NACIONĀLAIS ATTĪSTĪBAS PLĀNS 2020

EIROPAS SAVIENĪBA
EIROPA INVESTĒ LAUKU APVIDOS
Eiropas Lauksaimniecības fonds lauku attīstībai

Atbalsta Zemkopības ministrija un Lauku atbalsta dienests

Eiropas Lauksaimniecības fonda lauku attīstībai (ELFLA) pasākuma "Sadarbība" Atklāta projektu iesniegumu konkursa Latvijas Lauku attīstības programmas 2014. - 2020.gadam pasākuma 16. "Sadarbība" 16.2 apakšpasākuma: "Atbalsts jaunu produktu, metožu, procesu un tehnoloģiju izstrādei" projekts

Bioefektīvas dzīvnieku pārtikas izstrāde bioloģiskām saimniecībām

Projekta nr. 18-00-A01620-000042

Noslēguma atskaite

2021.

Rīga

Saturs

1. Projekta apraksts un dalībnieki 3

2. Pieteikumā nospraustais projekta mērķis un tā pamatojums 4

3. Skuju koku biomasas izmantošanas aktualitāte 5

4. Darbā izmantotie materiāli un metodes 7

4.1. Materiāli 7

4.2. Metodes 10

5. Projekta dalībnieku veikto pētījumu apraksts 19

5.1. Rīgas Stradiņa universitāte 19

5.1.1. Skuju biezo ekstraktu saturošu šķidrumu gatavošana 19

5.1.2. Skuju biezo ekstraktu saturošu premiksu gatavošana 23

5.2. Pārtikas drošības, dzīvnieku veselības un vides zinātniskais institūts "BIOR" 28

5.2.1. Karotīna un hlorofila noteikšana produktu paraugos 28

5.2.2. Cecal mikrobiotas daudzveidība un eksperimentālas barošanas grupās novērotās tendences 31

5.3. Biosaimniecība ZS "Skujas" 35

5.4. Biosaimniecība ZS "LIEPAS" 36

5.5. Biosaimniecība SIA "ZAĻAIS KURSS" 36

6. Diskusija par projekta pieteikumā nosprausto mērķa un uzdevumu sasniegšanu 38

7. Secinājumi 41

8. Rekomendācijas 43

Literatūra 45

Pielikums 47

1. Projekta apraksts un dalībnieki

Projekts "Bioefektīvas dzīvnieku pārtikas izstrāde bioloģiskām saimniecībām" tika īstenots Eiropas Lauksaimniecības fonda lauku attīstībai Latvijas Lauku attīstības programmas 2014. – 2020. gadam pasākuma "Sadarbība" 16.2. apakšpasākuma "Atbalsts jaunu produktu, metožu, procesu un tehnoloģiju izstrādei" ietvaros.

Projekta īstenošanā piedalījās SIA BF-ESSE (Dienesta klienta nr. 04606905, reģ. nr. 40003033268) un sadarbības partneri:

- Rīgas Stradiņa universitāte (reģ. nr. 90000013771);
- Pārtikas drošības, dzīvnieku veselības un vides zinātniskais institūts "BIOR" (reģ. nr. 90009235333);
- Veides Agra zemnieku saimniecība "Liepas" (reģ. nr. 43601012337);
- Irlavas pagasta zemnieku saimniecība "Karotītes" (reģ. nr. 40001017466);
- SIA "Zaļais kurss" (reģ. nr. 40103240431).

Projekta koordinatora kontaktinformācija:
SIA BF-ESSE: Juris Rubens, t. 2 9212315, juris_rubens@inbox.lv.

Sadarbības partneru kontaktinformācija:

- Rīgas Stradiņa universitāte: Ilze Bārene, t. 29551817, Ilze.Barene@rsu.lv;
- Pārtikas drošības, dzīvnieku veselības un vides zinātniskais institūts "BIOR": Iveta Pugajeva, t. 29675491, Iveta.Pugajeva@bior.lv;
- Agra zemnieku saimniecība "Liepas": Agris Veide, t. 26514405, agris.veide@inbox.lv;
- Irlavas pagasta zemnieku saimniecība "Karotītes": Ričards Kalnciems, t. 22119599, ricards@karotites.lv,
- SIA "Zaļais kurss": Ingrīda Gailīte, t. 29225211, zalaiskurss@inbox.lv;
- ZS "Skujas": Guntars Eglītis, t. 29918731, zsskujas@gmail.com.

Projekts tika uzsākts 2019. gada maijā.

Projekta īstenošanas periods - divi gadi, ar nobeigumu 2021.gada 30.aprīlī. Projekta faktiski izmantotās attiecināmās izmaksas ir 82180,76 EUR, t.sk., publiskais finansējums 73962,66 EUR.

Ņemot vērā dažādus ārējos faktorus, kurus projekta pieteikuma izstrādes laikā nebija iespējams paredzēt, saskaņā ar Projekta dalībnieku lūgumu vadošais partneris divas reizes lūdza projekta beigu termiņa pagarinājumu, nemainot budžeta pozīcijas. Tādējādi projekts noslēdzās 2021. gada 30. augustā.

Projekta realizācijas gaitā izrādījās, ka ZS "Karotītes" (putnkopība/broileru audzēšana) organizatoriski nevar atdalīt no kopējās dzīvnieku grupas (9000 putnu, minimālā grupa 1800 putnu) atsevišķu grupu (150-200 putnu un 80 cāļus), kurai varētu izbarot dažādu koncentrāciju skuju biezo ekstraktu saturošu eksperimentālo barību. Saskaņojot visas aktivitātes ar Lauku atbalsta dienestu tika atlasīta optimālā kandidatūra - ZS "Skujas", kura noteiktā kārtībā aizvietoja ZS "Karotītes" (LAD apstiprinājums no 12.10.2020 Nr.18-00-A01620-000042).

2. Pieteikumā nospraustais projekta mērķis un tā pamatojums

Bioloģiskā dzīvnieku pārtika parasti atbilst bioloģiskās lauksaimniecības principiem - bez ķimikālijām, antibiotikām, konservantiem (E-vielām), ĢMO, augšanas stimulatoriem utt.

Dzīvnieku pārtikas konversija un metaboliskie procesi parasti ir cieši saistīti ar barības vērtību un ķīmisko sastāvu, tādēļ jebkuru organismu jānodrošina ar visām nepieciešamajām barības vielām optimālā daudzumā un proporcijās. Turklāt, pilnvērtīgai dzīvnieku barībai ļoti būtisks ir uzglabāšanas termiņš. Tādēļ bioefektīvas dzīvnieku pārtikas izstrāde bez liela "ķīmijas" daudzuma ir aktuāls un praktisks jautājums visām bioloģiskajām saimniecībām, ieskaitot liellopu, aitu un putnkopjus.

Priežu un egļu skuju ķīmiskajā sastāvā ir daudz bioloģiski aktīvu vielu, tām piemīt baktericīdas un pretvīrusu īpašības, imūnmodelējošās, antioksidatīvās funkcijas, tie satur vairākus vitamīnus un provitamīnus (C, B1, B2, K, P u.c.), ēteriskās eļļas, sveķus, minerālsāļus, cieti utt. Paredzēts izstrādāt jaunus bioefektīvus dzīvnieku pārtikas produktus (paraugus), izmantojot barības pamatsubstances (klijas, ogļhidrāti, mikroelementi u.c.), pievienojot skuju biezo ekstraktu un citas naturālas vielas vai to ekstraktus. Sistemātiski kontrolējot sastāvdaļas, izpētīt uzglabāšanas iespējas.

Projekta īstenošanas laikā tiks atlasīti labākie paraugi, noformēta ražošanas tehniskā dokumentācija. Zinātniekiem būs pieejamas zemnieku atskaites par eksperimentālās pārtikas lietošanu, kas var tikt izmantoti arī citiem pētniecības mērķiem. Inovatīvs, bioefektīvs dzīvnieku pārtikas produkts var uzlabot ekonomiskos rādītājus bioloģiskās lauksaimniecības nozarē un attīstīt bioloģisko saimniecību ne tikai Latvijas robežās, bet arī Eiropas Savienības mērogā. Pēc inovatīva bioloģiskā dzīvnieku pārtikas produkta izstrādes jebkura bioloģiskā saimniecība varēs izgatavot un lietot šo produktu.

Projekta plānotās darbības dos ieguldījumu sekojošos virzienos - 3A mērķa virziens *"pārtikas preču aprites organizēšana, tostarp lauksamniecības produktu pārstrādes un tirdzniecības veicināšana, dzīvnieku labturības un riska pārvaldības veicināšana lauksaimniecībā"*.

Projekta darbības veicinās šādu prioritāšu īstenošanu:

- ✓ pilna cikla ražošanas nodrošināšanu no primāro lauksaimniecības produktu ražotāja līdz gatavās produkcijas pārstrādātājam, sadarbībā radot kompleksu ilgtspējīgu risinājumu, kas skar gan primāro ražotāju, gan pārstrādātāju;
- ✓ lauksaimniecības produkcijas pievienotās vērtības radīšanu vietējai izejvielai.

3. Skuju koku biomasas izmantošanas aktualitāte

Augu valsts ir vērtīgs avots izejvielām, kuras izmanto cilvēku un dzīvnieku dažādu slimību ārstēšanā un veselības stiprināšanā. Starp augu valsts vielām ir vielas ar izteiktu farmakoloģisku iedarbību un savienojumi, piem., vitamīni, minerālvielas, nepiesātinātās taukskābes, antioksidanti u.c. bioloģiski aktīvās vielas ar pozitīvu ietekmi uz organisma trofiskajiem un reparatīvajiem procesiem.

Vērtīgi augu valsts pārstāvji ir **skuju koki**. Skuju koki ir vieni no vecākajiem augiem uz zemeslodes. Garajā attīstības periodā skuju koki ir piemērojušies apkārtējās vides apstākļiem. Skuju koki ir spējuši pārvarēt krasas klimata izmaiņas, radiāciju, dažādas slimības un ir izstrādājuši unikālu bioloģiski aktīvo vielu kompleksu, kuru plaši izmanto zinātniskajā un tautas medicīnā.

Skuju koku zalenis ir vērtīgs materiāls. Tā sastāvā ir hlorofili, karotinoīdi: β-karotīns, luteīns, neoksantīns , violaksantīns u.c. [1, 2], flavonoīdi: kvercetīna, mircetīna un kempferola atvasinājumi (ampelopsīns, taksifolīns, izokvercetīns, astragalīns, izoramnetīns, trifolīns, hiperīns, izomircitrīns u.c.), miecvielas: katehīns, gallokatehīns u.c. [3].

Priežu skujas ir bagātas ar vitamīniem: askorbīnskābi, K vitamīnu, E un B grupas vitamīniem; minerālvielām un mikroelementiem (kāliju, kalciju, magniju, fosforu, mangānu, cinku, dzelzi, boru, alumīniju, niķeli, selēnu, hromu, jodu) (3); aminoskābēm [4].

Skujas satur alilglicerīdus, fosfo- un glikolipīdus, sterīnus un to ēsterus ar taukskābēm (oleīnskābi, linolēnskābi, linolskābi, palmitīnskābi) [5], p-sitosterīnu-3-o-p-o-glikopiranozīdu; fenolsavienojumus: kanēļskābi, p-kumārskābi, p-hidroksifeniletanolu, gvajaciletanolu, havikolu, eigenolu, izoeigenolu, koniferilaldehīdu, pinosilvīna monometilēsteri, dimetoksirezveratrolu, ferūlskābi, dihidrokoniferilspirtu, pinorezinolu [6]; izoabienolu, poliprenolus, epimanoiloksīda-19-skābi [7]; vaskus u.c. vielas [8, 9].

Bioloģiski aktīvo vielu sastāvs priežu zalenī mainās atkarībā no koku vecuma, gadalaika, augšanas vietas, apkārtējās vides klimatisko un ekoloģisko faktoru ietekmes [2, 3, 4, 7, 8, 10, 11]. Skuju biezā ekstrakta - Hlorofila-karotīna pastas (skujkoku zaļo skuju kompleksa, *conifer green needle complex*) bioloģiski aktīvo vielu saturu skat. 3.1. tabulā [12].

Tabula 3.1. **Hlorofila-karotīna pastas sastāvs**

Komponents	**Saturs**
Nātrija hlorofilīns un citi hlorofila atvasinājumi	400 – 1600 mg / 100 ml
β -karotīns un citi karotinoīdi	20 – 120 mg / 100 ml
E vitamīns	30 – 50 mg / 100 ml
K grupas vitamīni	1,2 – 2 mg / 100 ml
Fitosterīni (g.k. β-sitosterīns)	1,5 – 2,9 %
Poliprenoli	0,46 – 1,2 %
Skvalēns	0,14 – 0,16 %
Minerālvielas	5 – 7 %
Taukskābju, sveķskābju, divbāzisku, okso- un oksiskābju nātrija sāļi	44 – 60 %
Vaski	5 – 8 %
Ēteriskā eļļa	1 – 1,2 %
Ūdens	līdz 100 %

Cilvēki jau sen pūlas no skujām iegūt aktīvās vielas un to maisījumus, kombinācijas, kuras varētu izmantot savā un dzīvnieku labā veselības uzturēšanai un uzlabošanai.

Ideja par skuju koku biomasas izmantošanu lopbarībā nav jauna. To sāka attīstīt jau 20. gadsimta piecdesmitajos gados.

Pirmos Latvijā plaši sāka ražot un kā lopbarību izmantot skuju vitamīnu miltus, bet tie nebija piemēroti visiem dzīvniekiem. Putnu un cūku gremošanas trakts nespēja tikt galā ar miltos esošo lignocelulozes kompleksu. Lietošanai tika piedāvāta sasmalcināta skuju masa. Tās praktisko lietošanu ierobežoja īsais derīguma laiks un augsta miecvielu, rūgtvielu un sveķu koncentrācija.

Zinātniskie pētījumi ir paplašinājuši skuju koku zaļās masas pielietošanu. Zinātnieki ir izstrādājuši skuju koku zaļās masas, kas ir kokmateriālu ražošanas atkritumi, pārstrādes tehnoloģijas, kā rezultātā var iegūt izvilkumus, ekstraktus, saturošus vērtīgas dabas vielu kombinācijas izmantošanai medicīnā, kosmētikā, lauksaimniecībā, , rūpniecībā u.c. nozarēs. Skuju koku zaleņa ekstraktam un tā sastāvdaļām ir atklātas imunmodulatora, hepatoprotektora, antioksidanta, antibakteriālās īpašības, pretvīrusu aktivitāte.

Skuju ekstrakta gatavošanai un tā sastāvdaļu iegūšanai izmanto vietējo biomasu (skuju koku zaleni), kas kā izejmateriāls ir pieejamas augu gadu.

No priedes skujām gatavoja vitamīnu pastu, kuru lietoja kā lopbarības piedevu.

Mežzinātnes institūts “Silava” kopā ar toreizējo biotehnoloģijas un veterinārmedicīnas zinātnisko institūtu “Sigra” ar Eiropas reģionālās attīstības fonda (ERAF) finansiālu atbalstu izstrādāja no skuju koku biomasas un lopbarības kaļķakmens produktu “Dolofit” lietošanai putnkopībā. Produkta lietošanas laikā veiktais pētījums parādīja, ka mājputnu olās un gaļā, kuru barībai pievienota piedeva “Dolofit”, būtiski samazinās holesterīna daudzums, pieaug labo taukskābju omega 3 un omega 6 saturs. Par pieciem procentiem pieaug gaļas apjoms, dējība palielinās par 2,5 līdz 3 procentiem. Samazinās arī barības patēriņš – lai iegūtu 1 kg dzīvmasas, vajag par 6 līdz 7 procentiem mazāk barības.

Projekta precizētais mērķis un darba uzdevumi

Projekta mērķis: izstrādāt bioefektīvu dzīvnieku papildbarību bioloģiskām saimniecībām.

Uzdevumi:

1. Izstrādāt sastāvu skuju biezo ekstraktu saturošiem šķidrumiem
2. Izstrādāt premiksu sastāvus, saturošus dažādu bio papildbarību un skuju biezo ekstraktu un precizēt to pagatavošanas tehnoloģiju
3. Izstrādāt analīžu metodes karotīna un hlorofila noteikšanai skuju biezo ekstraktu saturošajos šķidrumos un premiksos pēc to pagatavošanas un 3 mēnešu glabāšanas dažādos uzglabāšanas apstākļos.
4. Pārbaudīt eksperimentālās barības, saturošas skuju biezo ekstraktu piemērotību cāļu, jēru un jaunlopu barošanā.

4. Darbā izmantotie materiāli un metodes

4.1. Materiāli

Skuju biezais ekstrakts.

Ekstrakts saņemts no AS BIOLAT, reģ. Nr. 40003128200, juridiskā adrese: Rīgas iela 111, Salaspils, LV-2169.

Dati par skuju biezo ekstraktu doti 4.1.tabulā.

Tabula 4.1. **Ražotāja norādītie kvalitātes rādītāji skuju biezajam ekstraktam**

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Product Name:	Pine needle extract	**Batch No:**	11
Batch Quantity:	95kg	**Analysis Date:**	29.05.2019
Manufacture Date:	27.05.2019	**Expiry Date:**	26.05.2021

Analysis Items	Specification	Result	Test Method
Active Ingredients			
Extract ratio	>90%	92.0%	Enterprise standard
Physical Control			
Description	Greeny-black paste with pine needle smlell		Visual/organileptic
Chemical Control			
Iron	0.51mg / 100g	Complies	Atomic Absorption
Zinc	0.19mg / 100g	Complies	Atomic Absorption
Calcium	0.85mg / 100g	Complies	Atomic Absorption
Peroxide value	0.08%	Complies	Atomic Absorption
Heavy Metals	≤10ppm	<10ppm	Atomic Absorption
Cadmium(Cd)	≤1ppm	<1ppm	Atomic Absorption
Lead(Pb)	≤3ppm	<3ppm	Atomic Absorption
Mercury(Hg)	≤0.1ppm	<0.1ppm	Atomic Absorption
Residual Solvent	<0.05%	Complies	/
Microbiological Control			
Total Plate Count	≤1000cfu/ml	Complies	AOAC/Petrifilm
S. aureus	Negative in 1g	Complies	AOAC/BAM
Salmonella	Negative in 10 g	Complies	AOAC/Neogen Elisa
Yeast & Mold	100cfu/g Max	Complies	AOAC/Petrifilm
E.Coli	Negative in 1g	Complies	AOAC/Petrifilm
Packing and Storage			
Packing	Packed in metal drumm. N. W.: 18 kgs.		
Storage	Dry, Dark place, Temperature 10-25℃		
Shelf Life	2 years when properly stored.		
Statements	Non-GMO		
Conclusion: The product complies with enterprise standard.			

Tā kā skuju biezā ekstrakta (hlorofila karotīna pastas) bioloģisko aktivitāti nosaka hlorofila atvasinājumu, karotinoīdu, taukos šķīstošo E un K vitamīnu, fitosterīnu, poliprenolu, skvalēna, nepiesātināto taukskābju u.c. bioloģiski aktīvo vielu komplekss, Pārtikas drošības, dzīvnieku veselības un vides zinātniskais institūtā "BIOR" skuju biezā ekstrakta raksturošanai noteica hlorofilu un karotīnu daudzumus. Analīžu rezultāti doti 4.2.tabulā.

Tabula 4.2. **Hlorofilu, beta-karotīna saturs, karotīnu izomēru summa un kopējais mikroorganismu skaits skuju biezajā ekstraktā**

Skuju biezā ekstrakta kvalitātes rādītāji	Rezultāti
Hlorofila saturs	366 mg/100 g
Beta-Karotīna saturs	1072 mg/kg
Karotīnu izomēru summa	3012 mg/kg
Kopējais mikroorganismu skaits	< 10 KVV/1 g

Palīgvielas

= *Šķīdinātāji*

- Attīrīts ūdens
- 20% etilspirta šķīdums
- 70% etilspirta šķīdums
- 50% propilēnglikola šķīdums
- 70% propilēnglikola šķīdums
- 50% propilēnglikola šķīdums, saturošs 20% etilspirta

= *Bio-papildbarība*

- ✓ ***Bio papildbarība 0 – 2 m.v.teļiem*** 62 – 78.

Ražotājs A/S Dobeles dzirnavnieks
Bio papildbarība satur kviešus bio, miežus bio, sojas pupas bio, pupas bio, auzas bio, sojas raušus bio, kalcija karbonātu, saccharomyces cerevisiae, defluorinētu monokalcija fosfātu, nātrija hlorīdu, magnija oksīdu, vitamīnu A, vitamīnu D3, vitamīnu E, mikroelementus – cinku, mangānu, varu, jodu, kobaltu un selēnu.

- ✓ ***DOFEED-Papildbarība 2,5% putniem*** 01 – 379.

Paredzēta bioloģiskajām saimniecībām.
Ražotājs A/S Dobeles dzirnavnieks
Bio papildbarība satur defluorinētu monokalcija fosfātu, kalcija karbonātu, nātrija hlorīdu, vitamīnu A, vitamīnu D3, vitamīnu E, B grupas vitamīnus, K3 vitamīnu, mikroelementus – cinku, mangānu, varu, jodu, kobaltu, selēnu, dzelzi, gremošanas veicinātājus – endo-1,3,4-B-glikonāzi, endo-B-ksilināzi un 6-phytase.

- ✓ ***Pilnvērtīga barība dējējvistām biosaimniecībām 01 – 380.***

Ražotājs A/S Dobeles dzirnavnieks
Pilnvērtīga barība satur bio kviešus, bio sojas pupas, bio auzas, kalcija karbonātu, bio miežus, bio pupas, bio sojas raušus, saccharomyces cerevisiae, vitamīnu A, vitamīnu D3, vitamīnu E, B grupas vitamīnus, K3 vitamīnu, mikroelementus – cinku, mangānu, varu, jodu, kobaltu, selēnu, dzelzi, gremošanu veicinātājus – endo-1,3,4-B-glikonāzi, endo-B-ksilināzi un 6-phytase.

- ✓ ***Pilnvērtīga barība 0 – 8 ned. vec. cāļiem biosaimniecībām 02-77.***

Ražotājs A/S Dobeles dzirnavnieks
Pilnvērtīgā barība satur bio kviešus, bio sojas raušus, bio auzas, saccharomyces cerevisiae, kalcija karbonātu, vitamīnu A, vitamīnu D3, vitamīnu E, B grupas vitamīnus, K3 vitamīnu, mikroelementus: dzelzi, cinku, mangānu, varu, kobaltu, selēnu, gremošanu veicinātājus - endo-1,3,4-B-glikonāzi, endo-B-ksilināzi un 6-phytase.

- ✓ ***Pilnvērtīga barība jaunputniem biosaimniecībām 03-168.***

Ražotājs A/S Dobeles dzirnavnieks
Pilnvērtīgā barība satur bio kviešus, bio auzas, sojas bio pupas, bio sojas raušus, saccharomyces cerevisiae, kalcija karbonātu, vitamīnu A, vitamīnu D3, vitamīnu E, B grupas vitamīnus, K3 vitamīnu, mikroelementus: cinku, mangānu, varu, jodu, kobaltu, selēnu, dzelzi, gremošanu veicinātājus - endo-1,3,4-B-glikonāzi, endo-B-ksilināzi un 6-phytase.

- ✓ ***Pilnvērtīga barība 0 – 28 d.v.broileriem biosaimniecībām 05-13.***

Ražotājs A/S Dobeles dzirnavnieks
Pilnvērtīgā barība satur bio kviešus, bio sojas raušus, bio auzas, saccharomyces cerevisiae, kalcija karbonātu, vitamīnu A, vitamīnu D3, vitamīnu E, B grupas vitamīnus, K3 vitamīnu, mikroelementus: cinku, mangānu, varu, jodu, kobaltu, selēnu, dzelzi, gremošanu veicinātājus - endo-1,3,4-B-glikonāzi, endo-B-ksilināzi un 6-phytase.

- ✓ ***Pilnvērtīga barība 28 – 63 d.v. broileriem Grower biosaimniecībām 06-14.***

Ražotājs A/S Dobeles dzirnavnieks
Pilnvērtīgā barība satur bio kviešus, bio sojas raušus, bio miežus, bio sojas pupas, auzas bio, saccharomyces cerevisiae, kalcija karbonātu, vitamīnu A, vitamīnu D3, vitamīnu E, B grupas vitamīnus, K3 vitamīnu, mikroelementus: cinku, mangānu, varu, dzelzi, jodu, kobaltu, selēnu, gremošanu veicinātājus - endo-1,3,4-B-glikonāzi, endo-B-ksilināzi un 6-phytase.

- ✓ ***Pilnvērtīga barība broileriem Finisher biosaimniecībām 07-10.***

Ražotājs A/S Dobeles dzirnavnieks
Pilnvērtīgā barība satur bio kviešus, bio sojas raušus, bio sojas pupas, bio auzas, saccharomyces cerevisiae, kalcija karbonātu, vitamīnu A, vitamīnu D3, vitamīnu E, B grupas vitamīnus, K3 vitamīnu, mikroelementus: cinku, mangānu, varu, jodu, kobaltu, selēnu, dzelzi, gremošanu veicinātājus - endo-1,3,4-B-glikonāzi, endo-B-ksilināzi un 6-phytase.

A/S Dobeles dzirnavnieks ražoto biopapildbarību drīkst izmantot bioloģiskajā ražošanā saskaņā ar Padomes Regulu (EK) Nr.834/2007 un Komisijas Regulu (EK) Nr. 889/2008.

4.2. Metodes

Papildbarības daļiņu izmēra noteikšana

Sietu analīzi veic izmantojot 5 sietu komplektu. Izmantoto sietu acu izmēri ir 3 mm, 2 mm, 1,0 mm, 0,5 mm, 0,25 mm un apakšējais trauks - uztvērējs. Sietu komplekts ar 100 gramiem papildbarības parauga 5 min tiek pakļauts sitienveida kratīšanai. Pēc kratīšanas uz katra sieta esošais produkta atlikums tiek nosvērts un aprēķināts daļiņu izmēru procentuālais sadalījums.

Skuju biezo ekstraktu saturošu šķidrumu gatavošana

Aprēķināto skuju biezā ekstrakta daudzumu samaisa ar šķīdinātāju. Lietojot katru no minētajiem šķīdinātājiem, pagatavoti trīs koncentrāciju šķidrumi.

Granulveida premiksa gatavošana

Skuju biezo ekstraktu maisa ar papildbarību līdz viendabīgai masai. Iegūto mitro masu izrīvē caur sietu ar perforētu vai pītu virsmu. Atveru lielums 3-5 mm. Iegūtās granulas izbērtas plānā slānī žāvē žāvējamā skapī 30-40° C.

Skuju biezo ekstraktu saturoša premiksa gatavošana

Skuju biezā ekstrakta noteiktam daudzumam pa daļām pievieno aprēķinātās papildbarības daudzumu. Masu pēc katras papilbarības daļas pievienošanas maisa līdz viendabīgam maisījumam.

Hlorofila analīze ar UV- redzamo (UV- vis) spektrofotometrisko metodi

Hlorofila koncentrācijas noteikšanai izmanto UV-vis spektrofotometrisko metodi. Parauga sagatavošana: 1 g parauga (vajadzības gadījumā piestā homogenizē līdz smalkam pulverim) daļu sajauc ar 1 g kalcija karbonāta un apmēram 50 ml 85% acetona. Maisījumu ekstrakcijai atstāj uz 1 stundu tumšā vietā. Kad ekstrakcija pabeigta, filtrēto ekstraktu pārnes uz 100 ml mērkolbu. Mazgāšanas soli ar 85% acetonu atkārto, līdz iegūtais šķīdums ir bezkrāsains. Pēc tam filtrēto ekstraktu pārnes uz mērkolbu un ar 85% acetonu papildina līdz atzīmei.

Absorbcijas spektru mēra un absorbcijas maksimumus nolasa pie 600 nm pie 85% acetona tukšā parauga, izmantojot UV / VIS spektrofotometru (Labda 35, Perkin Elmer). Kalibrēšanas grafiku uzzīmē, atšķaidot Guthrie standartšķīdumu. Guthrie standarta šķīduma pagatavošana: 2,85 g daļu vara sulfāta un 10,00 g kālija dihromāta ievieto glāzē ar tilpumu 50 ml. Nosvērtās porcijas izšķīdina attīrītā ūdenī un kvantitatīvi pārnes mērkolbā ar tilpumu 1000 ml. Tad kolbā ielej 100 ml ūdens šķīduma ar 7% amonjaka masas daļu un tilpumu ar attīrītu ūdeni papildina līdz atzīmei. Guthrie standarta krāsas šķīdums ir ekvivalents hlorofila šķīduma koncentrācijai 85 mg / l. Guthrie standarta šķīdums ir kolorimetrisks vienu dienu pēc sagatavošanas. Šķīdumu uzglabā tumšā vietā hermētiski noslēgtā pudelē. Šķīduma glabāšanas laiks ir 1 mēnesis.

Karotīna analīze ar UAEŠH metodi

B-karotīna un tā izomēru koordinācijas noteikšanai izmanto īpaši augstas veiktspējas šķidruma hromatogrāfijas metodi. UAEŠH sistēma (Ultimate 3000, Thermo Scientific) aprīkota ar eluentu rezervuāru, RS sūkni, RS automātisko paraugu ņemšanas ierīci, RS kolonnu nodalījumu un diodu bloku detektoru (DAD). B-karotīna un tā izomēru atdalīšanai izmanto Kinetex C18 kolonnu ar daļiņu izmēru 1,7 µm, 3 mm i.d., 100 mm garumu (Phenomenex, ASV). Kustīgā fāze 98% metanola šķīdums un plūsmas ātrums 0,75 ml / min. Pēc 16 min izokrātiskās hromatogrāfiskās atdalīšanas kolonnu noskalo ar terc-butilmetilēteri un visbeidzot sākotnējo kustīgo fāzi 15 minūšu laikā. Injekcijas tilpums bija 5 µL. DAD detektors tika iestatīts uz viļņa garumu 450 nm.

Parauga sagatavošana: 1 g parauga (vajadzības gadījumā piestā homogenizē līdz smalkam pulverim) daļu sajauc ar 2 ml terc-butil-metilētera / metanola maisījuma (1/1, tilp. / Tilp.). Spēcīgi sakrata 10 minūtes, centrifugē 10 minūtes. Visbeidzot, parauga šķīdums filtrē caur 0,2 µm šļirces tipa filtru mazā stikla flakonā UHPLC analīzei. Kalibrēšanas grafikam izmanto β-karotīna standartu (> 97,0%, Sigma-Aldrich), atšķaidot β-karotīna pamatšķīdumus ar terc-butilmetilēteri / metanolu (1/1, v / v). Lineārā funkciju izmanto kā kalibrēšanas modeli. LOQ bija 1 mg / kg.

DNS ekstrakcijas un rRNS gēnu sekvencēšanas procedūra ceakālajiem paraugiem

DNS iegūšanai no 100 mg aklās zarnas satura izmanto ZymoBIOMICS 96 Magbead DNS komplektu no Zymo Research. Sekvencēšanas bibliotēkas sagatavošanu veic, ievērojot Illumina publicēto protokolu (dokumenta numurs 15044223 Rev. B). Baktēriju 16S rRNS gēna mainīgos reģionus V3-V4 mērķē uz praimeriem, ko izstrādājuši Klindvorts et al. [10]. Divpakāpju protokolā PCR pirmā kārta pastiprina mērķi un pievieno Illumina sekvencēšanas adapterus. Nextera XT komplekts A svītrkodus pievieno PCR otrās kārtas laikā. Visām amplifikācijas reakcijām izmanto KAPA HiFi DNS polimerāzi. Sekvencēšanu veic ar Illumina MiSeq, izmantojot 3 600 ciklu reaģentu komplektu, lai iegūtu 2 × 300 bp nolasījumus pārī. Kvalitātes kontroles nolūkos kopā ar paraugu bibliotēkām sekvencē DNS ekstrakcijas negatīvo kontroli un izspēles kopienas DNS (ATCC MSA-1002).

Anketas sadarbības partneriem

LAD projekta Nr. 18-00-A01620-000042 "Bioefektīvas dzīvnieku pārtikas izstrāde bioloģiskām saimniecībām" īstenošanā kā sadarbības partneri piedalījās biosaimniecības, kas nodarbojas ar dējējvistu/broileru/cāļu, atšķirto jēru un gaļas jaunlopu aprūpi.

Anketa
Dējējvistas / broileri / cāļi

_____ _____
(vieta) (datums)

Novietnes nosaukums _____

Vistu / cāļu šķirne _____ / vecums _____

1. **Esošās infekcijas**
   _____
   _____
2. **Iezīmēt kontroles un eksperimentālos dzīvniekus**

   siev. _____un vīr. _____ dzimuma īpatņus
   Katrā grupā likt vienādā skaitā
   piem.: zila un sarkana krāsa uz muguras/izolācijas lenta ap kāju)
   Visus pierakstus veic atsevišķi kontroles grupai un eksperimentālajai grupai.
3. **Vistas / cāļu vecums (dienās**)
   uzsākot _____ un pabeidzot _____ eksperimentu
4. **Individuālais vistas / cāļu svars/ krūšu apkārtmērs**, **kondīcija** (taustot)
   uzsākot _____ un pabeidzot _____ eksperimentu
   (vai 1 x mēnesī);
   Kopējais vistu /cāļu svars kontroles un eksperimentālajiem putniem atsevišķi uzsākot _____ un pabeidzot _____ eksperimentu.
5. **Resno zarnu mikrobiomas paraugi**

uzsākot _____ un pabeidzot _____ eksperimentu

6. **Asins hematoloģiskās un bioķīmiskās analīzes pēc iespējas**
   uzsākot _____ un pabeidzot _____ eksperimentu vismaz 5 putniem katrā grupā; ņem paraugus) – ASAT, GGT, TP, albumīns, BUN, kreatinīns, kop.holesterīns; Kop. bilirubīns, ALP, Ca, P.
7. **Ēstgriba**
   (vēlams uzreiz salīdzināt ar kontroles grupu!):
   a. Detalizēta informācija par pamatbarību
      _____
      _____
      (ko saņem arī kontroles grupa).
      Ja nevar nemainīt pamatbarību eksperimenta gaitā, tad jānorāda visas izmaiņas tajā.
   b. Noskaidrot ēdināšanas īpatnības
      _____
      _____
      (vai ir rupjā barība visu laiku silē, kāda tā ir, cik ilgi tukšas siles, vai tiek siles tīrītas)
      Pirms eksperimenta noteikti visas siles jāiztīra - jo daudzviet to nedara, bet smaka

samazina apēstās barības daudzumu. Vai pie spēkbarības siles var ēst visi eksperimentā iekļautie putni vienlaicīgi.

c. Vai garšo? _____ (Cik bieži pieiet ēst/ cik ilgi ēd?)
d. Cik dienā apēd barību, saturošu skuju biezo ekstraktu (datums, nosver vienā dienā no rīta iedoto un vakarā - no siles izņemto barību) – pirmā dienā, septītā dienā, 14 dienā un t.t.
e. Ko atstāj neēstu no barības _____ (novērtēt paliekas)
f. Pakaļpuses tīrība (5 punkti – Dag score) – skalas attēlu var atrast internetā.
g. Acu gļotādu krāsa (5 punkti – Famacha scoring) - skalu var atrast internetā.
h. Fēču konsistence – 1-3 punktu skalā

8. **Stress** _____
(turas bars kopā, vai kāds atsevišķi (atdalīšanās ir depresija - slimības pazīme), diareja; bars skrien, staigā vairāk-mazāk ēd vai guļ (katru gadījumu pieraksta – datumu, un kāpēc ir stress). Vai pie vistām/cāļiem eksperimenta periodā nav bijis kāds dzīvnieks/svešs cilvēks u.c. stresors? Pārgrupēšana? Vakcinācijas vai citas vet. manipulācijas).
9. **Slimās vistas/cāļi _____** (skaits, novērtēt, individuāli aprakstīt katru dienu izmaiņas katra slimā putna klīnikā līdz nobeigš./izveseļošanās)

Temperaments (±depresija/parēze/krampji);
ēstgriba,; klepošana, izdalījumi no mutes/acīm/nāsīm/ maksts;
ānusa apkārtnes tīrība; fēces – konsistence, krāsa, defekācijas biežuma izmaiņas;
ķermeņa kondīcija (5 punktu skala) – internetā
spurekļa kustības (2 min. laikā)
ķermeņa temperatūra; acu gļotādu krāsa;
Asins hematoloģiskās un bioķīmiskās analīzes – ASAT, GGT, TP, alb., BUN, kreatinīns, Kop.holesterīns; Kop. Bilirubīns un tiešais (konj.) bilirubīns, Ca, P, Mg;
rektālo fēču paraugu noņemt mikrobioma analīzei.
slimošanas ilgums un rezultāts.

10. **Nobeigušās vistas/cāļi:**

_____
(Datums, katras vistas/cāļa vecums, svars)
kā nobeidzās,
ārējās īpatnības pirms nobeigšanās (piem., krampji/ paralīze/noasiņošana) un līķim, piem., kondīcija; ānusa, mutes, acu apkārtnes tīrība, izdalījumi, apsārtums. Fēces – konsistence, krāsa. Ja sekcē – izmaiņas orgānos (īpaši gremošanas org., spureklī, glumeniekā, zarnās), arī plaušās, aknās, nierēs]- no ļoti svaiga līķa varētu paņemt paraugus mikrobioma noteikšanai no spurekļa un resnajām zarnām (aklās zarnas, loka zarnas), un sasaldēt!

11. **Papildus novērojumi, piezīmes.**

_____
_____
_____

12. **Piezīmes**

_____
_____
_____

_____ (_____)
(paraksts) (vārds , uzvārds)

Anketa Dējējvistas / broileri / cāli

Darba lapa

3 punkts	Vistas / cāļu vecums (dienās)	
	uzsākot	beidzot
Eksperimenta grupa		
Kontroles grupa		

4 punkts	Individuālais vistas / cāļu svars/ krūšu apkārtmērs, kondīcija			
	svārs		krūsu apkartmērs	
	uzsākot	beidzot	uzsākot	beidzot
Eksperimenta grupa				
Kontroles grupa				

5 punkts	Resno zarnu mikrobiomas paraugi	
	uzsākot	beidzot
Eksperimenta grupa		
Kontroles grupa		

LAD projekts Nr. 18-00-A01620-000042,
"Bioefektīvas dzīvnieku pārtikas izstrāde bioloģiskām saimniecībām"

Anketas ieteicamie jautājumi
Aitas/atšķirtie jēri

1. Novietnes nosaukums_____

aitu šķirne_____ vecums _____

Ganāmpulkā esošās infekcijas

_____

_____

2.Vai _____un kad _____ ir attārpoti dzīvnieki?
Ar ko? _____ (preparāta nosaukums)

3.Eksperimentā vēlams iezīmēt kontroles un eksperimentālos dzīvniekus
siev. _____un vīr. _____ dzimuma īpatņus
vēlams katrā grupā likt vienādā skaitā un, vēlams iezīmēt
piem.: zila un sarkana krāsa uz muguras/izolācijas lenta ap kāju)

NB! Visus pierakstus veic atsevišķi kontroles grupai un eksperimenta grupai.

4.Aitu vecums (dienās) uzsākot _____ un _____ pabeidzot eksperimentu

5.Individuālais aitu/jēru svars/ krūšu apkārtmērs, **kondīcija** (taustot) uzsākot _____ un _____ pabeidzot eksperimentu (vai 1 x mēnesī),

vai kopējais aitu/jēru svars kontroles un eksperim. dzīvniekiem atsevišķi uzsākot _____ un _____ pabeidzot eksperimentu.

NB! Papildus svēršana/ mērīšana, ja veicamas kādas izmaiņas menedžmentā, tad tajā dienā veic visu eksperimentālo un kontroles dzīvnieku svēršanu/mērīšanu.

6.Koproloģiskie izmeklējumi tieši pirms eksperimenta uzsākšanas
(neskatoties, ka ir veikta attārpošana) _____ (kādu parazītu oliņas atrodamas, cik daudz)

7.Spurekļa un resno zarnu mikrobioma paraugi
uzsākot _____ un _____ pabeidzot eksperimentu
un, ja iespējams, eksperimenta vidējā posmā – piem., kad dzīvnieki tiek fiksēti vakcinācijai).

a. no spurekļa var iegūt ar spurekļa punkciju (ar šļirci un parasto 14G adatu);
b. resno zarnu paraugu vieglāk iegūt – rektāli ievadot pirkstus/instrumentu. *Fēču paraugu nav ieteicams ņemt no zemes, jo tur spiras ir kontaminētas ar apkārtējās vides baktērijām.*

8.Asins hematoloģiskās un bioķīmiskās analīzes
uzsākot _____ un _____ pabeidzot eksperimentu
vismaz 5 dzīvniekiem katrā grupā; ņem paraugus no jūga vēnas, – ASAT, GGT, TP, albumīns, BUN, kreatinīns, kop.holesterīns; Kop. bilirubīns, ALP, Ca, P.

9.Ēstgriba
(vēlams uzreiz salīdzināt ar kontroles grupu!):

i. Detalizēta informācija par pamatbarību
_____
_____
(ko saņem arī kontroles grupa).
Ja nevar nemainīt pamatbarību eksperimenta gaitā, tad jānorāda visas izmaiņas tajā.
j. Noskaidrot ēdināšanas īpatnības
_____

_____ (vai ir rupjā barība visu laiku silē, kāda tā ir, cik ilgi tukšas siles, vai tiek siles tīrītas) Pirms eksperimenta noteikti visas siles jāiztīra - jo daudzviet to nedara, bet smaka samazina apēstās barības daudzumu. Vai pie spēkbarības siles var ēst visas eksperimentā iekļautās aitas vienlaicīgi.

k. Vai garšo? _____ (Cik bieži pieiet ēst/ cik ilgi ēd?)
l. Cik dienā apēd barību saturošu skuju biezo ekstraktu (datums, nosver vienā dienā no rīta iedoto un vakarā - no siles izņemto barību) D1, D7, D14...
m. Ko atstāj neēstu no barības _____ (novērtēt paliekas)
n. Pakaļpuses tīrība (5 punkti – Dag score) – skalas attēlu var atrast internetā.
o. Acu gļotādu krāsa (5 punkti – Famacha scoring) - skalu var atrast internetā.
p. Fēču konsistence – 1-3 punktu skalā

10.Stress _____

(bars ganos turas kopā, vai kādi dzīvnieki turas atsevišķi (atdalīšanās ir depresija – slimības pazīme), diareja; bars skrien, staigā vairāk-mazāk ēd vai guļ (katru gadījumu pieraksta – datumu, un kāpēc ir stress). Vai pie aitām/jēriem eksperimenta periodā nav bijis kāds dzīvnieks/svešs cilvēks u.c. stresors? Pārgrupēšana? Vakcinācijas vai citas vet. manipulācijas.)

11.Slimās aitas/jēri _____

(skaits, novērtēt katru dienu un aprakstīt individuāli katru slimo, klīnikās izmaiņas līdz nobeigš./izveseļošanās)

Temperaments (±depresija/parēze/krampji);
ēstgriba,; klepošana, izdalījumi no mutes/acīm/nāsīm/ maksts;
ānusa apkārtnes tīrība;
fēces – konsistence, krāsa, defekācijas biežuma izmaiņas;
ķermeņa kondīcija (5 punktu skala) - internetā
spurekļa kustības (2 min.laikā)
ķermeņa temperatūra (rektālā); acu gļotādu krāsa;
Asins hematoloģiskās un bioķīmiskās analīzes – ASAT, GGT, TP, alb., BUN, kreatinīns, Kop.holesterīns; Kop. Bilirubīns un tiešais (konj.) bilirubīns, Ca, P, Mg;
rektālo fēču paraugu noņemt mikrobioma analīzei.
slimošanas ilgums un rezultāts.

12.Nobeigušās aitas/jēri:

[Datums, katras aitas vecums, svars),
kā nobeidzās,
ārējās īpatnības pirms nobeigšanās (piem., krampji/ paralīze/noasiņošana) un līķim, piem., kondīcija; ānusa, mutes, acu apkārtnes tīrība, izdalījumi, apsārtums. Fēces – konsistence, krāsa. Ja sekcē – izmaiņas orgānos (īpaši gremošanas org., spureklī, glumeniekā, zarnās), arī plaušās, aknās, nierēs- no ļoti svaiga līķa varētu paņemt paraugus mikrobioma noteikšanai no spurekļa un resnajām zarnām (aklās zarnas, loka zarnas), un sasaldēt!

13.Papildus novērojumi, piezīmes.

_____
_____
_____

14.Piezīmes

Datums _____

Paraksts _____

LAD projekts Nr. 18-00-A01620-000042,
"Bioefektīvas dzīvnieku pārtikas izstrāde bioloģiskām saimniecībām"

Anketas ieteicamie jautājumi
Gaļas jaunlopi

1.Novietnes nosaukums_____

Govju/jaunlopu šķirne _____

Vēlams **iezīmēt kontroles un eksperimentālos dzīvniekus -** teles un buļļus vēlams katrā grupā likt vienādā skaitā un vēlams 1:. Iezīmēt var, piem., zila un sarkana krāsa uz muguras/izolācijas lenta ap kāju):

Visus pierakstus veic atsevišķi kontroles grupai un eksperimenta grupai.

2.Govju/jaunlopu vecums (dienas)

uzsākot _____ un _____ pabeidzot eksperimentu

3.Individuālais govju/jaunlopu svars/ krūšu apkārtmērs

uzsākot _____ un _____ pabeidzot eksperimentu

vai kopējais teļu svars kontroles un eksperimentālajiem dzīvniekiem

uzsākot _____ un _____ pabeidzot eksperimentu

(norādot svērto teļu skaitu).

NB! Papildus svēršana/ mērīšana, ja veicamas kādas izmaiņas menedžmentā, tad tai dienā veic visu eksp. un kontroles dzīvnieku svēršanu/mērīšanu.

4.Spurekļa un resno zarnu mikrobioma paraugi

uzsākot _____ un _____ pabeidzot eksperimentu

ja iespējams, eksperimenta pa vidējā posmā - piem., dzīvnieki tiek fiksēti vakcinācijai

c. Vai saimniecībā ir stelles dzīvnieku fiksēšanai?
d. no spurekļa var iegūt ar speciālu metālisko esofagogastrālo zondi (VMF ir, tikai jāpārliecinās, vai tā nav par resnu atšķirtajiem teļiem un jaunlopiem vai ar spurekļa punkciju (ar šļirci un 14G adatu (vislabāk garāku - 10 cm, bet varētu izdoties arī ar 7cm). Abas metodes var veikt labi fiksētam dzīvniekam stellēs (ja tās ir saimniecībā);
e. resno zarnu paraugu vieglāk iegūt rektāli ievadot roku/instrumentu, bet arī – tikai stellēs fiksētam dzīvniekam. *Fēču paraugus var ņemt arī no zemes – no svaigas fēču kaudzes virsas, bet šinī gadījumā pastāv liela iespējamība to kontaminēt ar apkārtējās vides baktērijām.*

5.Asins hematoloģiskās un bioķīmiskās analīzes

uzsākot _____ un _____ beidzot eksperimentu

(vismaz 5 dzīvniekiem katrā grupā; ņem paraugus no astes vēnas, ja iespējams fiksēt stāvvietā vai stellēs) – ASAT, GGT, TP, albumīns, BUN, kreatinīns, kop.holesterīns; kop. bilirubīns, ALP, Ca, P.

6.Ēstgriba (vēlams uzreiz salīdzināt ar kontroles grupu!)

uzsākot _____ un _____ pabeidzot eksperimentu

q. Detalizēta informācija par pamatbarību (ko saņem arī kontroles grupa). Ja nevar nemainīt pamatbarību eksperimenta gaitā, tad jānorāda visas izmaiņas tajā).
r. Vai garšo? – (Cik bieži pieiet ēst/šķirošana/cik pilns spureklis?)
s. Cik dienā apēd barību saturošu skuju un biezo ekstraktu (datums, nosver vienā dienā no rīta iedoto un vakarā - no siles izņemto barību) D1, D7, D14...
t. Ko atstāj neēstu no barības (paliekās novērtē)
u. Fēču konsistence – 1-5 punktu skalā [1-ūdeņainas; 2- pusšķidras; 3-vidēji biezas (krēmveida); 4-kaudzītē ar "riņķiem"; 5-cietas (gandrīz kā "zirgāboli")

7.Piens

_____ (vai teļš vēl zīž)

Piena atdeve _____ (piena tauku, proteīna maiņa)

8.Stress

uzsākot _____ un _____ pabeidzot eksperimentu (agresija, depresija, diareja, neguļ guļvietās, staigā vairāk-mazāk ēd vai guļ (katru gadījumu pieraksta – datumu, un pazīmes). Vai eksperimenta periodā kūtī nav bijis kāds dzīvnieks/svešs cilvēks u.c. stresors? Pārgrupēšana? Vakcinācijas vai citas vet. Manipulācijas)

9.Slimās govis / jaunlopi _____

(skaits, novērtēt katru dienu un individuāli aprakstīt izmaiņas katra slimā dzīvnieka klīnikā līdz nobeigš./izveseļošanās)

Temperaments (±depresija/parēze/krampji);
ēstgriba,; klepošana,
izdalījumi no mutes/acīm/nāsīm/ maksts;
ānusa apkārtnes tīrība;
fēces – konsistence, krāsa, defekācijas biežuma izmaiņas;
spurekļa kustības (2 min.laikā)
ķermeņa temperatūra (rektālā);
(gļotādu krāsa, CRT- ja var noteikt)
Asins hematoloģiskās un bioķīmiskās analīzes – ASAT, GGT, TP, alb., BUN, kreatinīns, kop.holesterīns; kop. Bilirubīns un tiešais (konj.) bilirubīns, Ca, P, Mg
Slimie dzīvnieki varētu būt vieglāk fiksējami, un vieglāk varētu noņemt spurekļa, rektālo fēču paraugu mikrobioma analīzei.
Slimošanas ilgums un rezultāts.

10.Nobeigušās govis / jaunlopi:

(Datums, katras govs vecums, svars, kā nobeidzās)
ārējās īpatnības pirms nobeigšanās (piem., krampji/ paralīze/noasiņošana) un līķim, piem., kondīcija; ānusa, mutes, acu apkārtnes tīrība, izdalījumi, apsārtums. Fēces – konsistence, krāsa. Ja sekcē – izmaiņas orgānos (īpaši gremošanas org., glumeniekā, zarnās), arī plaušās, aknās, nierēs]- no ļoti svaiga līķa varētu paņemt paraugus mikrobioma noteikšanai no spurekļa un resnajām zarnām (aklās zarnas, loka zarnas), un sasaldēt!

11.Papildus novērojumi, piezīmes.

12.Piezīmes

_____
_____
_____

Datums _____

Paraksts _____

5. Projekta dalībnieku veikto pētījumu apraksts

5.1. Rīgas Stradiņa universitāte

5.1.1. Skuju biezo ekstraktu saturošu šķidrumu gatavošana

Skuju biezajam ekstraktam tā sastāvdaļu īpašību dēļ izteiktākas ir hidrofobās (nešķīst ūdeni) īpašības. Tādēļ nevar pagatavot īstu ūdens šķīdumu. Skuju biezā ekstrakta šķidrumi gatavoti trīs koncentrācijās. Pagatavoto skuju biezo ekstraktu saturošu šķidrumu raksturojums dots 5.1.tabulā.

Tabula 5.1. **Skuju ekstraktu saturošu šķidrumu vizuālais novērtējums**

Nr. p. k.	Šķīdinātājs	Skuju biezā ekstrakta koncentrācija	Šķidruma apraksts
1.	Attīrīts ūdens	3 % 5 % 10 %	Zaļas krāsas suspensija. Suspendētās daļiņas nenogulsnējas (skat.5.1.att.)
2.	20% etilspirta šķīdums	3 % 5 % 10 %	Zaļganas krāsas suspensija. Suspendētās daļiņas nenogulsnējas (skat.5.2.att.)
3.	70% etilspirta šķīdums	3 % 5 % 10 %	Šķidrums ar granulveida tumšām nogulsnēm. Daļa nogulšņu pielipusi pie trauka sienām (skat.5.3.att.)
4.	50% propilēnglikola šķīdums	3 % 5 % 10 %	Gaiši zaļgana suspensija ar nedaudz tumšām granulveida nogulsnēm šķidruma augšdaļā. Caurspīdīgs zaļgans šķidrums ar tumšām nogulsnēm virs tā. Nogulsnes ir apmēram puse no šķidruma (skat.5.4.att.)
5.	70% propilēnglikola šķīdums	3 % 5 % 10 %	Gaiši pelēcīgs caurspīdīgs šķidrums ar tumšām nogulsnēm virs tā. Gaiši zaļgans caurspīdīgs šķidrums ar tumšām nogulsnēm virs tā. Zaļgans, gaiši dzeltenīgu nokrāsu caurspīdīgs šķidrums ar nogulsnēm. Nogulsnes ir apmēram trešdaļa no šķidruma (skat.5.5.att.)
6.	50% propilēnglikola šķīdums, saturošs 20% etilspirta	3 % 5 % 10 %	Gaiši zaļgans, viegli duļķains šķidrums ar nogulsnēm virs tā. Gaiši zaļgans, dzeltenīgs, viegli duļķains šķidrums ar nogulsnēm virs tā. Dzeltenīgi zaļgans caurspīdīgs šķidrums. Virs tā izkliedētas nedaudz tumšas nogulsnes. Nogulsnes ir apmēram puse no šķidruma (skat.5.6.att.)

5.1. attēls.

a b c
Šķidrumi saturoši a – 3%, b – 5%, c – 10% skuju biezo ekstraktu, šķīdinātājs attīrīts ūdens

5.2. attēls.

a b c
Šķidrumi saturoši a – 3%, b – 5%, c – 10% skuju biezo ekstraktu, šķīdinātājs 20% etilspirta šķīdums

5.3. attēls.

a b c
Šķidrumi saturoši a – 3%, b – 5%, c – 10% skuju biezo ekstraktu, šķīdinātājs 70% etilspirta šķīdums

5.4. attēls

a b c
Šķidrumi saturoši a – 3%, b – 5%, c – 10 skuju biezo ekstraktu, šķīdinātājs 50% propilēnglikola šķīdums

5.5. attēls

a b c
Šķidrumi saturoši a – 3%, b – 5%, c – 10% skuju biezo ekstraktu,šķīdinātājs 70% propilēnglikola šķīdums

5.6. attēls

a b c
Šķidrumi saturoši a – 3%, b – 5%, c – 10% skuju biezo ekstraktu, šķīdinātājs 50% propilēnglikola šķīdums, saturošs 20% etilspirta

Visiem pagatavotajiem šķidrumiem pēc 6 mēnešu glabāšanas tumšā vietā aprakstītais vizuālais izskats saglabājās.

5.1.2. Skuju biezo ekstraktu saturošu premiksu gatavošana

Priežu un egļu skuju ķīmiskajā sastāvā ir daudz bioloģiski aktīvu vielu, tām piemīt baktericīdas un pretvīrusu īpašības, imūnmodelējošās, antioksidatīvās funkcijas, satur vairākus vitamīnus un provitamīnus (C, B1, B2, K, P u.c.), ēteriskās eļļas, sveķus, minerālsāļus, cieti utt. Paredzēts izstrādāt jaunus bioefektīvus dzīvnieku pārtikas produktus (paraugus), izmantojot barības pamatsubstances (klijas, ogļhidrāti, mikroelementi u.c.), pievienojot skuju biezo ekstraktu. Skuju biezā ekstrakta deva dienā vienai vistai, cālim, teļam vai jēram ir 30 mg/kg. Lai cāļi, vistas vai produktīvie dzīvnieki varētu saņemt nepieciešamo skuju biezā ekstrakta devu un būtu nedaudz maskēta ekstrakta specifiskā garša, skuju biezo ekstraktu jāsamaisa ar papildbarību - barības piedevu, kuru drīkst izmantot dzīvnieku ēdināšanai tikai kopā ar citu barību un kura koncentrācija pilnvērtīgā barības maisījumā ir lielāka nekā 20 kg/t.

Lai pagatavotu skuju biezo ekstraktu saturošus premiksus lietošanai bioloģiskajās saimniecībās, pagatavoti skuju biezā ekstrakta un papildbarības maisījumu paraugi.

Izmēģināti 2 varianti skuju biezā ekstrakta un papildbarības masas **gatavošanai**:

I variants	II variants
skuju biezā ekstrakta samaisītās ar papildbarību masas granulēšana ar mitrās granulēšanas metodi	skuju biezā ekstrakta samaisīšana ar papildbarību

Mitrās granulēšanas metodi neizmantojām, jo no pagatavotā skuju biezā ekstrakta un papildbarības maisījuma grūti veidojas granulas un ir lieli masas zudumi granulēšanas laikā. Tāpēc paraugi gatavoti ar maisīšanas metodi.

Ar maisīšanas metodi pagatavotie paraugi saturēja 10% skuju biezā ekstrakta. To kvalitāte vērtēta organoleptiski. Rezultāti apkopoti 5.2.tabulā.

Tabula 5.2. **Skuju biezā ekstrakta un papildbarības maisījumi**

Nr. p.k.	Papildbarība	Papildbarības daļiņu lielumi	Skuju biezā ekstrakta daudzums maisījumā, %	Maisījuma apraksts
1.	Pilnvērtīga barība 0 – 8 ned.vec. cāļiem biosaimniecībām	2 mm	10	Maisījuma masa nedaudz ķepīga (skat.5.7.att.)
2.	Pilnvērtīga barība 0 – 28 d.v. broileriem biosaimniecībām	2 mm	10	Nedaudz birstošs maisījums
3.	Pilnvērtīga barība 28 – 63 d.v. broileriem *Grower* biosaimniecībām	Nesijāta papildbarība	10	Nedaudz ķepīgs maisījums
4.	Pilnvērtīga barība jaunputniem biosaimniecībām	2 mm Nesijāta papildbarība	10	Nedaudz birstošs maisījums Ķepīgs maisījums

Nr. p.k.	Papildbarība	Papildbarības daļiņu lielumi	Skuju biezā ekstrakta daudzums maisījumā, %	Maisījuma apraksts
5.	Pilnvērtīga barība dējējvistām biosaimniecībām	2 mm	10	Nedaudz birstošs maisījums (skat.5.10.att.)
6.	DOFEED -Papildbarība 2,5% putniem	Nesijāta papildbarība Daļiņas mazākas par 2 mm	10	Ķepīga masa (skat.5.9.att.)
7.	Pilnvērtīga barība broileriem *Finisher* biosaimniecībām	Nesijāta papildbarība	10	Nedaudz ķepīgs maisījums
8.	Bio papildbarība 0 – 2 m.v.teļiem	Nesijāta papildbarība, daļiņas lielākas par 3 mm	10	Ķepīgs maisījums (skat.5.8.att.)

Nesijāta papildbarība ir maisījums no dažāda lieluma daļiņām. Daļiņu lielums variē no 0.25 mm līdz 2-3 mm. Lielāko daļiņu daudzums variē 60 – 70%.

5.7.attēls.

Pilnvērtīga barība 0 – 8 ned.vec. cāļiem biosaimniecībām, saturoša 10% skuju biezā ekstrakta

5.8. attēls

Bio papildbarība 0 – 2 m.v.teļiem, saturoša 10% skuju biezo ekstraktu

5.9. attēls

DOFEED - Papildbarība 2,5% putniem, saturoša 10% skuju biezo ekstraktu

5.10. attēls

Pilnvērtīga barība dējējvistām biosaimniecībām, saturoša 10% skuju biezo ekstraktu

Papildbarības un skuju biezā ekstrakta maisījumi, kas paredzēti izbarošanai cāļiem/vistām/teļiem/jēriem, satur dažādu skuju biezā ekstrakta daudzumu. Skuju biezā ekstrakta daudzumu maisījumos ietekmē cāļa/vistas/teļa/jēra svars eksperimenta sākumā, svara pieaugums katru nedēļu premiksa lietošanas laikā. Katru nedēļu atbilstoši jēra, cāļa, vistas/teļa masas pieaugumam jāpalielina izbarojamais papildbarības daudzums un tajā iestrādājamais skuju biezā ekstrakta daudzums. 20 cāļiem/20 vistām/11 teļiem/20 jēriem izbarošanai mēneša laikā tika gatavoti 24 premiksi-koncentrāti - skuju biezā ekstrakta un papildbarības maisījumi (148 kg).

Skuju biezā ekstrakta daudzuma aprēķināšanai papildbarībā **vienam** jēram/teļam-jaunlopam/vistai/cālim ***nedēļas*** lietošanai lieto sekojošu formulu:

$E = [(D \times M) : 1000] \times 7$

kur: *E – skuju biezā ekstrakta daudzums **g**, ko lieto kopā ar papildbarību 7 dienu laikā*
D - 30 mg/kg (skuju biezā ekstrakta deva)
M - svars kg (jēra/teļa/vistas/cāļa)
7 – dienu skaits.

Tā kā eksperimenta grupā bija 20 cāļi/jēri vai 11 jaunlopi, tad skuju biezā ekstrakta daudzumu vienam cālim/jēram/jaunlopam 7 dienām reizina ar cāļu/jēru/jaunlopu skaitu eksperimenta grupā.

$Eg = E \times n,$

kur: *Eg – skuju biezā ekstrakta daudzums g 7 dienām eksperimenta grupai*
n - eksperimentā 7 dienām iesaistītu putnu/jēru/jaunlopu skaits

Datus par izbarojamās papildbarības daudzumu un tā palielināšanos katru nedēļu sniedza biosaimniecību kontaktpersonas.

Barības daudzums, ko izbaro vienam putnam, jēram vai jaunlopam nedēļas laikā ir paliels. Eksperimenta grupai, ņemot vērā putnu/jēru/jaunlopu skaitu, izbarojamais papildbarības daudzums palielinās, piem., 20 cāļiem pirmās nedēļas laikā jāizbaro 3,36 kg, bet ceturtās nedēļas laikā - 5,32 kg papildbarības, 20 jēriem pirmās nedēļas laikā jāizbaro 168 kg un ceturtās nedēļas laikā – 210 kg papildbarības. Lai 4 nedēļu eksperimentam nebūtu jāgatavo lieli papildbarības un skuju biezā ekstrakta maisījuma daudzumi, gatavojām mazāka daudzuma papildbarības un skuju biezā ekstrakta maisījumus – koncentrātus jeb premiksus. Skuju biezā ekstrakta daudzums premiksā ir lielāks nekā aprēķinātājā eksperimentālajā barībā – papildbarības un skuju biezā ekstrakta maisījumā. Skuju biezā ekstrakta daudzuma premiksā aprēķināšanai izmanto formulu:

Ek = (Eg x pb) : pm,

kur: Ek- skuju biezā ekstrakta daudzums premiksā-koncentrātā, g
Eg - skuju biezā ekstrakta daudzums g 7 dienām eksperimenta grupai
pb - papildbarības daudzums, g 7 dienām eksperimenta grupai
pm – plānotais koncentrāta-premiksa daudzums, g

Premiksa gatavošanai izmanto aprēķināto skuju biezā ekstrakta Ek daudzumu un papildbarības daudzumu, ko iegūst

Pk = pm – Ek,

kur: Pk – papildbarības daudzums g koncentrāta-premiksa gatavošanai
pm - plānotais koncentrāta-premiksa daudzums, g
Ek- skuju biezā ekstrakta daudzums premiksā-koncentrātā, g

Koncentrāta-premiksa gatavošanai skuju biezā ekstrakta aprēķinātam daudzumam Ek pa daļām pievieno aprēķinātās papildbarības daudzumu Pk. Masu pēc katras papildbarības daļas pievienošanas maisa līdz viendabīgam maisījumam.

Katrai eksperimenta nedēļai jāgatavo atsevišķs premiks-koncentrāts, jo ņemot vērā cāļa/jēra/jaunlopa masa palielināšanos nedēļas laikā arī skuju biezā ekstrakta daudzums jāpalielina katras nākamās nedēļas premiksā.

Eksperimentālās papildbarības pagatavošanai 7 dienu lietošanai premiksu-koncentrātu jāsamaisa ar papildbarības daudzumu, ko iegūst no papildbarības daudzuma (pb) atņemot pagatavotā premiksa-koncentrāta daudzumu (pm) (piemēru skat. 5.3.tabulā).

Tabula 5.3. **Eksperimentālās barības pagatavošana jēru barošanai 4 nedēļām**

Nedēļa	Eksperimentālās barības (EB) pagatavošana	Jēru skaits	EB daudzums 7 dienās 20 jēriem, kg
1. nedēļa	15 kg premiksa Nr.1 samaisīt ar 153 kg papildbarības	20	168 kg
2. nedēļa	15 kg premiksa Nr.2 samaisīt ar 167 kg papildbarības.	20	182 kg
3. nedēļa	15 kg premiksa Nr.3 samaisīt ar 181 kg papildbarības	20	196 kg
4. nedēļa	15 kg premiksa Nr.4 samaisīt ar 195 kg papildbarības.	20	210 kg

5.2. Pārtikas drošības, dzīvnieku veselības un vides zinātniskais institūts "BIOR"

5.2.1. Karotīna un hlorofila noteikšana produktu paraugos

Skuju biezā ekstrakta, kā izejvielas raksturošanai projekta sadarbības partneris Pārtikas drošības, dzīvnieku veselības un vides zinātniskais institūts "BIOR" noteica hlorofilu un karotīnu daudzumus. Pagatavotajos pētāmajos paraugos – skuju biezo ekstraktu saturošos šķidrumos un premiksos tika noteikta hlorofila koncentrācija izmantojot UV-vis spektrofotometrisko metodi un β-karotīna un tā izomēru koordinācijas noteikšanu veica izmantojot īpaši augstas veiktspējas šķidruma hromatogrāfijas metodi. UAEŠH.

Hlorofila un β-karotīna un tā izomēru daudzumi noteikti dažos pētāmajos paraugos arī pēc 6 mēnešu glabāšanas istabas temperatūrā.

Hlorofila un β-karotīna un tā izomēru daudzums skuju biezo ekstraktu saturošajos šķidrumos dots 5.4.tabulā.

Tabula 5.4. **Hlorofila un β-karotīna un tā izomēru saturs skuju biezo ekstraktu saturošos šķidrumos**

Šķidrums	Hlorofilu saturs, mg/100g		Hlorofilu saturs nogulsnēs, mg/100g	β-karotīns, mg/L pēc pagatavo-šanas	Karotīnu izomēru summa,	
	Pēc pagata-vošanas	6 mēn. pēc gatavoš.			Pēc pagata-vošanas	6 mēn. pēc gatavoš.
3% šķidrums 20% etilspirta šķīdumā	25	6,4		51	128 mg/L	28 mg/kg
5% šķidrums 20% etilspirta šķīdumā	35	9,5		87	209 mg/L	29 mg/kg
10% šķidrums 20% etilspirta šķīdumā	48	13		200	507 mg/L	252 mg/kg
3% šķidrums 70% etilspirta šķīdumā	1,3				<5	
5% šķidrums 70% etilspirta šķīdumā	2,3		52		<5	
10% šķidrums 70% etilspirta šķīdumā	4,7		74		<5	
3% šķidrums, šķīdinātājs ūdens		11				31 mg/kg
5% šķidrums, šķīdinātājs ūdens		12				81 mg/kg
10% šķidrums, šķīdinātājs ūdens	82	20		64	173 mg/L	337 mg/kg

Šķidrumi, saturoši 3%, 5% un 10% skuju biezo ekstraktu un gatavoti ar 50% propilēnglikola šķīdumu, 70% propilēnglikola šķīdumu un 50% propilēnglikola šķīdumu, saturošu 20% etilspirta bija viegli duļķaini ar nogulsnēm. Nogulsnes bija sakoncentrējušās šķidrumu virspusē. Saskalojot šķidrumus, nogulsnes nesuspendēja.

Šādos šķidrumos hlorofila, β-karotīna un tā izomēru daudzums netika analizēti.

Hlorofila un karotīnu izomēru daudzums skuju biezo ekstraktu saturošajos premiksos dots 5.5.tabulā.

Tabula 5.5. **Hlorofila un karotīnu izomēru saturs skuju biezo ekstraktu saturošos premiksos**

Paraugs	**Hlorofilu saturs paraugā**			**Karotīnu izomēru summa paraugā**		
	pēc pagatavo-šanas, mg/100 g	**Glabāts**		**pēc pagatavo-šanas mg/kg**	**Glabāts**	
		ist. temp., 4 mēn. mg/100 g	**40ºC 3 mēn. mg/100 g**		**ist. temp. 4 mēn. mg/kg**	**40ºC 3 mēn. mg/kg**
Pilnvērtīga barība 0 – 28 d.v. broileriem, saturoša 10% skuju biezo ekstraktu	27	14	8	9,5	8,9	< 1
Pilnvērtīga barība dējējvistām, saturoša 10% skuju biezo ekstraktu	28	11	14	6,9	4,1	3,7
Bio papildbarība 0 – 2 m.v. teļiem, saturoša 10% skuju biezo ekstraktu	26	19	18	3,5	15	4,1
Pilnvērtīga barība jaunputniem, saturoša 10% skuju biezo ekstraktu	25	5,6	7	6,1	2,8	1,2
Pilnvērtīga barība 0 – 8 ned.vec. cāļiem, saturoša 10% skuju biezo ekstraktu	24	15	24	8,9	6,6	4,9
Pilnvērtīga barība broileriem Finisher, saturoša 10% skuju biezo ekstraktu	17	8,8	11	4,5	3,1	1,1
Pilnvērtīga barība 28 – 63 d.v. broileriem Grower, saturoša 10% skuju biezo ekstraktu	18	8,4	17	4,9	3,4	4,8
Premiks 1 (1.nedēļai) cāļiem	8,7			6,9		
Premiks 2 (2.nedēļai) cāļiem	9,9			8,7		
Premiks 3 (3.nedēļai) cāļiem	11			9,5		
Premiks 4 (4.nedēļai) cāļiem	13			8,9		

Dati 5.5. tabulā rāda, ka hlorofila un karotīnu izomēru daudzumi premiksu paraugos samazinās pēc to glabāšanas 4 mēnešus ist. temperatūrā un 3 mēnešus 40º C temperatūrā. Paraugu vizuālais izskats arī liecina par hlorofila un karotīnu izomēru oksidēšanos (skat. 5.11.un 5.12..att.)

5.11.attēls

Pilnvērtīga barība dējējvistām, saturoša 10% skuju biezo ekstraktu glabāta 4 mēnešus istabas temperatūrā

5.12. attēls

Pilnvērtīga barība broileriem Finisher, saturoša 10% skuju biezo ekstraktu pēc glabāšanas 40º C temperatūrā 3 mēnešus

5.2.2. Cecal mikrobiotas daudzveidība un eksperimentālas barošanas grupās novērotās tendences

Bioloģiskā ZS "Skujas" inkubatorā izaudzēti četrpadsmit dienu veci dažādu šķirņu cāļi, ieskaitot Rhode Island sarkanā, Krēma Legbar, Leggorn tika sadalīti četrās grupās pa divdesmit cāļiem. Kontroles grupas cāļi saņēma standarta bioloģisko barību bez piedevām; otrās grupas cāļi saņēma to pašu barību, saturošu skuju biezā ekstrakta daudzumu, aprēķinātu izmantojot ekstrakta devu 30 mg/kg uz cāļa ķermeņa masu; trešās grupas cāļu eksperimentālās barības sastāvā esošā ekstrakta daudzuma aprēķinam izmantota ekstrakta deva 60 mg/kg uz cāļa ķermeņa masu; bet ceturtajā eksperimentālajā grupā - 90 mg/kg.

Visi cāļi saņēma barību 40 dienas. Pirmā (kontroles), otrā un trešā grupa labi uzņēma parasto un eksperimentālo barību un no barības atteikuma gadījumi nav bijuši. Trešajā grupā (70% gadījumos) bija novēroti zarnu trakta darbības traucējumi, iespējams, saistīti ar skuju ekstrakta augsto devu (šī grupa pētījumā nav ņemta vērā).

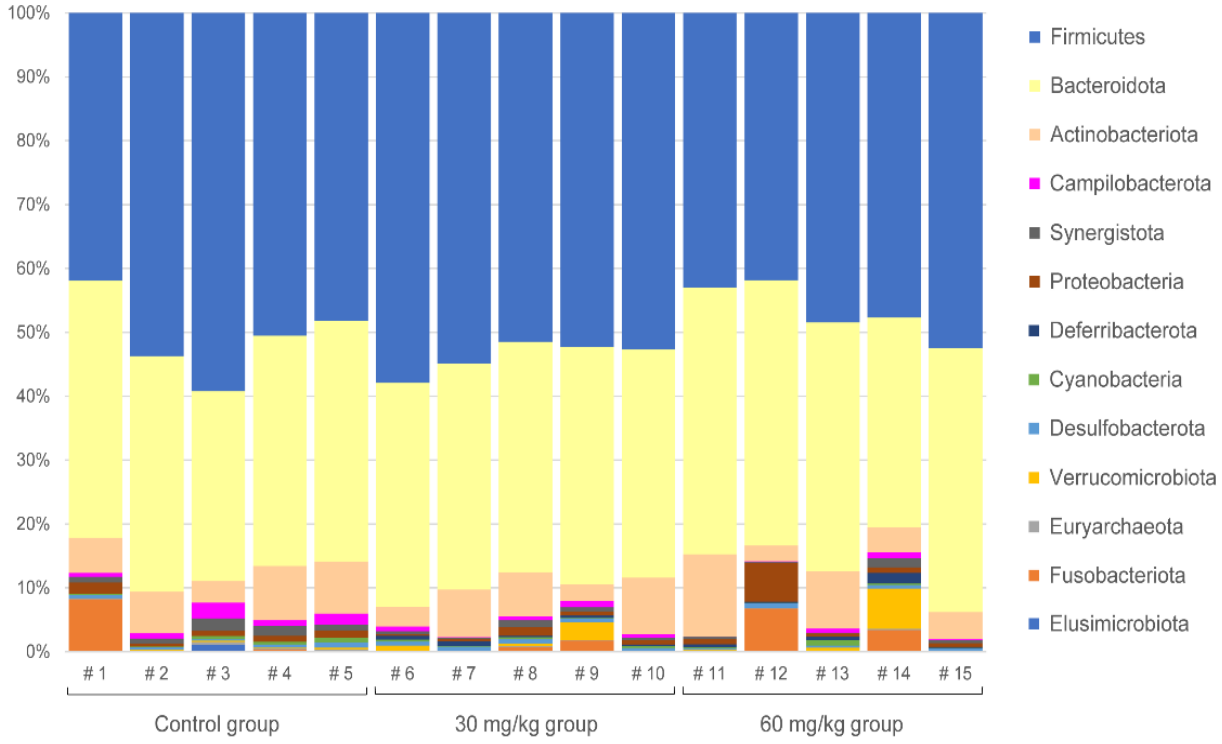
40 dienas veci cāļi bija nonāvēti nobīdot kakla skriemeļus. Īpašās, pildītās ar ledu, sterilās kastēs paraugi nosūtīti uz Pārtikas drošības, dzīvnieku veselības un vides zinātniskā institūta "BIOR" specializēto laboratoriju. Visas procedūras notika saskaņa ar Latvijas Republikas Pārtikas un veterinārā dienesta vadlīnijām un EK Padomes 2009. gada 24. septembra Regulas nr. 1099/2009 par dzīvnieku aizsardzību nonāvēšanas laikā prasībām. Ievērojot noteikto kārtību un visas nepieciešamās prasības bija atlasīti piecpadsmit paraugi.

Kopumā no piecpadsmit paraugiem tika ģenerēti 6 423 182 nolasījumi, sākot no 361 090 līdz 489 066 rādījumiem vienā paraugā. Pēc datu tīrīšanas un priekšapstrādes soļa palika 2 144 509 funkcijas. Vidējais pazīmju skaits vienā paraugā bija 142 967, no zemākā pārklājuma – 121 506 – līdz augstākajam – 158 486. Alfa daudzveidības retināšanas līknes tika izveidotas, lai pārbaudītu, vai ir sasniegts pietiekams sekvencēšanas dziļums. Shannon daudzveidības indeksa piesātinājums tika sasniegts attiecīgi aptuveni pie 10 000 un 110 000 funkcijām visām barošanas grupām.

Galvenā baktēriju phyla, kas tika novērota, bija *Firmicutes* (53,44% vidējais relatīvais daudzums), *Bacterioidota* (33,14%), *Actinobacteriota* (6,43%), *Fusobacteriota* (1,60%) un *Proteobacteria* (1,37%). Pārējo phyla pārpilnība bija vidēji mazāka par 1%. Katra parauga sastāvs phyla līmenī ir attēlots 5.13. attēlā.

5.13. attēls

Cecal mikrobiotas phylum līmeņa sastāvs. Trīs grupas (pieci atkārtojumi katrā grupā) ar atšķirīgu piedevas koncentrāciju



Pēc tam tika novērtēta skujkoku biezā ekstrakta barības piedevas ietekme uz cecal mikrobiomu alfa daudzveidību. Tika aprēķināti trīs dažādi alfa daudzveidības mērījumi. Spīrmana korelācija atklāja nozīmīgu saistību (P = 0,0014) starp novēroto iezīmju skaitu un denoizēto rādījumu skaitu uz izlasi, kas tika sagaidīta, jo ar lielāku sekvencēšanas dziļumu var parādīties neīstāki ASV. Tomēr citi alfa daudzveidības rādītāji nekorelēja ar secības dziļumu, tāpēc tika pieņemts, ka citi daudzveidības pasākumi nav neobjektīvi pēc izlases lasīšanas skaita. Novēroto iezīmju skaits un Simpson indekss būtiski nekorelēja ar ekstrakta barības piedevas koncentrāciju, savukārt Šenona indekss uzrādīja negatīvu korelāciju ar barības piedevas devu (ρ = -0,6236, P = 0,013).

Lai novērtētu starpparaugu (beta) daudzveidību, starp visiem paraugiem tika aprēķināti Bray-Curtis un vispārinātie UniFrac attālumi. Nebija būtiskas korelācijas starp beta daudzveidības mērījumiem un rādījumu skaitu, tādējādi norādot, ka arī šie rādītāji nav neobjektīvi atbilstoši secības dziļumam. Gan Bray-Curtis, gan vispārinātā UniFrac beta daudzveidības mērījumi uzrādīja nozīmīgu pozitīvu korelāciju ar barības piedevas koncentrāciju (attiecīgi ρ = 0,473644, P = 0,001 un ρ = 0,267187, P = 0,003). Vienpadsmit atšķirīgi bagātinātas ģintis cecal saturam no putniem, kas baroti ar skujkoku biezo ekstraktu bagātinātu barību, salīdzinot ar kontroles grupu, tika identificētas, izmantojot vispārēju lineāro modeļu sistēmu (5.6. tabula). Četras no tām, kas piederēja pie *Bacteroidaceae, Marinifilaceae, Prevotellaceae un Deferribacteraceae* dzimtas, bija bagātīgāki, kad barība tika papildināta ar skujkoku biezo ekstraktu. Septiņas citas ģintis bija mazāk bagātīgas, kad putni tika baroti ar papildinātu barību: divas pieder pie *Rikenellaceae* dzimtas un citas pieder pie *Barnesiellaceae, Campylobacteraceae, Methanobacteriaceae, Lachnospiraceae un Synergistaceae*.

Tabula 5.6. **Atšķirīgi bagātīgi taksonomi cecal mikrobiotā**

Tips (Phylum)	Klase	Kārta	Dzimta	Ģints	Lineārā modeļa koeficients
Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Bacteroidaceae	*Bacteroides*	0.0543
Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Barnesiellaceae		-0.5771
Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Marinifilaceae	*Odoribacter*	0.2604
Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Prevotellaceae		0.5776
Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Rikenellaceae	*Alistipes*	-0.1958
Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Rikenellaceae	*Rikenellaceae* RC9 gut group	-0.5106
Campilobacterota	Campylobacteria	Campylobacterales	Campylobacteraceae	*Campylobacter*	-0.6528
Deferribacterota	Deferribactere	Deferribacterales	Deferribacteraceae	*Mucispirillum*	0.2749
Euryarchaeota	Methanobacteria	Methanobacteriales	Methanobacteriaceae	*Methanobrevibacter*	-0.1979
Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	*Eubacterium hallii* group	-0.1817
Synergistota	Synergistia	Synergistales	Synergistaceae	*Cloacibacillus*	-0.2144

Saskaņā ar vistas cekāla mikrobiotas baktēriju meta-analīzi *Firmicutes* bija visizplatītākā phyla, kam sekoja *Bacteroidetes* un *Proteobacteria* (13). Mūsu pētījumā tika novērots līdzīgs sastopamības profils - *Firmicutes un Bacteroidetes*, bet nākamā bagātākā phyla bija *Actinobacteriota,* kam sekoja *Fusobacteriota* un tikai pēc tam *Proteobacteria*. Tomēr *Fusobacteriota* sadalījums starp pētījumā izmantotajiem cāļiem bija ļoti nevienmērīgs. Tika novērots, ka Shannon alfa daudzveidības indekss būtiski korelēja ar uztura bagātinātāju devu, savukārt Simpson indeksam korelācija netika novērota, norādot, ka mikrobiotas sastāva maiņa skar galvenokārt mazākuma taksonomas, nevis dominējošās, jo Shannon indekss piešķir lielāku nozīmi sugu bagātībai un tādējādi ir jutīgāks pret nelielām iezīmēm (14). Būtiskā korelācija starp beta daudzveidības mērījumiem un katra cāļa saņemtās barošanas piedevas devas atšķirību liecina, ka, neraugoties uz nelielo parauga lielumu un ievērojamām mikrobioma profilu atšķirībām starp indivīdiem, var novērot vispārēju cecal mikrobiotas sastāva maiņu (sk. 5.13. attēlu).

Starp četriem taksonomiem, kas bija bagātīgāki, kad barība tika papildināta ar skujkoku biezo ekstraktu, bija gramnegatīva *Bacteroides* ģints, kas ir izplatīta zarnu mikrobiotas locekle visiem siltasiņu dzīvniekiem (15). *Bacteroides* ir svarīga loma sarežģītu makromolekulu šķelšanā (16) un acetāta un propionāta kā galveno fermentācijas produktu ģenerēšanā.

Odoribacter veic butirāta ražošanu, izmantojot lizīna fermentāciju un sukcināta samazināšanu (17) Rychlik, 2020). Butirāts, īsas ķēdes taukskābe, kas tieši stimulē absorbcijas virsmas laukuma palielināšanos, nomāc zoonozes patogēnu augšanu, izraisa saimniekaizsardzības peptīdu ekspresiju un modulē saimnieku epiģenētisko regulēšanu (18). *Prevotellaceae* dzimtas izolāti nav sīki raksturoti. Kulturomikas *in vitro* pētījumi liecina, ka vistas esošie *Prevotellaceae* ir specializējušās sarežģītu polisaharīdu sagremošanā un dominē mikrobiotā, kad tiek pielietota ar augu šķiedrvielām bagāta barība (17) Rychlik, 2020).

Starp mazāko phyla, kas saistīta ar nobriedušu mikrobiotu, bija ievērības cienīga baktēriju klātbūtne, kas var stimulēt gļotu slāņa veidošanos, kas tāpēc ir saistīta ar veselīgu zarnu, piemēram, *Mucispirillum*, kas tiek uzskatīts par biomarķieri brīvās turēšanas audzētajās vistās (19).

Dažiem baktēriju taksonomiem, kas pieder pie *Barnesiellaceae un Rikenellaceae* dzimtas, samazinājās relatīvais daudzums, kad putni tika baroti ar papildinātu barību. Šie taksonomi pieder pie *Bacteroidale* kārtas, kas ietver gramnegatīvās anaerobās kokobaktērijas, ar saharolītiskām un proteolītiskām darbībām. *Barnesiellaceae* ir ierosināta taksonomiskā grupa, kas vēl nav raksturota. *Rikenellaceae* ir konstatēts peļu aklajā zarnā ar augstu tauku satura izraisītu aptaukošanos un, šķiet, ir ļoti jutīga pret perturbācijām zarnu mikrobiotā, piemēram, pret antibiotiku vai probiotiku piedevas izraisītām (16).

Tādu pašu samazinājumu novēroja *Methanobrevibacter* gadījumā. Daudzi metanogēni izmanto H_2 un CO_2 kā substrātus metāna sintēzei. Metanogēni kā vienīgie enterālā metāna ražotāji ir atbildīgi par lopkopības nozares ieguldījumu klimata pārmaiņās un tādējādi ir kļuvuši par pētniecības centru klimata pārmaiņu mazināšanas stratēģiju izstrādē. 16S rRNS gēnu sekvences, kas cieši saistītas ar noteiktām *Methanobrevibacter* ģints sugām, ir vienas no visbiežāk sastopamajām sekvencēm kuņģa-zarnu trakta paraugos no mājlopiem.

Viena no cecal galvenajām funkcijām ir nesagremojamu polisaharīdu baktēriju fermentācija, lai ražotu īsās ķēdes taukskābes, kuras var absorbēt saimnieka epitēlija šūnas. Šo lomu pilda noteiktas *Firmicutes* (piemēram, *Lachnospiraceae* vai *Ruminococcaceae*) un *Bacteroidetes* (20). *Lachnospiraceae* dzimtas baktērijas nav sastopamas vai ļoti reti sastopamas jaunos cāļos (21).

Visbiežākais bakteriālā gastroenterīta cēlonis ir kampilobakterioze, kas ir *Campylobacter spp.* baktēriju izraisīta infekcija. Iepriekšējā pētījumā Latvijā, kas bija vērsts uz *Campylobacter* izplatību broileru ražošanā, tika konstatēts 51% *Campylobacter* sastopamības rādītājs. Turklāt *C. jejuni* bija dominējošā baktēriju suga, un tā tika konstatēta 96% no visiem *Campylobacter* izolātiem, savukārt *C. coli* tika konstatēta tikai dažos paraugos (22). Tāpēc *Campylobacter* slodzes samazināšana vai pat dažu *Campylobacter* sugu izskaušana no vistu zarnām dotu labumu sabiedrības veselībai.

Proti, kampilobaktēriju relatīvais daudzums dzīvniekiem, kuri saņēma 30 mg/kg skujkoku biezo ekstrakta piedevu, joprojām bija līdzīgs kontrolparaugiem. Minēto baktēriju daudzums ievērojami samazinājās, palielinot devu (60 mg/kg), kas norāda, ka mazākā deva nebūtu pietiekama, lai panāktu vēlamo ietekmi uz aklās zarnas mikrobiotu. Šādus novērojumus par patogēno baktēriju samazināšanos ieteicams turpināt nākamajos pētījumos, izmantojot starptautiski atzītas Campylobacter noteikšanas un uzskaitījuma metodes, piemēram, tās, kas aprakstītas ISO 10272.

Lai gan šis pētījums ir ierobežots ar nelielo paraugu daudzumu, tas tomēr parāda vēlamas tendences izmaiņām broileru mikrobiotā attiecībā uz piedevas devas daudzumu.

Papildus informācija: Kodu un detalizētas programmatūras versijas, ko izmanto secības apstrādē un analīzē, ir dokumentētas un pieejamas GitHub: https://github.com/jkibilds/chicken-feed-microbiome-2021. Visi DNS sekvencēšanas lasījumi no šī pētījuma ir deponēti Eiropas Nukleotīdu arhīvā ar pievienošanas numuru PRJEB46042.

5.3. Biosaimniecība ZS "Skujas"

ZS "Skujas" projektā piedalījās ar cāļiem, kas bija šķīlušies vienā datumā no saimniecības inkubācijas olām. Tika veidotas 4 cāļu grupas, katrā pa 20 putniem. 3 cāļu grupas bija eksperimentālās, viena - kontroles grupa. Katrā no trim eksperimentālajām grupām cāļi saņēma papildbarību, saturošu atšķirīgu skuju biezā ekstrakta daudzumu.

1 grupai izbarojamā papildbarība saturēja skuju biezā ekstrakta daudzumu atbilstošu 30 mg/kg, 2 grupai – 60 mg/kg un 3 grupai – 90 mg/kg.

Eksperimenta pirmās nedēļas laikā, sākoties cāļu krišanai tika pārtraukta koncentrētā (90 mg/kg) premiksa lietošana.

Premiksus, kuri saturēja skuju biezā ekstrakta daudzumu, atbilstošu 30 mg/kg un 60 mg/kg lietoja kā papildbarības sastāvdaļu eksperimentālai grupai 4 nedēļas. Tā kā nedēļas laikā cāļa svars palielinājās, papildbarībā katrām nākošajām 7 dienām bija jāiemaisa premikss-koncentrāts, saturošs skuju biezo ekstraktu daudzumu atbilstoši aprēķinam. Premikss un pagatavotais maisījums glabāšanas laikā noslāņojās, jo papildbarībai nebija vienāds daļiņu lielums.

Tā kā premiksi ir vairāk vai mazāk ķepīgi, tad, kā to ir atzīmējis ZS Skujas īpašnieks, premiksa masa jāapmaisa un jāsamaisa ar papildbarību līdz daudzmaz viendabīgai masai. Sadarbības partneris eksperimenta sākumā novērojis, ka pagatavotais papildbarības un premiksa maisījums nav viendabīgs nevienādo daļiņu lieluma dēļ un premiksa mazās daļiņas dienas beigās paliek traukā.

Viendabīgāku maisījumu sadarbības partnerim izdevās pagatavot samaisot premiksu ar mitrinātu papildbarību. Lietojot šādu maisījumu, smalkās frakcijas daļiņas vairs netika novērotas.

ZS Skujas īpašnieks atzīmē, ka:

1. Eksperimenta laikā ļoti patīkams bija papildbarības aromāts, kas ar laiku piepildīja arī cāļu grupu novietnes, kas saglabājās pat pēc pakaišu maiņas.
2. Noslēdzoties cāļu barošanai, kļūstot par jaunputniem tika saglabātas divas grupas, kas dzīvoja vienādos apstākļos arī ziemā. 1. grupā bija 15 putni, kas cāļu vecumā tika baroti ar papildbarību 2. grupā 15 putni, kas tika baroti ar kontroles barību. Ar papildbarību cāļu vecumā barotie jaunputni sāka dēt 6 mēnešu vecumā pie āra temperatūras zem 0° C, taču kontroles barības grupa sāka dēt 7,5 mēnešu vecumā. Novērojām arī, ka 1 grupas putni olas dēja regulārāk, nekā kontroles grupas putni.
3. Objektīvie dati (anketu analīze) pārliecinoši pierādīja, ka visi dzīvnieki labprāt uzņem eksperimentālo barību, attīstās un uzvedas adekvāti situācijai. Nekādi veselības traucējumi eksperimenta laikā nebija konstatēti.
4. Eksperimentālo cāļu svara dinamika bija pozitīva un svara pieaugums bija ~ 8 %.

5.4. Biosaimniecība ZS "LIEPAS"

Sadarbības partneris ZS "Liepas" īpašnieks ir iesniedzis sekojošu informāciju par skuju biezo ekstraktu saturošas barības lietošanu.

Padomju saimniecības vitamīnu piedevai un vielu maiņas uzlabošanai, slaucamajām govīm ziemas pastaigu laukumos izēdināja skujotus egļu zarus , ko lopiņi labprāt apgrauza un rezultāts bija visumā pozitīvs.

Protams, nekādi izmeklējumi par iespaidu uz dzīvnieku vielu maiņu šai sakarā netika veikti, un objektīvi veselības rādītāji netika fiksēti. Šobrīd pieejamā skuju pasta, vai skuju pārstrādes produkts varētu pozitīvi iespaidot dzīvnieku veselību, taču mēģinot izēdināt premiksa-koncentrāta maisījumu ar placinātu graudu barību garšas īpašības laikam bija liellopiem ne visai pieņemamas. Kaut cik minēto barību sāka ēst pēc 3-4 dienām un divu mēnešu laikā jaunie piena teļi 5 līdz 8 mēnešu vecuma iemācījās apēst ap 150 gramus dienā katrs. Tas ir nepietiekoši, lai nodrošinātu intensīvu gaļas šķirnes jaunlopu attīstību.

Secinājums: lai izveidotu lopbarības piedevu, kas satur skuju apstrādes produktu jāpievieno citi barības komponenti, kas uzlabo apēdamību, tādi kā melase, klijas u.c. Vēl derētu izpētīt skuju piedevu pienesumu dzīvnieku vielu mainu un veselību.

Objektīvie dati (anketu analīze) pierādīja, ka eksperimentā iesaistītie dzīvnieki divu mēnešu laikā bija pieraduši pie eksperimentālas barības un apēda ap 150 gramiem dienā. Jaunlopi attīstās un uzvedās adekvāti situācijai. Nekādi veselības traucējumi eksperimenta laikā nebija konstatēti.

5.5. Biosaimniecība SIA "ZAĻAIS KURSS"

Sadarbības partneris SIA "ZAĻAIS KURSS" ir atsūtījis atskaiti ar informāciju par eksperimentālās barības piemērotību jēru barošanai.

Ar mērķi pārbaudīt eksperimentālās barības piemērotību jēru barošanā, SIA „ZAĻIS KURSS" ganāmpulkā tika nošķirta 20 jēru grupa 18-22 kg dzīvsvarā. Līdz nošķiršanai jēri tika baroti ar ganību zāli, brīvi pieejamu sienu un 0,8kg auzu dienā uz 1 dzīvnieku.

Pēc nošķiršanas auzu vietā jēru grupai tika izbarota eksperimentālā barība sekojošās devās:

- Pirmajā nedēļā no 17.05-23.05 jēri saņēma 1,2 kg/dienā spēkbarību, sastāvošu no premiksa nr.1 sajaukta ar 168 kg auzu.
- Otrajā nedēļā no 24.05-30.05 jēri saņēma 1,3 kg/dienā spēkbarību, sastāvošu no premiksa nr.2 sajaukta ar 182 kg auzu.
- Trešajā nedēļā no 31.05-06.06 jēri saņēma 1,4 kg/dienā spēkbarību, sastāvošu no premiksa nr.3 sajaukta ar 196 kg auzu.
- Ceturtajā nedēļā no 07.06-13.06 jēri saņēma 1,5 kg/dienā spēkbarību, sastāvošu no premiksa nr.4 sajaukta ar 210 kg auzu.

Barība tika izbarota kopējā silē, nodrošinot brīvu piekļuvi visiem jēriem vienlaicīgi.

Secinājumi:

- Eksperimenta pirmajā nedēļā spēkbarība tika apēsta lēnāk – no sākuma apēdot ar premiksu nesajaukušās auzas. Taču katras dienas gaitā barība tika apēsta visa. Sākot no otrās eksperimenta nedēļas vidus, piedāvātā barība tika apēsta nešķirojot.

- Izmaiņas kuņģa darbībā un vēdera izejā nevienam jēram netika konstatētas. Dzīvnieki jutās labi, pieņēmās svarā

- Objektīvie dati (anketu analīze) pārliecinoši pierādīja, ka visi dzīvnieki labprāt uzņem eksperimentālo barību, attīstās un uzvedas adekvāti situācijai. Nekādi veselības traucējumi eksperimenta laikā nebija konstatēti.

6. Diskusija par projekta pieteikumā nosprausto mērķa un uzdevumu sasniegšanu

Premiksu – bio papildbarības un skuju biezā ekstrakta maisījuma kvalitāte ir atkarīga no papildbarības daļiņu lieluma un sastāvdaļām. Papildbarības daļiņas lielākas par 4 mm un mazākas par 0,5 mm veido ar skuju biezo ekstraktu nedaudz ķepīgu masu.

Optimālākais daļiņu lielums ir 2 – 3 mm. Lipīgāku masu veido arī skuju biezā ekstrakta koncentrācija.

Sadarbības partneris no ZS Skujas arī ir atzīmējis, ka premiksa daļiņu lielums un premiksa un papildbarības maisījuma daļiņu lielums ietekmē skuju biezo ekstraktu saturošas barības izbarošanu cāļiem.

Vēlams papildus izpētīt papildbarības sastāvdaļu ietekmi uz premiksu, saturošu skuju biezo ekstraktu kvalitāti, konsistenci. Jāpadomā vēl par skuju ekstrakta sastāvdaļu kvalitātes nodrošināšanu premiksu uzglabāšanas laikā.

Hlorofilu saturs un karotīnu izomēru summa paraugos variē. Šo aktīvo vielu daudzumu paraugos ietekmē skuju biezā ekstrakta daudzums paraugos. Bez tam hlorofila un karotīnu izomēru daudzums paraugos samazinās šo vielu oksidēšanās dēļ glabāšanas laikā. Atlikušās sastāvdaļas (E vitamīns, K grupas vitamīni, fitosterīns (g.k. β-sitosterīns), poliprenoli, skvalēns, minerālvielas, taukskābju, sveķskābju, divbāzisku, okso- un oksiskābju nātrija sāļi, vaski, ēteriskā eļļa, ūdens, diterpēni u.c., skuju biezais ekstrakts satur vairāk nekā 500 bioloģiski aktīvo vielu), var veiksmīgi izmantot visā lietošanas periodā. Pašu biezo skuju ekstraktu bez sastāvdaļu izmaiņām var uzglabāt 36 mēnešus (3 gadus).

Bioefektīvo, skuju biezo ekstraktu saturošo dzīvnieku barību **var uzglabāt** 3 mēnešus 25º C temperatūrā, tumšā vietā.

Tas nozīmē, ka premiksus jāgatavo konkrētam, īsam lietošanas laikam. Lai varētu premiksus, saturošus skuju biezo ekstraktu uzglabāt un lietot ilgāku laiku nepieciešams izpētīt iespēju izmantot antioksidantus.

Skuju biezo ekstraktu saturoši šķidrumi ir dažādi. Stabila suspensija iegūta izmantojot kā šķīdinātāju attīrīto ūdeni un attīrīto ūdeni, saturošu 20% etanola. Vēlams papildus izpētīt suspensiju sastāvu, īpašības un lietošanas iespējas.

Fitobiotiku pozitīvā ietekme uz dzīvnieku veselību galvenokārt ir saistīta ar augu sastāvā esošajiem ķīmiskajiem savienojumiem un to kombinācijām, ieskaitot terpenoīdus (mono- un sesquiterpenes, steroīdus), fenolus (tanīnus), glikozīdus, alkaloīdus (spirtu, alhidīdu, ketonu, esteru, ēteru un laktonu veidā), flavonoīdus un glikozinolātu. (23). Priežu skuju ārstnieciskās īpašības var būt saistītas ar to bioaktīvajām vielām, piemēram, karotīnu, terpenoīdiem, fenola savienojumiem, tanīniem un alkaloīdiem (24).

Sadarbības partneris no ZS "Liepas" informēja, ka premiksa-koncentrāta maisījums ar placinātu graudu barību garšas īpašības dēļ jaunlopiem bija ne visai pieņemams.

Lietojot priežu skuju ekstraktu, kā barības papildinātāju, jārēķinās ar to rūgtās, savelkošās garšas (galvenokārt tanīnu dēļ) ietekmi uz barības apēdamību dažādām dzīvnieku sugām. Atgremotājiem garšas kārpiņas ir bagātīgi izvietotas mutes dobumā, un tiem vislabāk patīk uzņemt sāļu vai saldu barību, savukārt rūgta barība samazina kopējo barības apēdamību. Šī iemesla dēļ nobarojamiem jaunlopiem novērots samazināts uzņemamās papildbarības daudzums. Pievienojot šos ekstraktus barībai, ieteicams tos iemaisīt melasē, un tad kopēji maisītajā barībā (TMR), kas mazinātu rūgto garšu un iespēju izšķirot vai apēst tikai garšīgāko barības sastāvdaļu.

Savukārt putniem garšas receptoru ir daudz mazāk, kā zīdītājiem, un tie galvenokārt atšķir saldu, skābu un sāļu garšu. Tikai reti putni atšķir rūgtu garšu [12]. Šī iemesla dēļ mūsu eksperimentā cāļi labprāt ēda priežu skuju ekstraktu saturošu papildbarību.

Eksperimentāli pierādīts, ka izstrādātai eksperimentālai bioefektīvai dzīvnieku barībai, kura satur skuju biezo ekstraktu nav stimulējoša iedarbība uz dzīvnieka organismu. Skuju biezais ekstrakts, pēc būtības (analizējot pieejamo literatūru un mūsu pētījumus) nesatur vielas, kuras varētu izmainīt vistu dēšanas funkciju un hipertrofisko dzīvnieka masas pieaugumu.

Putnu dēšanas funkcija ir pati par sevi filoģenētiski attīstījusies kā reprodukcijas stabilākā sistēma. Kvalitatīvas attiecības olu saturā (lipīdi/olu dzeltenums un olbaltuma vielas) iespējams var izmainīties pielietojot selektīvus sintētiskos/dabīgos stimulātorus (tos nevar lietot bioloģiskās saimniecības). Tādā gadījumā var prognozēt, ka kvalitatīvās proporcijas starp lipīdiem un olbaltumu vielām diez vai izmainīsies skuju biezā ekstrakta ietekmē. Varbūt var izmainīties /paātrināties dēšanas cikls, kas bija eksperimentāli konstatēts.

Bioloģiskā (dabīgā) dēšanas procesā var mainīties olu izmēri un masa, bet ne būtiski kvalitatīvie rādītāji.

Tāpēc izanalizēt kvalitatīvi dējējvistu olas, kuras saņēma eksperimentālo bioefektīvo barību ar skuju biezo ekstraktu, nebija lietderīgi.

Savukārt projekta realizācijas gaitā aktualizējās eksperimentālo pētījumu daļa, kura saistīta ar izstrādātās eksperimentālās bioefektīvās barības, saturošas skuju biezo ekstraktu, iedarbību uz zarnu trakta mikrobiotu /mikrobiomu. Šīs aktivitātes nebija iekļautas apstiprinātā darbu plānā un bija atkarīgas no pirmā etapa - bioefektīvas dzīvnieku barības, kura satur skuju biezo ekstraktu, izstrādes procesa, glabāšanas un prognozējamo pielietojumu. Uzskatu, ka bioefektīvas dzīvnieku barības, kura satur skuju biezo ekstraktu izpēte saistībā ar zarnu trakta mikrobiotu ir vērtīgākā projekta sastāvdaļa, jo mikrobiotas un saistītie ar to imunitātes pozitīvie rādītāji parasti ietekmē dzīvnieka veselības stāvokli, pārtikas pieejamību, svara dinamiku utt.

Mikrobiota ir ievērojami daudzveidīga tikai aklajā zarnā un resnajā zarnā (17). Veselai pieaugušai vistai aklajā zarnā kolonizējas visvairāk grampozitīvi un gramnegatīvi bakteroīdi, kas veido apm. 90% no mikrobiota un atlikušie - parasti ir grampozitīvas aktinobaktērijas un gramnegatīvas proteobaktērijas (17). Ņemot vērā gremošanas trakta anatomisko specifiku (putnu aklās zarnas funkcionālo aktivitāti), vislabāk bioefektīvo dzīvnieku barību - papildbarības un skuju biezā ekstrakta maisījumu var izmantot putnkopībā (cāļi, vistas).

Par cāļiem: pozitīvie rezultāti cāļu aklās zarnas mikrobiomā

Relatīvais *Campylobacter* daudzums cāļiem, kuri saņēma papildbarību, saturošu 30 mg/kg skuju biezo ekstraktu, bija līdzīgs ar kontroles paraugiem. Šo patogēno baktēriju skaits ievērojami samazinājās tikai cāļiem saņemot lielāku skuju biezā ekstrakta devu (60 mg/kg). Tas norādīja, ka ar minimālo skuju ekstrakta devu nepietiek, lai sasniegtu vēlamo ietekmi uz aklo zarnu mikrobiomu. Šis novērojums attiecībā uz patogēno baktēriju samazināšanos ir jāizpēta turpmākajos pētījumos, izmantojot starptautiski atzītas metodes Campylobacter noteikšanai un uzskaitīšanai, piemēram, ISO 10272.

Starp četrām eksperimenta grupām, divās, kurās pielietoja ar skuju ekstraktu bagātinātu papildbarību, konstatēja gramnegatīvās *Bacteroidetes* ģints trīs baktēriju daudzuma palielināšanos, kas parasti ir atrodamas zarnu mikrobiotā visiem siltasiņu dzīvniekiem: *Bacteroides, Odoribacter* un *Prevotellaceae*. Šo sugu palielināšanās veicina barības (īpaši polisaharīdus saturošos, šķiedrainās) sagremošanas procesus zarnās. Bakteroīdiem ir svarīga loma sarežģītu makromolekulu sadalīšanā un acetāta un propionāta ģenerēšanā kā galvenajos fermentācijas produktos (16). *Odoribacter* spēj butirātu ražot, fermentējot lizīnu un reducējot sukcinātu (17). Butirāts, īsās ķēdes taukskābes tieši stimulē absorbcijas virsmas palielināšanos, nomāc zoonozes patogēnu augšanu, izraisa saimnieka aizsardzības peptīdu ekspresiju un modulē saimnieka epiģenētisko regulējumu (18). In vitro pētījumi norāda, ka vistas *Prevotellaceae* ir specializējušās sarežģītu polisaharīdu šķelšanā un dominē mikrobiotā, kad ir izēdināta barība, kas bagātināta ar augu šķiedrām (17).

Savukārt, *Firmicutes ģints Eubacterium hallii* grupas *baktēriju daudzums tika samazināts. Tas nozīmē, ka Firmicutes /* Bacteroidetes ģints *sugu attiecība samazinās.* Cilvēkiem zarnās *Firmicutes* un *Bacteroidetes* (F/B attiecība) attiecība bieži korelē ar ķermeņa svaru. F/B attiecība ir ievērojami augstāka cilvēkiem ar aptaukošanos un ievērojami samazinās svara zuduma laikā (Ley et al., 2005). Tātad skuju ekstraktu saņēmušo cāļu dzīvmasā varētu būt relatīvi vairāk muskuļu un mazāk tauku, kas ir ieteicams, šo putnu gaļu lietojot veselīga cilvēku uzturā.

Eksperimentāli pierādīts, ka izstrādātā bioefektīvā dzīvnieku papildbarība, kura satur skuju biezo ekstraktu, pozitīvi iedarbojas uz dzīvnieka zarnu trakta mikrobiotu/mikrobiomu (eksperiments ar cāļiem). Analizējot šo objektīvo faktu, var secināt, ka šāda barība var iedarboties pozitīvi uz jebkura dzīvnieka (cilvēka) zarnu trakta mikrobiotu. Kā zināms, zarnu trakts ir lielākais imūnkompetentais orgāns (70% no kopējās imunitātes regulēšanas procesiem notiek ar zarnu trakta palīdzību). Mikrobiotas disbalanss var provocēt un izraisīt vispārēju imunitātes disbalansu, pievienojot vai attīstot jebkuras slimības. Citi objektīvi dzīvnieka veselības rādītāji (asins analīzes, urīna analīzes, asins bioķīmija, muskulatūras biopsija utt.) parasti atšķiras no normatīviem parametriem, ja dzīvnieks saslimst un ir nepieciešama specializēta veterinārā palīdzība.

Izstrādātajai bioefektīvajai dzīvnieku barībai, kura satur skuju biezo ekstraktu, atšķirībā no citiem premiksiem, ir ilgstoša profilaktiska iedarbība uz visu dzīvnieka organismu.

Papildus pētījumi, saistīti ar eksperimentālās bioefektivās barības, saturošas skuju biezo ekstraktu, iedarbību uz zarnu trakta mikrobiotu, veikti noteiktā kārtībā bez kopējā budžeta izmaiņām.

7. Secinājumi

Projekta plānotais darba mērķis ir sasniegts. Ir izstrādāta bioefektīva papildbarība cāļiem, jēriem, jaunlopiem bioloģiskām saimniecībām.

Plānotie uzdevumi izpildīti:

1. Skuju biezā ekstrakta sastāvā esošo ūdenī nešķīstošo un slikti šķīstošo vielu dēļ pagatavot skuju biezo ekstraktu saturošus ūdens šķīdumus vai šķidrumus nav iespējams. Duļķaini šķidrumi, šķidrumi ar nogulsnēm nav derīgi kā piedeva putnu vai dzīvnieku dzeramajam ūdenim.

2. Izstrādāti premiksu sastāvi, veidoti no dažādām bio papildbarībām un skuju biezā ekstrakta. Precizēta premiksu gatavošanas tehnoloģija. Pagatavoto premiksu konsistences kvalitāte ir atkarīga no bio papildbarības daļiņu lieluma un sastāvdaļām.

3. Ir izstrādātas un izmantotas analīžu metodes karotīna un hlorofila noteikšanai skuju biezo ekstraktu saturošajos šķidrumos un premiksos, saturošu dažāda sastāva biopapildbarību.

4. Eksperimentālo cāļu svara dinamika bija pozitīva un svara pieaugums bija ~ 8 %.

5. Papildus ir veikta cāļu zarnu DNS ekstrakcijas un rRNS gēnu sekvencēšanas procedūra ceakālajiem paraugiem.

6. Papildbarības un skuju biezā ekstrakta maisījumu var glabāt 3 mēnešus 25º C tumšā vietā.. Projekta realizācijas gaitā eksperimentāli pierādīts, ka ilgākas glabāšanas periodā skuju biezā ekstrakta sastavdaļu - hlorofila, karotinoīdu daudzumi samazinās.

Labākus lietošanas rezultātus var sasniegt gatavojot katru 7. (septīto) dienu jaunu dzīvnieku bioefektīvo papildbarības maisījumu ar skuju biezo ekstraktu

7. Visi eksperimentā iesaistītie dzīvnieki (cāļi, vistas, jēri, jaunlopi) labprāt lietoja eksperimentālo bioefektīvo barību – papildbarības un skuju biezā ekstrakta maisījumu visā barošanas periodā (28 dienas). Jaunlopiem pirmajās dienās (3-4 dienas) bija atturīga reakcija, kura pārgāja (izbeidzās) sestajā lietošanas dienā. Tādu reakciju var izskaidrot ar jaunlopu specifisko zarnu trakta funkcionālo darbību – atraugas un palielināts gremošanas periods (var būt tāpat kā lietojot humāni - specifiski rūgta barības garša). Cāļiem, vistām un jēriem šādas reakcijas netika konstatētas. Ņemot vērā gremošanas trakta anatomisko specifiku (putnu aklās zarnas funkcionālo aktivitāti), vislabāk bioefektīvo dzīvnieku barību - papildbarības un skuju biezā ekstrakta maisījumu var izmantot putnkopībā (cāļi, vistas).

8. Eksperimentāli pierādīts, ka izstrādātā bioefektīvā dzīvnieku papildbarība, kura satur skuju biezo ekstraktu, pozitīvi iedarbojas uz dzīvnieka zarnu trakta mikrobiotu/mikrobiomu (eksperiments ar cāļiem). Analizējot šo objektīvo faktu, var secināt, ka šāda barība var iedarboties pozitīvi uz jebkura dzīvnieka (cilvēka) zarnu trakta mikrobiotu. Kā zināms, zarnu trakts ir lielākais imūnkompetentais orgāns (70% no kopējās imunitātes regulēšanas procesiem notiek ar zarnu trakta palīdzību). Mikrobiotas disbalanss var provocēt un izraisīt vispārēju imunitātes disbalansu, pievienojot vai attīstot jebkuras slimības. Citi objektīvi dzīvnieka veselības rādītāji (asins analīzes, urīna analīzes, asins bioķīmija, muskulatūras biopsija utt.)

parasti atšķiras no normatīviem parametriem, ja dzīvnieks saslimst un ir nepieciešama specializēta veterinārā palīdzība.

Izstrādātajai bioefektīvajai dzīvnieku barībai, kura satur skuju biezo ekstraktu, atšķirībā no citiem premiksiem, ir ilgstoša profilaktiska iedarbība uz visu dzīvnieka organismu.

9. Mikrobiotas un ar to saistītie imunitātes pozitīvie rādītāji parasti ietekmē dzīvnieka veselības stāvokli, pārtikas pieejamību, svara dinamiku utt.

- Objektīvi netika konstatēts neviens eksperimentālā dzīvnieka slimības gadījums (nebija vajadzības izsaukt vetārstu un lietot veterinārijas ārstnieciskos līdzekļus);
- Visa bioefektīvā dzīvnieku pārtika tika izlietota un normāli sagremota (vizuāli nekādu izmaiņu eksperimentu laikā nekonstatēja);
- Eksperimentālo cāļu svara dinamika bija pozitīva un svara pieaugums bija ~ 8 %.
- Tāda pati dinamika tika objektīvi konstatēta aitām un jaunlopiem. Vienīgi, statistiski korekti, eksperimentā varētu piedalīties vairāk jaunlopu, bet eksperimentā piedalījās tik daudz jaunlopu, cik atvēlēja saimniecība. Visi dzīvnieki, kuri piedalījās eksperimentā, attīstījās bez izmaiņām.

10. Ņemot vērā to, ka dzīvnieka veselība/stress, mikrobiota, imunitāte un attīstība ir parasti savstarpēji saistīti, var objektīvi prognozēt, ka plaša bioefektīvas pārtikas pielietošana, kuras sastāvā ir skuju biezais ekstrakts, uzlabos jebkuras bioloģiskas/industriālas saimniecības ekonomiskos rādītājus un attīstīs lauksaimniecības nozari.

Plānojot izmantot bioefektīvu dzīvnieka barību, kura satur skuju biezo ekstraktu, nepieciešams rēķināties ar barības pašizmaksas pieaugumu[1].

11. Bioefektīvas dzīvnieku barības izstrādes rezultātus plānots publicēt specializētā starptatiskā izdevumā. Sagatavota publikācija "*Changes in broiler chicken gut microbiome caused by feeding supplemented with conifer needle extracts*[2]**".**

[1] Skuju biezā ekstrakta 1 (viena) kilograma cena uz šo brīdi – 2021. g. – varētu būt ~ 50 EUR/kg.
[2] Skatīt pielikumā

8. Rekomendācijas

Pamatojoties uz pētnieciskā darba pozitīviem rezultātiem varam rekomendēt jaunputnu audzētājiem bagātināt papildbarību vai pamatbarību ar skuju biezā ekstrakta piedevu. Atskaites 5.nodaļas 5.1.2. apakšnodaļā ir dotas formulas aprēķiniem un aprakstīta papildbarības vai pamatbarības un skuju biezā ekstrakta maisījuma gatavošana.

Lietojamais skuju biezā ekstrakta daudzums

Bioefektīvas barības pagatavošanas piemērs

Bioefektīvas dzīvnieku barības izstrādes procesā var izmantot AS "Dobeles dzirnavnieks" rūpnieciski ražoto produkciju (piemēram, *Pilnvērtīga barība 0 – 8 nedēļas veciem cāļiem biosaimniecībām, DOFEED-Papildbarības 2,5% putniem bioloģiskajām saimniecībām, Bio papildbarība 0 – 2 mēnešus veciem teļiem, Pilnvērtīga barība 0 – 28 dienas veciem broileriem biosaimniecībām u.c.*), bioloģiskās saimniecībās ražoto papildus barību no bioloģiski audzētām izejvielām (bioloģiski audzētām auzām, miežiem, kviešiem, sojas pupām utt.), samaisot to noteiktā kārtībā ar skuju biezā ekstrakta daudzumu, kura aprēķināšanai lieto dzīvnieka masu un ekstrakta devu uz kg (30 mg/kg vai 0.03 g/kg).

Piemērs
Cāļa masa 270 g vai 0,270 kg.
Lietojamais skuju biezā ekstrakta daudzums **vienam cālim vienā dienā** =
30 mg ekstrakta x 0,270 kg (cāļa masa) = **8,1 mg ekstrakta** vai
0,03 g ekstrakta x 0,270 kg (cāļa masa) = **0,0081 g ekstrakta.**

Par cik papildbarības maisījumu ar skuju biezo ekstraktu var gatavot nedēļai, aprēķināto ekstrakta daudzumu un paredzētās papildbarības masu vienai dienai jāreizina ar 7. Iegūto skuju biezā ekstrakta un paredzētās papildbarības daudzumus nedēļas lietošanai vēl jāreizina ar cāļu skaitu, kuriem izbaros papildbarības un skuju biezā ekstrakta maisījumu.

Skuju biezā ekstrakta un papildbarības daudzums katrai nākošai nedēļai palielināsies ņemot vērā cāļa masas pieaugumu nedēļā.

Izmantojot doto paraugu, lietojamo ekstrakta daudzumu var aprēķināt arī citiem dzīvniekiem.

Eksperimentāli pierādīts, ka jebkura bioloģiska un industriāla saimniecība var veiksmīgi un praktiski izmantot šo vienkāršo ražošanas shēmu.

Bioefektīvas dzīvnieku barības izstrādes procesā svarīgi **ievērot higiēnas prasības**, samalšanas tehnoloģiju (ja izmanto bioloģiskā saimniecībā bioloģiski ražoto papildus barību), maisījuma gatavošanas tehnoloģiju (*Papildbarības un skuju biezā ekstrakta maisījuma gatavošana nedēļai plānotam dzīvnieku skaitam*).

Skuju biezā ekstrakta aprēķināto daudzumu pievieno nelielam aprēķinātās papildbarības daudzumam un samaisa līdz viendabīgam maisījumam. Pārējo papildbarības daudzumu pievieno pa daļām. Pēc katras papildbarības daļas pievienošanas masu maisa līdz viendabīgam maisījumam. Katrai nedēļai jāgatavo atsevišķs papildbarības un skuju biezā ekstrakta maisījums, ņemot vērā dzīvnieka masas palielināšanos nedēļas laikā.

Barības glabāšanas termiņš

Bioefektīvo, skuju biezo ekstraktu saturošo dzīvnieku barību var uzglabāt 3 mēnešus 25º C temperatūrā, tumšā vietā. Projekta īstenošanas gaitā eksperimentāli pierādīts, ka ilgākas uzglabāšanas periodā daļa no skuju bieza ekstrakta sastāvdaļām (hlorofils, karotinoīdi) pāriet cita formā. Atlikušās sastāvdaļas (E vitamīns, K grupas vitamīni, fitosterīns (g.k. β-sitosterīns), poliprenoli, skvalēns, minerālvielas, taukskābju, sveķskābju, divbāzisku, okso- un oksiskābju nātrija sāļi, vaski, ēteriskā eļļa, ūdens, diterpēni u.c., skuju biezais ekstrakts satur vairāk nekā 500 bioloģiski aktīvo vielu), var veiksmīgi izmantot visā lietošanas periodā. Pašu biezo skuju ekstraktu bez sastāvdaļu izmaiņām var uzglabāt 36 mēnešus (3 gadus).

Tomēr labākus lietošanas rezultātus var sasniegt, gatavojot jaunu dzīvnieku bioefektīvo papildbarības maisījumu ar skuju biezo ekstraktu katru 7. (septīto) dienu. Svarīga ir optimāla izlietošanas plānošana.

Izvērtējot cāļiem izbarotās papildbarības, bagātinātas ar skuju biezo ekstraktu pozitīvo ietekmi uz cāļu organismu un ZS Skujas saimnieka iegūto informāciju eksperimenta laikā, uzskatām, ka barība, saturoša skuju biezo ekstraktu būtu jāizmēģina izbarot arī jaunputniem un pieaugušiem putniem. Tāpat būtu nepieciešams atkārtot šāda veida cāļu barošanas eksperimentu un novērošanu līdz olu dēšanas beigām uzskaitot izdētās olas un citus rādītājus, lai noskaidrotu citus papildu ieguvumus no šīs papildbarības lietošanas. Nākošais solis varētu būt divu lielāku putnu grupu barošana, 100 un vairāk putni vienā grupā.

Ja nepieciešama papildu informācija:

Juris Rubens, tel.: 29212315, e-pasts: juris_rubens@inbox.lv,
Ilze Bārene, tel.: 29551817, e-pasts: Ilze.Barene@rsu.lv.

Literatūra

1. Софронова В. Е., Чепалов В. А. Адаптивные изменения состава фотосинтетических пигментов хвои (*Pinus silvestris L.*) при понижении температуры // Наука и образование, 2007; 2: 34–39.
2. Matysiak R. Content of carotenoids in needles of *Pinus sylvestris* L. growing in a polluted area // Dendrobiology, 2001; 46: 39–42.
3. Lavola A., Aphalo P. J., Lahti M., Julkunen-Tiitto R. Nutrient availability and the effect of increasing UV-B radiation on secondary plant compounds in Scots pine // Environmental and Experimantal Botany, 2003; 49: 49–60.
4. Sudachkova N. E., Milyutina I. L., Romanova L. I. Free amino acid composition in Scots pine tissues under stress impact in rhizosphere // Journal of Stress Physiology & Biochemistry, 2007; 3 (2): 4–14.
5. Девятловская А. Н., Журавлева Л. Н., Рубчевская Л. П., Девятловский Д. Н. Стерины в анатомических частях древесной зелени сосны обыкновенной // Вестник Красноярского ГАУ, 2009; 1: 75–79.
6. У Юй. Фенольные соединения кроны дерева сосны обыкновенной (Pinus silvestris L.): автореферат диссертации на соискание ученой степени канд. хим. наук :05.21.03 / У Юй. – СПб., 2006. – 20 с.
7. Рощин В. И., Нагибина Н. Ю., Курц Л. Содержание основных соединений в хвое Pinus silvestris из разных мест произрастания // Химия природных соединений, 1990; 2: 276–277.
8. Журавлева Л. Н., Девятловская А. Н., Рубчевская Л.П. Древесная зелень сосны обыкновенной – перспективный источник биологически активных веществ // Вестник Красноярского ГАУ, 2008; 3: 166–169.
9. Kanchan Bhardwaj, Ana Sanches Silva, Maria Atanassova, Rohit Sharma, Eugenie Nepovimova, Kamil Musilek, Ruchi Sharma, Mousa A. Alghuthaymi, Daljeet Singh Dhanjal, Marcello Nicoletti, Bechan Sharma, Navneet Kumar Upadhyay, Natália Cruz-Martins, Prerna Bhardwaj, and Kamil Kuča. Conifers Phytochemicals: A Valuable Forest with Therapeutic Potential. // Molecules, 2021 May; 26(10): 3005. https://doi.org/10.3390/molecules26103005.
10. Рунова Е. М., Угрюмов Б. И. Комплексная переработка зелени хвойных пород с целью получения биологически активных веществ // Химия растительного сырья, 1998; 1: 57–60.
11. Чекушкина Н. В., Невзорова Т. В., Ефремов А. А. Фракционный состав эфирного масла сосны обыкновенной // Химия растительного сырья, 2008; 2: 87–90.
12. Bespalov V. G. Clinical use of conifer green needle complex: A review of medical applications. – St. Petersburg, 2006. – 27 Pp. // www.ultimatepurity.se/bio_a_book_final.pdf (sk. 22.01.2010.).
13. https://arrow-tv.ru/lv/svojj-biznes/est-li-u-ptic-nos-pticy-organy-vkusa-i-obonyaniya-u-ptic/

14. Cardenas, L. A. C., V. Clavijo, M. Vives, and A. Reyes. 2021. Bacterial meta-analysis of chicken cecal microbiota. PeerJ. 9:e10571. https://doi.org/10.7717/peerj.10571

15. Kim, B. R., J. Shin, R. Guevarra, J.H. Lee, D. W. Kim, K. H. Seol, J. H. Lee, H. B. Kim, R. Isaascon. 2017. Deciphering Diversity Indices for a Better Understanding of Microbial Communities. J. Microbiol. Biotechnol. 12:2089-2093. DOI: 10.4014/jmb.1709.09027

16. Kollarcikova1, M., M. Faldynova, J. Matiasovicova, E. Jahodarova, T. Kubasova, Z. Seidlerova, V. Babak, P. Videnska, Al. Cizek, and, I. Rychlik. 2020. Different Bacteroides Species Colonise Human and Chicken Intestinal Tract. Microorganisms. 8(10):1483. doi: 10.3390/microorganisms8101483

17. Carrasco, J. M. D., E. A. Redondo, N. D. P. Viso, L. M. Redondo, M. D. Farber, and M. E. F. Miyakawa. 2018. Tannins and Bacitracin Differentially Modulate Gut Microbiota of Broiler Chickens. Biomed Res. Int. 2018:1879168. https://doi.org/10.1155/2018/1879168

18. Rychlik, I. 2020. Composition and Function of Chicken Gut Microbiota. Animals. 10(1):103. https://doi.org/10.3390/ani10010103

19. Gustavo, A. R., E. Richardson, J. Clark, J. Keshri, Y. Drechsler, M. E. Berrang, R. J. Meinersmann, N. A. Cox, and B. B. Oakley. 2020. Broiler chickens and early life programming: Microbiome transplant-induced cecal community dynamics and phenotypic effects. PLOS One. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242108

20. Ocejo, M., B. Oporto, and A. Hurtado. 2019. 16S rRNA amplicon sequencing characterization of caecal microbiome composition of broilers and free-range slow-growing chickens throughout their productive lifespan. Sci. Rep. 9: 2506. https://doi.org/10.1038/s41598-019-39323-x

21. Richards, P., J. Fothergill, M. Bernardeau, and P.Wigley. 2019. Development of the Caecal Microbiota in Three Broiler Breeds. *Front. Vet. Sci.* 6:201. https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00201

22. Díaz-Sánchez, S., A. R. Perrotta, I. Rockafellow, E. J. Alm, R. Okimoto, R. Hawken, and I. Hanning. 2019. Using fecal microbiota as biomarkers for predictions of performance in the selective breeding process of pedigree broiler breeders. PLOS ONE. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216080

23. Meistere I., J. Ķibilds, L. Eglīte, L. Alksne, J. Avsejenko, A. Cibrovska, S. Makarova, M. Streikiša, L. Grantiņa-Ieviņa, A. Bērziņš. 2019. Campylobacter species prevalence, characterisation of antimicrobial resistance and analysis of whole-genome sequence of isolates from livestock and humans, Latvia. Euro Surveill. 24(31):pii=1800357. https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.31.1800357

24. S Diaz-Sanchez, D D'Souza, D Biswas, I Hanning. 2015. Botanical alternatives to antibiotics for use in organic poultry production. Poultry science 94 (6), 1419-1430

25. Aiwei Guoa , Long Chengb , Mohammad Al-Mamunc , Chunmei Xionga and Shenglin Yang 2018. Effect of dietary pine needles powder supplementation on growth, organ weight and blood biochemical profiles in broilers. JOURNAL OF APPLIED ANIMAL RESEARCH, 2018 VOL. 46, NO. 1, 518–522 https://doi.org/10.1080/09712119.2017.1351977

Pielikums

Changes in chicken gut microbiome caused by feeding supplemented with pine needle extracts

Juris Rubens[1], Juris Kibilds[2], Martins Jansons[2], Inga Piginka-Vjaceslavova[2], Vadims Bartkevics[2], Ilze Barene[3], Irena Daberte[3], Laima Liepa[4], Aija Malniece[4], Arturs Rubens[1] and Iveta Pugajeva[2,*]

[1]BF-ESSE LLC, Research and experimental development on biotechnology, Brivibas gatve 369 k-2, Riga, LV-1024, Latvia
[2]Institute of Food Safety, Animal Health and Environment "BIOR", Lejupes 3, Riga, LV-1076, Latvia
[3]Riga Stradins Univerity, Dzirciema 16, Riga, LV-1007, Latvia
[4]Latvia University of Life Sciences and Technologies, Kristapa Helmana 8, Jelgava, LV-3004, Latvia

** Correspondence:* ***iveta.pugajeva@bior.lv***

Abstract

The worldwide development of antibiotic resistant pathogens emerged partly from the use of sub-therapeutic concentrations of antibiotics delivered in poultry feed. This has led to the need for alternative methods to improve the growth and health of poultry. For that reason, feed additives with antibacterial properties are widely used. The effect of dietary supplement of pine needle extract on chicken intestinal health and on the composition of caecal microbiota under non-challenged conditions were investigated. Three groups of chickens with 20 representatives in each were fed with supplemented food in various concentrations for 40 days. Afterwards, the effect of feed additives on the chicken gut was assessed. When pine needle extract was supplemented to the diet in different concentrations, increased relative abundance of *Bacteroidaceae*, *Marinifilaceae*, *Prevotellaceae*, and *Deferribacteraceae* was revealed in the chicken caeca. The opposite trend was observed for the abundance of *Rikenellaceae*, *Barnesiellaceae*, *Campylobacteraceae*, *Methanobacteriaceae*, *Lachnospiraceae*, and *Synergistaceae.* This study demonstrates trends towards desirable changes in the chicken microbiome.

Keywords:

Microbiome, poultry, biological farm, feedstuff, pine needle extracts

1. Introduction

For more than 50 years, antibiotics have been used to enhance the growth and to prevent or reduce the incidence of infectious diseases in poultry and livestock (Ma et al. 2021). Antibiotic usage has enhanced the health and well-being of poultry by reducing the incidence of disease and has facilitated efficient production of poultry. The risk concerning residues of antibiotics in edible tissue and products that can produce allergic or toxic reactions in consumers is known to be negligible because only antibiotics that are not absorbed in the digestive tract were authorized as growth promoters (Donoghue 2003). However, concerns about the development of antimicrobial resistance and the transfer of antibiotic resistance genes from animal to human microbiota led to the withdrawal of approval for antibiotics as growth promoters in the

European Union since January 1, 2006 (Castanon 2007). Therefor natural feed additives that improve poultry health and production is needed.

Several growth and health promoting properties have been attributed to certain plant-derived products that could see increased usage in the poultry industry. These benefits are derived by improving the gut health, including increasing the digestibility of feed, modifying digestive secretions, as well as sustaining and improving gut histology. Furthermore, some phytobiotics stabilize the microbiome, thus reducing the production of microbial toxins. The positive effect of phytobiotics is mainly linked to active plant constituents, including terpenoids (mono- and sesquiterpenes, steroids), phenolics (tannins), glycosides, alkaloids that may be present as conjugates, flavonoids, and glucosinolate (Diaz-Sanchez et al. 2015). Various elements of woody herbs (needles, shoots, etc.) in the form of infusions, extracts, and ointments have historically been used in folk and traditional medicine (Bhardwaj et al. 2021). Pine needles, being one of the products derived from coniferous trees, have been used in traditional Chinese medicine to treat diseases, such as wind-cold-dampness arthralgia, traumatic injury, sleeplessness, eczema, and oedema. The medicinal properties of pine needles may be related to their bioactive substances such as carotenoids, terpenoids, phenolic compounds, tannins, and alkaloids (Guo et al. 2018). It has been reported that the pine needles showed anti-inflammatory and anti-bacterial abilities against *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis in vitro* studies (Zeng et al. 2011).

The gut microbiota comprises resident microorganisms in the digestive tract of the host. The gut microbiota is closely linked with host health and disease status. In recent years, a large body of research has demonstrated that diet influences the composition of animal gut microbiota (Chen et al. 2019). Microbiota of the chicken is well differentiated across the gastrointestinal compartments (crop, proventriculus, gizzard, duodenum, ileum, caecum, and the colon) due to different physicochemical conditions, mainly the pH, growth substrate availability, redox potential, and antimicrobial activity of host secretions. Moving down the gastrointestinal tract, the availability of growth substrates decreases (Apajalahti et al. 2016). The crop, proventriculus, and gizzard are dominated by *Lactobacilli* due to the strong selection by pH. Microbiota is significantly diverse only in caecum and colon (Rychlik 2020). Due to the decreasing redox potential from proximal to distal intestine, the proximal intestine also supports the growth of facultative anaerobic bacteria and the small intestines from healthy chickens contain few strict anaerobes, but the caecum and colon are characterized by the presence of rich microbiota dominated by strict anaerobes, which are usually specialized in utilising feed that is not digested by the host, e.g. resistant starch or protein, or carbohydrate fractions excluding starch and free sugars (non-starch polysaccharides) (Apajalahti et al. 2016). The absolute count of microorganisms is low in the small intestine (approx. 10^5 CFU per gram of digesta), and very high in the caecum (approx. 10^{10} CFU per gram of digesta and approx. 1000 species). In a healthy adult chicken the caecum is usually colonized by Gram-positive Firmicutes and Gram-negative Bacteroides, which constitute approx. 90% of the microbiota, and the remaining phyla are usually Gram-positive Actinobacteria and Gram-negative Proteobacteria. Although this is the consensus composition of the microbiota in chicken caecum, there can be highly individual variation without signs of abnormality. However, all of these four phyla are always found in caeca of normal adult chickens (Rychlik 2020).

The purpose of this study was to evaluate the effect of dietary supplement of pine needle extract on chicken intestinal health and on the composition of caecal microbiota under non-challenged conditions.

2. Materials and methods

Experimental and sampling procedures

Management of birds was implemented by strictly following the recommendations of the Food and Veterinary Service of the Republic of Latvia. The birds were reared in a biological farm and slaughtered in a poultry farm during the standard process for meat production. The slaughterhouse performed its activity according to the requirements of the Council Regulation (EC) No 1099/2009 of 24 September 2009 on the protection of animals at the time of killing.

Twenty-one-day-old chickens were randomly divided into three groups that correspond to three treatments with twenty birds replicates per treatment. All three groups were reared in the biological farm where birds were kept separately in the specially designed aviaries indoors and outdoors. Feed and water were offered *ad libitum*. The three treatments comprised the following diets: group A received the standard non-supplement diet and acted as a control group; group B was fed standard diet supplemented with pine needle extract in the concentration 30 mg of extract per kg of bird body weight (b.w), group C was fed standard diet supplemented with pine needle extract in the concentration 60 mg extract per kg of b.w. The supplemented feed was prepared once a weak taking into account actual birds' weight, replicates, daily feed intake and time period (Table 1).

The commercially available feed that is intended for feeding laying hens from the first day of life to 8 weeks of age was used as basal diet and it consisted of wheat, oat, soybean, *saccharomyces cerevisiae,* calcium carbonate, vitamin A, vitamin D3, vitamin E, vitamins B, vitamin K3, and trace elements: iron, zinc, manganese, copper, cobalt, selenium, digestion promoters.

The duration of the experiment was 40 days after which five individuals per each treatment was randomly selected and slaughtered via cervical dislocation to collect caecal contents for microbiome analysis. In a special sterile box, the samples were sent to the laboratory while packed in ice.

Feed supplemented with pine needle extract

Pine needle extract was obtained from vegetable raw material - green coniferous biomass of Baltic pines (*Pinus sylvestris*). *Pinus sylvestris* have been given the status of Novel Food by European Food Safety Agency (EFSA 2021). Pine needle extract was prepared by the use of organic solvent for the extraction of wood green conifers, followed by the separation of coniferous wax, treatment with aqueous alkaline solutions, acidification with mineral and organic acids, settling, layer-by-layer separation, distillation off the solvent traces (Roshchin et al. 1994). This industrial method makes it possible to obtain the most complete conifer needle extract containing more than one hundred hydrophobic and hydrophilic biologically active compounds in natural ratios. Obtained natural product in the form of dark green mass with characteristic smell and taste of pine is also known as chlorophyll-carotene paste. The main chemical components of pine needle extract are sodium chlorophyllin and other chlorophyll derivates (4-16 g/L, β-carotene and other carotenoids (200-1200 mg/L), vitamin E (300-500 mg/L), vitamin K group (12-20 mg/L), sodium salts of fatty, resin dibasic, oxo- and oxyacids (44-60%), minerals (5-7%), waxes (5-8%), phytosterols, polyprenols, squalene (Bespalov et al. 2006).

Before the experiment it was checked that the composition of needle extract does not change during long-term storage, the growth of pathogenic and fungal flora is not observed. Previous pilot studies (data not published) showed that the optimal dose for consumption was assumed

as 30-60 mg pine needle extract per kg of animal weight. Based on this data the amount of supplement was calculated for feeding.

DNA extraction and 16S rRNA gene sequencing procedure for caecal samples

DNA was extracted from 100 mg of caecal contents using the **ZymoBIOMICS 96 Magbead DNA Kit** from Zymo Research. The sequencing library preparation was performed by following the protocol published by Illumina (document number 15044223 Rev. B). Briefly, the variable regions V3-V4 of bacterial 16S rRNA gene were targeted by primers designed by Klindworth et al. (2013). In a two-step protocol, the first round of PCR amplified the target and added Illumina sequencing adapters. Nextera XT set A barcodes were added during the second round of PCR. KAPA HiFi DNA polymerase was used for all amplification reactions. Sequencing was performed on an Illumina MiSeq, using v3 600-cycle reagent kit to produce 2×300 bp paired-end reads. A DNA extraction negative control and mock community DNA (ATCC MSA-1002) were sequenced along with the sample libraries for quality control purposes.

Bioinformatics data analysis

All of the sequence processing was done within QIIME2 software environment (Bolyen et al. 2019). First, the primer sequences were trimmed from the reads using Cutadapt (Martin 2011). The trimmed reads were denoised with the DADA2 algorithm (Callahan et al. 2016) to produce error-corrected amplicon sequence variants (ASVs). Taxonomic classification of ASVs was performed with VSEARCH (Rognes et al. 2016) against the silva_138_NR99 SSU rRNA database (Quast et al. 2013).

Alpha and beta diversity calculations were performed on normalized ASV feature tables, from which singletons and sequences representing irrelevant taxa (eukaryotes, chloroplasts, and mitochondria) had been removed. For feature count normalization, SRS algorithm (Beule et al. 2020) was used set to 114666 features per sample (the lowest denoised and filtered feature count among all samples). The observed feature count (richness), Shannon's index (Shannon 1948), and Simpson's index (Simpson 1949) were used as metrics of within-sample (alpha) diversity. Between-sample (beta) diversity was calculated as Bray–Curtis dissimilarity (Sørensen 1948) and generalized UniFrac distance (Chen et al. 2012). Spearman's rank correlation tests were performed to assess the relationships between microbiome diversity metrics and feeding supplement dose. A two-sided Mantel test was applied to identify the correlation between beta distances and distances in the received feed supplement concentration. Additionally, denoised read count was used as a variable in the same tests in order to assess the sequencing depth as a confounding factor. Associations between feed supplement dose and abundance of microbiome features were analyzed using general linear models as implemented in the MaAsLin2 R package (Mallick et al. 2021).

3. Results

Summary of 16S rRNA gene sequencing

In total, 6423182 paired-end reads were generated from the fifteen samples, ranging from 361090 to 489066 reads per sample. After trimming and denoising steps, 2,144,509 features remained. The mean number of features per sample was 142,967, from the lowest coverage of 121,506 features to the highest of 158,486. Alpha diversity rarefaction curves were generated to verify that sufficient sequencing depth had been achieved. Saturation of Shannon diversity

index and the observed feature richness was achieved at approximately 10000 and 110000 features, respectively, for all feeding groups (not shown). Examination of read counts and taxonomic profiles of negative control and mock community did not raise any concerns of contamination or poor performance of the sequencing process.

Diversity of caecal microbiota and the trends observed in feeding groups

The major bacterial phyla that were observed were Firmicutes (53.44% average relative abundance), Bacteroidota (33.14%), Actinobacteriota (6.43%), Fusobacteriota (1.60%), and Proteobacteria (1.37%). For the rest of phyla, the abundance was less than 1% on average. The composition of each sample at the phylum level is represented in Fig. 1.

Next, the effect of pine needle extract feeding supplement on the alpha diversity of caecal microbiomes was evaluated. Three different alpha diversity measures were calculated. Spearman correlation revealed a significant relationship ($P = 0.0014$) between the observed feature count and denoised read count per sample, which was expected, as more spurious ASVs can appear with increased depth of sequencing. However, other alpha diversity indices did not correlate with the sequencing depth, thus it was assumed that the other diversity measures were not biased by sample read counts. The observed feature count and Simpson's index did not significantly correlate with the dietary supplement concentration, whereas Shannon's index showed a negative correlation with the dietary supplement dose ($\rho = -0.6236$, $P = 0.013$).

To evaluate the between-sample (beta) diversity, Bray-Curtis and generalized UniFrac distances were calculated between all samples. There was no significant correlation between the beta diversity metrics and read count, thus assuring that these metrics were also not biased according to the sequencing depth. Both Bray-Curtis and generalized UniFrac beta diversity metrics showed a significant positive correlation with the feeding supplement dose ($\rho = 0.473644$, $P = 0.001$ and $\rho = 0.267187$, $P = 0.003$, respectively).

Eleven differently abundant genera in the caecal microbiota from birds fed a pine needle extract-supplemented feed as compared to the control group were identified using a general linear model framework (Table 2). Four of them, belonging to the families of Bacteroidaceae, Marinifilaceae, Prevotellaceae, and Deferribacteraceae, were more abundant when the feed was supplemented with pine needle extract. Seven other genera were less abundant when the birds were fed with supplemented feed: two belonging to the family Rikenellaceae and others belonging to Barnesiellaceae, Campylobacteraceae, Methanobacteriaceae, Lachnospiraceae, and Synergistaceae.

4. Discussion

The microbial community present in the gastrointestinal tract has been widely associated with factors involving the health of chickens, such as the immune system, the physiology of the digestive system, and the exclusion of pathogens, as well as the performance in production. Feed additives are widely used to improve chicken gut health and to stimulate performance.

According to the bacterial meta-analysis of chicken caecal microbiota, *Firmicutes* was the most prevalent phylum, followed by Bacteroidetes and Proteobacteria (Cardenas et al. 2021). In our study, a similar abundance profile was observed for Firmicutes and Bacteroidetes, but the next most abundant phylum was Actinobacteriota, followed by Fusobacteriota and then Proteobacteria. However, the distribution of Fusobacteriota was very uneven among the chickens tested in our study.

It was observed that Shannon's alpha diversity index significantly correlated with dietary supplement dose while Simpson's index did not, indicating that the shift in microbiome composition affects mainly the minority taxa, not the dominant ones, since Shannon's index gives more weight to species richness and thus is more sensitive towards minor features (Kim et al. 2017). The significant correlation between the beta diversity measures and the difference in the feeding supplement dose received by each chicken demonstrates that a general shift in the caecal microbiome composition can be observed despite the small sample size and notable inter-individual variation in microbiome profiles (see Fig. 1).

Among the four taxa that were more abundant when the feed was supplemented with pine needle extract were a gram-negative genus of *Bacteroides* that are common gut microbiota members in all warm-blooded animals (Kollarcikova et al. 2020). *Bacteroides* play an important role in breaking down complex macromolecules and generate acetate and propionate as major fermentation products (Carrasco et al. 2018). *Odoribacter* is capable of butyrate production via lysine fermentation and succinate reduction (Rychlik 2020). Butyrate, a short-chain fatty acid that directly stimulates an increase in the absorptive surface area, suppresses the growth of zoonotic pathogens, induces the expression of host-defense peptides, and modulates host epigenetic regulation (Gustavo et al. 2020). Chicken isolates belonging to the family Prevotellaceae have not been characterised in detail. *In vitro* culturomics studies have indicated that chicken Prevotellaceae are specialised in the digestion of complex polysaccharides and dominate in the microbiota when feed enriched for vegetable fiber is common (Rychlik 2020). Among the minor phyla associated with the mature microbiota, there was a noteworthy presence of bacteria with the potential to stimulate mucus layer formation, which are therefore associated with a healthy gut, like *Mucispirillum* found only in free-range slow-growing chickens and at higher levels in 81-day-old free-range slow-growing chickens where it was a biomarker (Ocejo et al. 2019).

For a few bacterial taxa belonging to the families Barnesiellaceae and Rikenellaceae, decreased relative abundance was observed when birds were fed with supplemented feed. These taxa belong to the order Bacteroidales that encompass gram-negative anaerobic coccobacilli, with saccharolytic and proteolytic activities. Barnesiellaceae is a proposed taxonomic group that has not been yet characterized. Rikenellaceae have been found enriched in the caeca of mice with high-fat diet-induced obesity and seem to be highly susceptible to perturbations in the gut microbiota, such as those caused by antibiotics or probiotics supplementation (Carrasco et al. 2018).

The same decrease was observed for *Methanobrevibacter*. Many methanogenic archaea, or methanogens, use H_2 and CO_2 as substrates to synthesize methane. As the only producers of enteric methane, methanogens are responsible for the contribution of livestock industries to climate change and have thus become the focus of research toward developing mitigation strategies. The sequences of 16S rRNA genes closely related to certain species belonging to the genus *Methanobrevibacter* are among the most frequently found sequences in gastrointestinal tract samples from livestock (St-Pierre et al. 2015).

One of the main functions of caecum is bacterial fermentation of indigestible polysaccharides to produce short chain fatty acids that can be absorbed by the host's epithelial cells. This role is fulfilled by certain classes of Firmicutes (such as Lachnospiraceae or Ruminococcaceae) and Bacteroidetes (Richards et al. 2019). The bacteria of Lachnospiraceae family are absent or very sparse in young chickens (Díaz-Sánchez et al. 2019).

There are phyla and genera that may appear in the microbiota of adult hens but are not universally distributed in all individuals, and these include Synergistetes (*Cloacibacillus* sp.) (Rychlik 2020).

The most common cause of bacterial gastroenteritis is campylobacteriosis, which is an infection caused by *Campylobacter* spp. bacteria. A previous study in Latvia that was focussed on the prevalence of *Campylobacter* in broiler production revealed an occurrence rate of 50.6% for *Campylobacter*. Furthermore, *C. jejuni* was the dominant bacterial species and was detected in 95.7% of all *Campylobacter* isolates, while *C. coli* was found only in some samples (Meistereet et al. 2019). Therefore, the reduction of *Campylobacter* loads or even eradication of certain *Campylobacter* species from the chicken gut would entail a benefit for public health.

Notably, the relative abundance of *Campylobacter* in animals receiving 30 mg of pine needle extract per kg of b.w. was still similar to control samples. The abundance of said bacteria decreased significantly only with the higher dose (60 mg/kg), indicating that the lower dose would not be sufficient to achieve the desired effect on the caecal microbiome. This observation regarding the reduction of pathogenic bacteria should be investigated in further studies by using internationally recognized methods for the detection and enumeration of *Campylobacter*, such as those described in ISO 10272.

Conclusions:

Although limited by the small sample size, this study nevertheless demonstrates trends towards dose-dependent desirable changes in chicken microbiome, resulting from supplementing chicken feed with pine needle extract. Some positive outcomes were observed with increasing dose, such as a reduction in the relative abundance of *Campylobacter*. The effect of pine needle extract on *Campylobacter* abundance and prevalence should be investigated further, especially targeting the species that are pathogenic to consumers of poultry.

5. Supporting information

The code and detailed software versions used in the sequence processing and analysis are documented and available at GitHub repository **https://github.com/jkibilds/chicken-feed-microbiome-2021**. All DNA sequencing reads from this study have been deposited at European Nucleotide Archive under accession number PRJEB46042.

Acknowledgments

This research was funded within the framework of the European Agricultural Fund for Rural Development (EAFRD) program, grant number 18-00-A01620-000042.

Conflict of interest statement

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have influenced the work reported in this paper.

References

1. Apajalahti, J.; Vienola, K. Interaction between chicken intestinal microbiota and protein digestion. *Anim. Feed Sci. Technol*. 2016, *221*, 323-330. *https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.05.004*

2. Beule, L.; Karlovsky, P. Improved normalization of species count data in ecology by scaling with ranked subsampling (SRS): application to microbial communities. *PeerJ.* 2020, *8*, e9593 *https://doi.org/10.7717/peerj.9593*

3. Bespalov, V.G.; Alexandrov, V.A. 2006. Clinical use of conifer green needle complex: A review of medical applications. *Available online: https://spbftu.ru/wp-content/uploads/2020/03/clinical.pdf (Accessed on 08.10.2021.)*

4. Bhardwaj, K.; Silva, A.S.; Atanassova, M.; Sharma, R.; Nepovimova, E.; Musilek, K.; Sharma, R.; Alghuthaymi, M.A.; Dhanjal, D.S.; Nicoletti, M.; Sharma, B.; Upadhyay, N.K.; Cruz-Martins, N.; Bhardwaj, P.; Kuča, K. Conifers Phytochemicals: A Valuable Forest with Therapeutic Potential. Molecules. 2021, 26, 3005. https://doi.org/10.3390/molecules26103005

5. Bolyen, E.; Rideout, J.R.; Dillon, M.R. *et al.* Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat. Biotechnol.* 2019, *37*, 852-857. https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9

6. Callahan B.J.; McMurdie, P.J.; Rosen, M.J.; Han, A. W.; Johnson A.J.A.; Holmes, S.P. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. Methods.* 2016, 13, 581-583. https://doi.org/10.1038/nmeth.3869

7. Cardenas, L. A. C.; Clavijo, V.; Vives, M.; Reyes, A. Bacterial meta-analysis of chicken cecal microbiota. PeerJ. 2021, 9, e10571. https://doi.org/10.7717/peerj.10571

8. Carrasco, J.M.D.; Redondo, E.A.; Viso, N.D.P.; Redondo, L.M.; Farber, M.D.; Miyakawa, M.E.F. Tannins and bacitracin differentially modulate gut microbiota of broiler chickens. Biomed. Res. Int. 2018, 1879168. https://doi.org/10.1155/2018/1879168

9. Castanon, J.I.R. History of the Use of Antibiotic as Growth Promoters in European Poultry Feeds. *Poult. Sci.* 2007, *86*, 2466-2471. https://doi.org/10.3382/ps.2007-00249

10. Chen, J.; Bittinger, K.; Charlson, E.S.; Hoffmann, C.; Lewis, J.; Wu, G.D.; Collman, R.G.; Bushman, F.D.; Li, H. Associating microbiome composition with environmental covariates using generalized UniFrac distances. *Bioinformatics*. 2012, *28*, 2106-406 2113. doi: 10.1093/bioinformatics/bts

11. Chen, Y.N.; Li, H. Effect of green tea and mulberry leaf powders on the gut microbiota of chicken. BMC Vet. Res. 2019, 15, 77.

12. Diaz-Sanchez, S.; D'Souza, D.; Biswas, D.; Hanning, I. Botanical alternatives to antibiotics for use in organic poultry production. *Poult. Sci.* 2015, *94*, 1419-1430. https://doi.org/10.3382/ps/pev014

13. Díaz-Sánchez, S.; Perrotta, A.R.; Rockafellow, I.; Alm, E.J.; Okimoto, R.; Hawken, R.; Hanning, I. Using fecal microbiota as biomarkers for predictions of performance in the selective breeding process of pedigree broiler breeders. *PLOS ONE.* 2019, *14,* e0216080. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216080

14. Donoghue, D.J. Antibiotic residues in poultry tissues and eggs: human health honcerns? *Poult. Sci.* 2003, *82,* 618-621. DOI: 10.1093/ps/82.4.618 EFSA. European Food Safety Agency. *EU Novel food catalogue. Available online:* https://ec.europa.eu/food/safety/novel_food/catalogue/search/public/index.cfm?ascii=P (accessed on 10.10.2021.)

15. Guo, A.; Cheng, L.; Al-Mamun, M.; Xiong, C.; Yang, S. Effect of dietary pine needles powder supplementation on growth, organ weight and blood biochemical profiles in broilers. J. Appl. Anim. Res. 2018, 46, 518-522 https://doi.org/10.1080/09712119.2017.1351977

16. Gustavo, A.R.; Richardson, E.; Clark, J.; Keshri, J.; Drechsler, Y.; Berrang, M.E.; Meinersmann, R.J.; Cox, N.A.; Oakley, B.B. Broiler chickens and early life programming: Microbiome transplant-induced cecal community dynamics and phenotypic effects. *PLOS* One. 2020, 15, e0242108. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242108

17. Kim, B.R.; Shin, J.; Guevarra, R.; Lee, J.H.; Kim, D.W.; Seol, K.H.; Lee, J. H.; Kim, H.B.; Isaascon, R. Deciphering Diversity Indices for a Better Understanding of Microbial Communities. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2017, *12,* 2089-2093. DOI: 10.4014/jmb.1709.09027

18. Klindworth, A.; Pruesse, E.; Schweer, T.; Peplies, J.; Quast, C.; Horn, M.; Glockner, F.O. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res.* 2013, *41,* e1. DOI: 10.1093/nar/gks808

19. Kollarcikova, M.; Faldynova, M.; Matiasovicova, J.; Jahodarova, E.; Kubasova, T.; Seidlerova, Z.; Babak, V.; Videnska, P.; Cizek, A. l.; Rychlik, I. Different Bacteroides Species Colonise Human and Chicken Intestinal Tract. Microorganisms. 2020, *8,* 1483. doi: 10.3390/microorganisms8101483

20. Ma, F.; Xu, S.; Tang, Z.; Li, Z.; Zhang, L. Use of antimicrobials in food animals and impact of transmission of antimicrobial resistance on humans. *Biosafety and Health,* 2021, *3,* 32-38. https://doi.org/10.1016/j.bsheal.2020.09.004

21. Mallick, H.; Rahnavard, A.; McIver, L.J.; Ma, S.; Zhang, Y.; Nguyen, L.H.; Tickle, T.L.; Weingart, G.; Ren, B.; Schwager, E.H.; Chatterjee, S.; Thompson, K.N.; Wilkinson, J.E.; Subramanian, A.; Lu, Y.; Waldron, L.; Paulson, J.N.; Franzosa, E.A.; Bravo, H.C.; Huttenhower, C. Multivariable Association Discovery in Population-scale Meta-omics Studies. *bioRxiv* 2021.01.20.427420. doi: https://doi.org/10.1101/2021.01.20.427420

22. Martin, M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. EMBnet J. 2011, 17, 10-12. DOI: https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200

23. Meistere, I.; Ķibilds, J.; Eglīte, L.; Alksne, L.; Avsejenko, J.; Cibrovska, A.; Makarova, S.; Streikiša, M.; Grantiņa-Ieviņa, L.; Bērziņš, A. Campylobacter species prevalence, characterisation of antimicrobial resistance and analysis of whole-genome sequence of isolates from livestock and humans, Latvia. *Euro Surveill.* 2019, *24(31),* pii=1800357. https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.31.1800357

24. Ocejo, M.; Oporto, B.; Hurtado, A. 16S rRNA amplicon sequencing characterization of caecal microbiome composition of broilers and free-range slow-growing chickens throughout their productive lifespan. *Sci. Rep*. 2019, *9,* 2506. https://doi.org/10.1038/s41598-019-39323-x

25. Quast, C.; Pruesse, E.; Yilmaz, P.; Gerken, J.; Schweer, T.; Yarza, P.; Peplies, J.; Glocker, F.O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 2013, *41,* (D1): D590-D596. DOI: 10.1093/nar/gks1219

26. Richards, P.; Fothergill, J.; Bernardeau, M.; Wigley, P. Development of the Caecal Microbiota in Three Broiler Breeds. *Front. Vet. Sci.* 2019, *6,* 201. *https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00201*

27. Rognes, T.; Flouri, T.; Nichols, B.; Quince, C.; Mahe, F. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. PeerJ. 2016, 18, 4:e2584. DOI: 10.7717/peerj.2584

28. Roshchin, V.I.; Vasilev, S.N.; Pavlutskaja, I.S.; Kolodynskaja, L.A. Method for processing wood green of conifers. 1994, Russia 382 Patent No. RU 2 017 782 C1. *https://yandex.ru/patents/doc/RU2017782C1_19940815*

29. Rychlik, I. Composition and function of chicken gut microbiota. *Animals.* 2020, *10,* 103. *https://doi.org/10.3390/ani10010103*

30. Shannon, C. E. A mathematical theory of communication. *Bell Syst. Tech.* 1948, *27,* 379-423. *https://doi.org/10.1002/j.1538-7305.1948.tb01338.x*

31. Simpson, E.H. Measurement of Diversity. *Nature.* 1949, *163,* 688. *https://doi.org/10.1038/163688a0*

32. Sørensen, T.J. A method of establishing groups of equal amplitude in plant sociology based on similarity of species content and its application to analyses of the vegetation on Danish commons. Kongelige Danske videnskabernes selskab: Selskab, 1948.

33. St-Pierre, B.; Cersosimo, L. M.; Ishaq, S. L.; Wright, A-D. G. Toward the identification of methanogenic archaeal groups as 433 targets of methane mitigation in livestock animals. Front. Microbiol. 2015, 6, 776. *https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00776*

34. Zeng, W. C.; Jia, L.R. ; Zhang, Y.; Cen, J. Q.; Chen, X.; Gao, H.; Feng, S.; Huang, Y. N. Antibrowning and antimicrobial activities of the water-soluble extract from pine needles of Cedrus deodara. J Food Sci. 2011, 76, C318–C323. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2010.02023.x

Table 1. Preparation of supplemented feed

	Week 1	**Week 2**	**Week 3**	**Week 4**
Average body weight per bird	200 g	270 g	340 g	410 g
Amount of daily intake of feed per bird	24 g	29 g	34 g	38 g
Amount of feed for 20 birds for 7 days	3360 g	4060 g	4760 g	5320 g
Group B (30 mg extract per kg b.w.)				
Amount of daily intake of extract per bird	6.0 mg	8.1 mg	10.2 mg	12.3 mg
Amount of extract for 20 chickens for a week	840 mg	1134 mg	1428 mg	1722 mg
% of supplement in feed	0.025	0.027	0.030	0.032
Group C (60 mg extract per kg b.w.)				
Amount of daily intake of extract per bird	12.0 mg	16.2 mg	20.4 mg	24.6 mg
Amount of extract for 20 chickens for a week	1680 mg	2268 mg	2856 mg	3444 mg
% of supplement in feed	0.050	0.054	0.060	0.064

Table 2. Differentially abundant taxa in the caecal microbiota

Phylum	Class	Order	Family	Genus	Coefficient from linear model	P value	Q value
Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Bacteroidaceae	*Bacteroides*	0.0543	0.0126	0.1428
Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Barnesiellaceae		-0.5771	0.0051	0.0956
Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Marinifilaceae	*Odoribacter*	0.2604	0.0010	0.0520
Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Prevotellaceae		0.5776	0.0115	0.1428
Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Rikenellaceae	*Alistipes*	-0.1958	0.0251	0.1963
Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Rikenellaceae	*Rikenellaceae* RC9 gut group	-0.5106	0.0273	0.1963
Campilobacte-rota	Campylo-bacteria	Campylobactera-les	Campylobactera-ceae	*Campylobacter*	-0.6528	0.0040	0.0956
Deferribacte-rota	Deferribactere	Deferribacterales	Deferribactera-ceae	*Mucispirillum*	0.2749	0.0013	0.0520
Euryarchaeota	Methano-bacteria	Methanobacteria-les	Methanobacteria-ceae	*Methanobrevi-bacter*	-0.1979	0.0261	0.1963
Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	*Eubacterium hallii* group	-0.1817	0.0060	0.0956
Synergistota	Synergistia	Synergistales	Synergistaceae	*Cloacibacillus*	-0.2144	0.0171	0.1685

Figure caption. Fig. 1. Phylum-level composition of the caecal microbiota of chicken. Three groups (five replicates in each group) represent different treatments, as indicated.