvňujú úžitkovosť zvierat a ekonomiku chovu (Abd El-Hack a kol., 2022). Jednou z takýchto možných alternatív sú aj humínové látky vznikajúce degradáciou rastlinných a živočíšnych zvyškov. Sú to organické zlúčeniny, ktoré sa bežne vyskytujú v pôde, rašeline, lignite, hnedom uhli, odpadových vodách, prírodných vodách a ich sedimentoch. Ich hlavnými zložkami sú humínové, fulvové a ulmové kyseliny (Stevenson 1994).

Existuje celý rad vedeckých publikácií, v ktorých sa popisuje možný pozitívny vplyv podávania humínových látok na produkčné parametre u hydiny (Abdel-Mageed 2012, Taklimi a kol. 2012, Mirnawati a Marlida 2013, Marcinčáková a kol. 2015, Arif a kol. 2016, ELnaggar a El-Kelawy 2018, Hammod a kol. 2021). Okrem zvýšenia intenzity rastu zvierat, zlepšenia konverzie krmiva, zvýšenia jatočnej výťažnosti bolo zaznamenané aj zníženie mortality. Na objasnenie pozorovaného pozitívneho vplyvu podávania humínových látok bolo navrhnutých niekoľko mechanizmov účinku, zahrňujúc inhibíciu rastu patogénnych baktérií a stabilizáciu črevnej mikroflóry (Agboola a kol. 2021, Omidwura a kol. 2022). Z výsledkov rôznych štúdií však vyplýva, že účinok humínových látok môže byť variabilný v závislosti od ich zloženia a podávaného množstva, ako aj od spôsobu ich aplikácie (do krmiva alebo do vody) alebo druhu použitých zvierat.

Keďže ovplyvnenie črevného zdravia je jednou z možností ovplyvnenia celkového zdravotného stavu a následne zlepšenia produkcie zvierat, cieľom tejto štúdie bolo zhodnotenie prípadných zmien v počtoch baktérií mliečneho kvasenia a enterobaktérií v obsahu slepých čriev brojlerových kurčiat po prídavku humínových látok (HUMAC MycotoxiSorb) v rôznej koncentrácii do krmiva.

2. MATERIÁL A METODIKA

Do 6-týždňového pokusu bolo zaradených 90 kusov nesexovaných jednodňových brojlerových kurčiat úžitkového hybridu Ross 308, ktoré boli náhodne rozdelené do troch skupín (kontrolnej a dvoch pokusných; $n = 30$). Vo všetkých skupinách boli kurčatá individuálne odvážené a označené identifikačným krúžkom.

Ustajnené boli na hlbokoj podstielke pri dodržaní štandardných podmienok prostredia (s kontrolovanou teplotou a vlhkosťou).

Kurčatá boli v priebehu pokusu kŕmené komerčne vyrábanymi kompletnými kŕmnymi zmesami (Tomáš spol. s r. o., Dolná Ždaňa, Slovenská republika) na báze pšenice, sójového extrahovaného šrotu, kukurice a repkového extrahovaného šrotu podľa rastových fáz: štartérová 1. – 2. týždeň, rastová 3. – 5. týždeň, finálna 6. týždeň. V pokusných skupinách boli k uvedeným kŕmny zmesiam pridané humínové látky (HUMAC MycotoxiSorb; Humac s.r.o, Košice, Slovensko; veľkosť častíc do 200 µm, pH 5,8; vlhkosť max. 21 %, humínové kyseliny min. 65 % a fulvové kyseliny 5 % v sušine): v skupine H1 v množstve 6 g/kg a v skupine H2 v množstve 9 g/kg. Prijem krmiva a napájanie bolo počas celého pokusu zabezpečené *ad libitum*. Chemická analýza kŕmnych zmesí bola vykonaná analytickými metódami podľa Nariadenia komisie (ES) č. 152/2009. Analyzovaný obsah živín v kŕmnych zmesiach je uvedený v Tabuľkách 1a-c.

Tabuľka 1a. Analyzovaný obsah živín v kŕmnych zmesiach - Štartérová

	K	H1	H2
sušina (g/kg KZ)	885,2	884,9	887,7
NL (g/kg S)	229,6	229,0	226,1
HT (g/kg S)	20,3	19,3	19,0
HV (g/kg S)	44,7	42,0	40,1
popol (g/kg S)	53,9	55,5	67,5
ME (MJ/kg S)	12,4	12,3	12,2

Tabuľka 1b. Analyzovaný obsah živín v kŕmnych zmesiach - Rastová

	K	H1	H2
sušina (g/kg KZ)	886,3	886,5	888,4
NL (g/kg S)	217,8	217,5	214,2
HT (g/kg S)	21,6	23,7	22,4
HV (g/kg S)	56,5	46,7	51,6
popol (g/kg S)	62,7	63,6	70,5
ME (MJ/kg S)	12,6	12,6	12,6

Tabuľka 1c. Analyzovaný obsah živín v kŕmnych zmesiach - Finálna

	K	H1	H2
sušina (g/kg KZ)	885,8	883,6	882,9
NL (g/kg S)	197,3	190,1	182,8
HT (g/kg S)	25,4	24,8	23,6
HV (g/kg S)	50,7	49,1	51,5
popol (g/kg S)	59,0	66,3	70,4
ME (MJ/kg S)	13,1	13,0	13,0

K – kontrolná skupina; H1 – pokusná skupina s prídavkom humínových látok v množstve 6 g/kg; H2 – pokusná skupina s prídavkom humínových látok v množstve 9 g/kg; KZ – kŕmna zmes; S – sušina; NL – dusíkaté látky; HT – hrubý tuk; HV – hrubá vláknina; ME – Metabolizovateľná energia.

Na konci pokusu (na 42. deň) bolo z každej skupiny náhodne vybraných šesť kurčiat, od ktorých po omráčení, usmrtení a jatočnom opracovaní boli odobrané slepé črevá. Počty baktérií mliečného kvasenia (LAB) a enterobaktérií (ENT) v obsahu slepých čriev boli stanovené platňovou metódou. Pre stanovenie počtu LAB

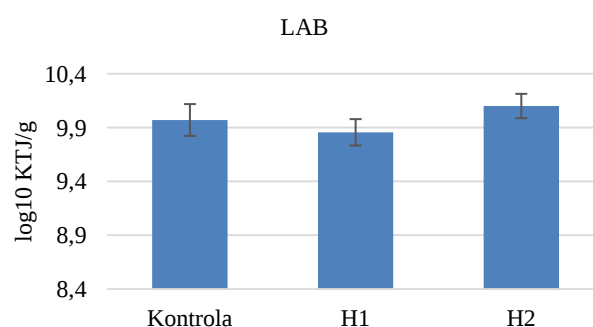
bol použitý MRS agar (Biolife, Taliansko) a pre stanovenie počtu ENT bol použitý MacConkey agar (HiMedia, India). Z jednotlivých slepých čriev bol odobratý 1 g obsahu, ktorý bol nariadený 9 ml fyziologického roztoku (Mikrochem, Slovensko) a dôkladne homogenizovaný použitím stomachera (IUL, Instruments, Spain). Následne boli zhomogenizované vzorky riedené decimálnym riedením fyziologickým roztokom a očkované na príslušné agary v množstve 100 µl. Pripravené platne boli vložené do termostatu a kultivované pri 37 °C: MRS agar bol kultivovaný po dobu 48 hodín v anaeróbnom prostredí a MacConkey agar bol kultivovaný po dobu 24 hodín v aeróbnom prostredí. Počty baktérií sú vyjadrené ako logaritmus kolónie tvoriacich jednotiek na gram obsahu (log₁₀KTJ/g).

Získané výsledky boli vyhodnotené štatisticky použitím jednocestnej ANOVY (Tukey's multiple comparison test). Výsledky sú prezentované ako priemer ± štandardná chyba priemeru (SEM).

3. VÝSLEDKY A DISKUSIA

Baktérie mliečného kvasenia ako aj enterobaktérie sú skupinami baktérií, ktoré sú prirodzenou súčasťou črevného mikrobiómu. Kým baktérie mliečného kvasenia predstavujú prospešnú mikrobiotu, medzi enterobaktérie patria aj patogénne druhy, ktoré spôsobujú infekcie gastrointestinálneho traktu. Mikrobiologickým vyšetrením obsahu slepých čriev sme zistili, že prídavok humínových látok do kŕmnych zmesí brojlerových kurčiat nemal významný vplyv na počty baktérií mliečného kvasenia ($P > 0,05$; Graf 1.). No podávanie humínových látok vo vyššom množstve (9 g/kg; skupina H2) viedlo k signifikantnému zníženiu počtu enterobaktérií v porovnaní s kontrolnou skupinou ($P = 0,024$; Graf. 2). Zníženie počtu enterobaktérií v obsahu slepých čriev v porovnaní s kontrolnou skupinou bolo zaznamenané aj v pokusnej skupine s prídavkom humínových látok v nižšom množstve (6 g/kg, skupina H1), no rozdiel nebol štatisticky významný ($P > 0,05$). Zároveň bol zistený štatisticky významný lineárny trend zníženia počtu enterobaktérií ($P = 0,009$). So zvyšujúcou sa koncentráciou humínových látok v krmive sa lineárne znížil počet enterobaktérií v obsahu slepých čriev brojlerových kurčiat.

Graf 1. Vplyv suplementácie kŕmnych zmesí humínovými látkami na počet baktérií mliečného kvasenia (LAB) v obsahu slepých čriev brojlerových kurčiat

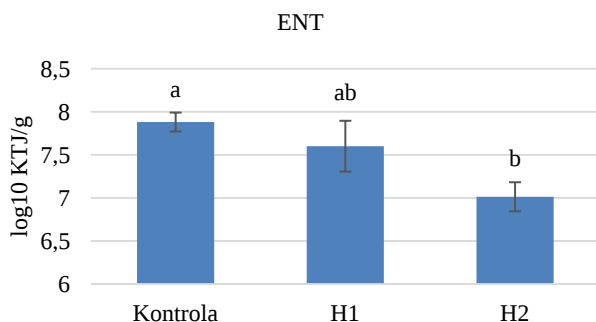


H1 – pokusná skupina s prídavkom humínových látok v množstve 6 g/kg; H2 – pokusná skupina s prídavkom humínových látok v množstve 9 g/kg.

Napriek nesignifikantným zmenám v obsahu baktérií mliečného kvasenia, bol v pokusnej skupine H2 v dôsledku signifikantného zníženia počtu enterobaktérií zaznamenaný aj signifikantne nižší pomer enterobaktérií k baktériám mliečného kvasenia v porovnaní s kontrolnou skupinou ($P = 0,048$; Graf 3.), čo poukazuje na nárast prospešnej črevnej mikrobioty v tejto pokusnej skupine. Podobný

trend bol pozorovaný aj v pokusnej skupine H1, ale rozdiel oproti kontrolnej skupine nebol štatisticky preukazný.

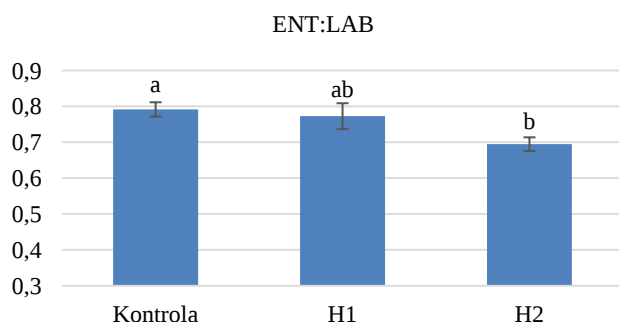
Graf 2. Vplyv suplementácie kŕmnych zmesí humínovými látkami na počet enterobaktérií (ENT) v obsahu slepých čriev brojlerových kurčiat



H1 – pokusná skupina s prídavkom humínových látok v množstve 6 g/kg; H2 – pokusná skupina s prídavkom humínových látok v množstve 9 g/kg.

^{ab} Rozdielne označenie stĺpcov vyjadruje štatistickú významnosť ($P < 0,05$).

Graf 3. Vplyv suplementácie kŕmnych zmesí humínovými látkami na pomer počtu enterobaktérií (ENT) k počtu baktérií mliečného kvasenia (LAB) v obsahu slepých čriev brojlerových kurčiat



H1 – pokusná skupina s prídavkom humínových látok v množstve 6 g/kg; H2 – pokusná skupina s prídavkom humínových látok v množstve 9 g/kg.

^{ab} Rozdielne označenie stĺpcov vyjadruje štatistickú významnosť ($P < 0,05$).

Signifikantné zníženie počtu enterobaktérií a signifikantné zníženie pomeru enterobaktérií k baktériám mliečného kvasenia v obsahu slepých čriev bolo zaznamenané aj u brojlerových kurčiat, ktoré prijímali kŕmne zmesi s obsahom humínových látok v 0,8 % koncentrácii (Mudroňová a kol. 2020). Podobne, významné zníženie počtu koliformných baktérií a *E. coli* v črevnom obsahu vplyvom skrmovania humínových látok bolo zistené aj u japonských prepelíc (Abdel-Mageed 2012), u Sasso kurčiat (ElNaggar a El-Kelawy 2018) a u králikov (Abdl Razeq Mohamed Mohamed a kol. 2020). El-Kelawy a kol. (2024), ktorí sa venovali štúdiu humínových kyselín, okrem významného zníženia počtu *E. coli* v črevnom obsahu brojlerových kurčiat prijímajúcich diéty s obsahom humínových kyselín (v množstve 1 a 2 g/kg) zaznamenali aj signifikantné zvýšenie počtu laktobacilov.

4. ZÁVER

Tento experiment potvrdil, že podávanie humínových látok (HUMAC MycotoxiSorb) dokáže potlačiť rast enterobaktérií,

signifikantne pri podávaní vo vyššom množstve (9g/kg). Na základe výsledkov tejto štúdie je možné konštatovať, že humínové látky sú schopné modulovať črevnú mikrobiotu v prospech hostiteľa prostredníctvom zníženia počtu škodlivých baktérií a tak prispieť k zabezpečeniu dobrého zdravotného stavu a prípadne k následnému zlepšeniu produkcie zvierat.

Zdroje

1. ABD EL-HACK, M.E., EL-SAADONY, M.T., ELBESTAWY, A.R., EL-SHALL, N.A., SAAD, A.M., SALEM, H.M., EL-TAHAN, A.M., KHAFAGA, A.F., TAHA, A.E., ABUQAMAR, S.F., EL-TARABILY, K.A. *Necrotic enteritis in broiler chickens: disease characteristics and prevention using organic antibiotic alternatives—a comprehensive review*. Poultry Science, 2022, 101(2), 101590.
2. ABDEL-MAGEED, M.A.A. Effect of dietary humic substances supplementation on performance and immunity of Japanese quail. Egyptian Poultry Science, 2012, 32(3), 645-660.
3. ABDL RAZEK MOHAMED MOHAMED, S., ELSEBAI, A., ELGHALID, O.A., ABD-HADY, A.M. Productive performance, lipid profile and caecum microbial counts of growing rabbits treated with humic acid. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 2020, 104(5), 1233-1241.
4. AGBOOLA, A.F., OMIDIWURA, B.R.O., AMOLE, A.O., OLANREWAJU, O.A., ADENIRAN, Y.E. Influence of humic acid supplemented diets on intestinal microbiome and laying performance of egg-type chicken. Nigerian Journal of Animal Production, 2021, 48(6), 276-286.
5. ARIF, M., REHMAN, A., SAEED, M., ABD EL-HACK, M.E., ARAIN, M.A., HASEEBARSHAD, M., ZAKRIA, H.M., ABBASI, I.H. Impacts of dietary humic acid supplementation on growth performance, some blood metabolites and carcass traits of broiler chicks. Indian Journal of Animal Sciences, 2016, 86(9), 1073-1078.
6. EL-KELAWY, M.I., ELNAGGAR, A. S., ABD EL-KHALEK, E. The influence of supplementing broiler chickens with humic acid or biochar as natural growth promoters on their productive performance, nutrient digestibility, and physiological performance. Egyptian Poultry Science Journal, 2024, 44(1), 123-142.
7. ELNAGGAR, A.S., EL-KELAWY, M.I. Effect of humic acid supplementation on productive performance, blood constituents, immune response and carcass characteristics of Sasso chicken. Egyptian Journal of Animal Production, 2018, 55(1), 75-84.
8. HAMMOD, A.J., ZENY, Z.A.H., MAHDI, A.S., ALFERTOSI, K.A. Probiotic and humic acid as feed additives and their effects on productive and economic traits of broiler. Indian Journal of Ecology, 2021, 48(13), 35-37.
9. MARCINČÁKOVÁ, D., MAČANGA, J., NAGY, J., MARCINČÁK, S., POPELKA, P., VAŠKOVÁ, J., JAĎUTTOVÁ, I., MELLEN, M. Effect of supplementation of the diet with humic acids on growth performance and carcass yield of broilers. Folia Veterinaria, 2015, 59, 165-168.
10. MIRNAWATI, Y.R., MARLIDA, Y. Effects of humic acid addition via drinking water on the performance of broilers fed diets containing fermented and non-fermented palm kernel cake. Archiva Zootechnica, 2013, 16(1), 41-53.
11. MUDROŇOVÁ, D., KARAFFOVÁ, V., PEŠULOVÁ, T., KOŠČOVÁ, J., MARUŠČÁKOVÁ, I.C., BARTKOVSKÝ, M., MARCINČÁKOVÁ, D., ŠEVČÍKOVÁ, Z., MARCINČÁK, S. The effect of humic substances on gut microbiota and immune response of broilers. Food and Agricultural Immunology, 2020, 31(1), 137-149.
12. NARIADENIE KOMISIE (ES) č. 152/2009 z 27. januára 2009, ktorým sa stanovujú metódy odberu vzoriek a analýzy na účely úradných kontrol krmív. Úradný vestník Európskej únie, 2009,

- 54, 1-130. Dostupné na internete: <<http://data.europa.eu/eli/reg/2009/152/oj>>
13. OMIDIWURA, B.R.A., OLAJIDE, O.C., OLANIYAN, O.S. Potentials of pepper elder (*Peperomia pellucida*) and humic acid as feed additives in noiler chicken production. *Nigerian Journal of Animal Production*, 2022, 49(2), 86-94.
14. STEVENSON, F.J. *Humus Chemistry: Genesis, Composition, Reactions*; Wiley-Inter-Science: New York, NY, USA, 1994, 34–41.
15. TAKLIMI, S.M.S., GHAHRI, H., ISAKAN, M.A. Influence of different levels of humic acid and esterified glucomannan on growth performance and intestinal morphology of broiler chickens. *Agricultural Sciences*, 2012, 3(05), 663-668.