

UTJECAJ PROPOLISA I PČELINJEG PELUDA NA SASTAV MIKROBIOLOŠKE FLORE VOLJKE BROJLERA

THE INFLUENCE OF PROPOLIS AND BEE POLLEN ON THE COMPOSITION OF THE MICROBIOLOGICAL FLORA OF A BROILER'S CROP

Ivana Prakatur, M. Domaćinović, Mirela Pavić Vulinović, Danijela Samac

Izvorni znanstveni članak – Original scientific paper
Primljeno - Received: 16. kolovoz – August 2022

SAŽETAK

Cilj ovoga istraživanja bio je utvrditi utjecaj dodatka propolisa i/ili pčelinjeg peluda krmnim smjesama brojlera na sastav mikrobiološke flore voljke. Istraživanje je provedeno na ukupno 200 jednodневnih pilića hibrida Ross 308 ravnomjerno raspoređenih spolova, koji su bili podijeljeni u pet skupina. Tijekom cijeloga pokusa kontrolna je skupina pilića hranjena krmnom smjesom, dok su pokusne skupine pilića hranjene istom krmnom smjesom uz dodatak propolisa i pčelinjeg peluda, svakim dodatkom zasebno ili u kombinaciji u određenome omjeru. Tov pilića trajao je 42 dana, podnim načinom držanja na stelji od drvene strugotine. Pilići su od 1. do 21. dana istraživanja bili hranjeni standardnom krmnom smjesom starter, a od 22. do 42. dana istraživanja krmnom smjesom finišer. Hranidba kao i napajanje pilića tijekom istraživanja bili su po volji. Na kraju istraživanja, 42. dan te nakon 10-satnog gladovanja slučajnim je odabirom žrtvovano po 10 pilića iz svake skupine. U sterilne bočice uzeti su uzorci sadržaja voljki u kojima se u ovlaštenom mikrobiološkom laboratoriju utvrđivao ukupni broj bakterija, broj bakterija iz roda *Enterobacteriaceae* te broj bakterija iz roda *Lactobacillus*. Mikrobiološka analiza sadržaja voljke pokazala je kako među skupinama pilića nisu postojale statistički značajne razlike u ukupnom broju bakterija i broju bakterija iz roda *Lactobacillus* dok su postojale statistički značajne razlike u broju bakterija iz roda *Enterobacteriaceae* ($P=0,042$) u sadržaju voljke pilića kontrolne i pokusnih skupina. Provedeno istraživanje potvrdilo je kako dodatak propolisa i/ili pčelinjeg peluda krmnoj smjesi za tov pilića značajno pozitivno utječe na pojavu korisnih i patogenih mikroorganizama u sadržaju voljke brojlera, što se očitovalo statistički značajno manjom vrijednosti broja bakterija iz roda *Enterobacteriaceae* u sadržaju voljke pilića pokusnih skupina 42. dana tova u odnosu na piliće kontrolne skupine.

Ključne riječi: prirodni dodatci, propolis, pčelinji pelud, brojleri, voljka

UVOD

Dugi niz godina u uzgoju su se životinja, za poboljšanje proizvodnih pokazatelja te zdravlja životinja, kao i za učinkovito suzbijanje uzročnika bolesti te održavanje ravnoteže ekosustava u crijevima koristile subterapijske doze antibiotika (Nemauluma i sur., 2022.; Prakatur i sur., 2019.; Klarić i sur., 2018.; Puvača, 2018.). Naime, zbog negativnih učinaka upotrebe antibiotika u hranidbi brojlera, koji se očituju kroz pojavu rezistencije bakterija i njihovu neselektivnost djelovanja u probavnom traktu (uništavanje korisnih bakterija) te prisutnost rezidua antibiotika u konačnom proizvodu, Europska komisija je 2006. godine zabranila upotrebu antibiotika kao promotora rasta (Petričević i sur., 2022.; Manav i sur., 2020.; Prakatur i sur., 2019.; Klarić i sur., 2018.). Kao posljedica zabrane antibiotika kao promotora rasta, trebalo je pronaći alternativna rješenja koja će omogućiti proizvodnju dovoljne količine sigurnog konačnog proizvoda, što je i zahtjev samih potrošača kao krajnjih korisnika. Kao posljedica navedenoga prirodne tvari kao što su propolis i pčelinji pelud dobili su na značenju kao moguće zamjene za zabranjene antibiotike u hranidbi brojlera zbog svoga širokog spektra te potencijalnih korisnih učinaka na organizam životinja (Petričević i sur., 2022.; Prakatur i sur., 2019.; Puvača, 2018.; Kiczorowska i sur., 2017.).

Pčelinji proizvodi smatraju se potencijalnim izvorom prirodnih antioksidansa kao što su flavonoidi, fenolne kiseline ili terpenoidi te su se u novije vrijeme nametnuli kao mogući prirodni dodatci u hranidbi peradi zbog svojih ljekovitih svojstava te moguće prebiotičke aktivnosti (Petričević i sur., 2022.; Khalifa i sur., 2021.; Manav i sur., 2020.; Puvača, 2018.; Trembecká i sur., 2017.). Propolis se na različite načine upotrebljava još od antičkih vremena pa sve do danas (Klarić i sur., 2018.; Sforcin, 2007.). Propolis je ljepljivi pčelinji proizvod, aromatičan i oštrog mirisa, varira od crne do žute boje ovisno o izvoru. Propolis se općenito sastoji od 50 % smole i balzama, 30 % voska, 10 % eteričnih i aromatičnih ulja, 5 % peludnih zrnaca i drugih tvari kao što su polifenolne tvari, npr. organski fenolni spojevi, flavonoidi, terpeni, ketoni te drveni fragmenti (Bhargava i sur., 2021.; Almuhayawi, 2020.; Konanç i Ozturk, 2020.; Klarić i sur., 2018.; Trembecká i sur., 2017.; Sforcin, 2007.). Propolis pčele sakupljaju iz pupova biljaka, stabala i lišća biljaka kao smolastu, prirodnu te jako ljepljivu tvar pomiješanu s tvarima kao što su pelud

te enzimi koje luče pčele. Stoga se propolis smatra u isto vrijeme pripadnikom skupine prirodnih dodataka životinjskog i biljnog podrijetla (Jabbar i sur., 2022.; Prakatur i sur., 2020.; Klaric i sur., 2018.a). Koristi se za zaštitu košnice od prirodnih događaja kao što je kiša ili za sprječavanje bakterijske invazije same košnice (AL-Kahtani i sur., 2022.; Bhargava i sur., 2021.; Almuhayawi, 2020.; Haščik i sur., 2020.; Konanç i Ozturk, 2020.). Propolis ima širok raspon bioloških aktivnosti. Kemijski sastav propolisa je jako kompleksan te je u njemu detektirano preko 300 kemijskih spojeva. Propolis sadrži razne spojeve kao što su masne kiseline, amino kiseline, steroidi, terpenoidi, aromatske kiseline, flavonoidi, fenolni spojevi, minerali, vitamini B kompleksa (B₁, B₂, B₆), vitamine C i E, anorganski spojevi i šećeri. Sadrži brojne minerale, kao što su Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na i Zn (Jabbar i sur., 2022.; Bhargava i sur., 2021.; Sadarman i sur., 2021.; Almuhayawi, 2020.; Domaćinović i sur., 2020.; Haščik i sur., 2020.; Konanç i Ozturk, 2020.; Manav i sur., 2020.). Sve prethodno spomenute bioaktivne komponente propolisa pridonose njegovom antioksidativnom, antibakterijskom, antifungalnom, protuupalnom, hepatoprotektivnom, antikancerogenom te imunostimulirajućem djelovanju (Bhargava i sur., 2021.; Sadarman i sur., 2021.; Domaćinović i sur., 2020.; Prakatur i sur., 2020.; Manav i sur., 2020.; Prakatur i sur., 2019.). Pčelinji pelud sastavljen je od mnoštva nutricionistički vrijednih tvari, te se već stoljećima koristi u alternativnoj medicini kao i u različitim hranidbenim režimima, gdje je obično uvršten kao dodatak hrani za ljude ili životinje (Nemauluma i sur., 2022.; Capcarova i sur., 2013.). Ovaj pčelinji proizvod sastoji se od muških spolnih stanica biljaka te je do danas, u njemu identificirano više od 250 različitih kemijskih tvari, koje uključuju ugljikohidrate, bjelančevine, masti, makro i mikroelemente, vitamine (A, C, D, E, vitamini B kompleksa), organske kiseline, esencijalna ulja, enzime i druge tvari. U njegovu sastavu nalaze se i brojne fitokemikalije od kojih su najznačajniji polifenolni spojevi, flavonoidi, fitosteroli, terpeni i karotenoidi. Riječ je zapravo o jednoj kuglastoj nakupini, sastavljenoj od peludnih zrnaca dobivenih iz peludi različitih biljaka pomiješanih s pčelinjim probavnim enzimima te nektarom (Ilie i sur., 2022.; Nemauluma i sur., 2022.; Petričević i sur., 2022.; Hsu i sur., 2021.; Klaric i sur., 2018.b; Trembecká i sur., 2017.). Bioaktivni sastojci pčelinjeg peluda su flavonoidi koji su ujedno odgovorni za antifungalne, antiviralne, baktericidne, antiok-

sidativne te imunostimulirajuće i imunomodulirajuće učinke ovih spojeva ali i fenolne kiseline i njihovi derivati. Od fenolnih spojeva prisutnih u pčelinjem peludu najznačajniji su kafenska kiselina, kemferol, kvercetin te naringenin (AL-Kahtani i sur., 2022.; Ilie i sur., 2022.; Nemauluma i sur., 2022.; Petričević i sur., 2022.; Hsu i sur., 2021.; Khalifa i sur., 2021.; Prakatur i sur., 2019.; Trembecká i sur., 2017.).

Zajednica gastrointestinalne mikroflore ima važnu ulogu u mnogim fiziološkim i imunološkim procesima. Kod peradi, gastrointestinalni trakt je sterilan u trenutku izlijevanja životinje, pružajući peradarskoj proizvodnji jedinstvenu priliku da ima značajnu kontrolu nad mikrobnom kolonizacijom mladih jedinki (Fathima i sur., 2022.; Hammons i sur., 2010.; Hilmi i sur., 2007.). Mikroorganizmi su univerzalno prisutni u različitim dijelovima organizma gdje obavljaju raznolike funkcije. Jedno od važnih mjesta gdje se oni nalaze u većim kolonizacijama je gastrointestinalni trakt životinja. Najveće kolonizacije mikroorganizama nalaze se u crijevima te voljki peradi (Mir i Lone, 2018.; Waite i Taylor, 2015.; Guan i sur., 2003.). Voljka (*ingluvies*) kod peradi je vretenasto vrećasto proširenje jednjaka koje leži uz prsne mišiće na bazi vrata, a najizraženija te ujedno i najvidljivija je odmah neposredno nakon hranjenja životinje. Voljka je primarno mjesto kolonizacije mikroorganizama koji su vrlo važni za funkcioniranje ostatka gastrointestinalnog trakta (Wessels, 2022.; Grond i sur., 2018.; Kierończyk i sur., 2016.; Classen, 2014.). Hrana se u voljci zadržava različito, od 1 do 24 sata. Zrnata i suha hrana u voljci se zadržava od 16 do 24 sata. Uloga je voljke privremeno skladištenje hrane dok je mišićni želudac pun. Sadržaj voljke stalno se prazni i u malim porcijama otpušta u želudac (Bogut i sur., 2013.). Voljka ima važnu ulogu i u vlaženju hrane, a predstavlja i barijeru za patogene mikroorganizme smanjenjem vrijednosti pH. Na dorzalnoj stijenki voljke smještene su sluzne žlijezde koje proizvode te izlučuju male količine mukoznog sekreta koji služi za natapanje i omekšavanje hrane. Pri pH vrijednostima od 4 do 6 u voljci počinje razgradnja bjelančevina i masti pod utjecajem enzima koje izlučuje saprofitna mikloflora te enzima pristiglih želučanim i crijevnim refluksom (Bogut i sur., 2013.; Classen i sur., 2016.; Kierończyk i sur., 2016.; Classen, 2014.). Funkcioniranje ovoga organa ovisi o brojnim čimbenicima kao što su dob, tjelesna masa, način hranidbe, spol te svakako neizostavno udio hrane koja ulazi u voljku te vrijeme koje u njoj provede kao i moguće pojave

različitih infekcija (Classen i sur., 2016.; Kierończyk i sur., 2016.). Štoviše, rezultati recentnog istraživanja upućuju na to da ovaj segment gastrointestinalnog trakta može igrati važnu ulogu u regulaciji urođenog imunološkog sustava peradi (Kierończyk i sur., 2016.). Voljka sadrži veliku bakterijsku zajednicu koja se sastoji od bakterijskih stanica u rasponu od 1×10^8 do 1×10^9 CFU (*eng. colony forming units*; hrv. jedinice koje tvore kolonije) g^{-1} . Voljka je pretežno kolonizirana gram-pozitivnim bakterijama poput *Lactobacillus spp.* posebno *Lactobacillus salivarius*, *L. fermentum*, *L. reuteri* i *L. acidophilus* (Fathima i sur., 2022.; Rychlik, 2020.; Mir i Lone, 2018.; Kierończyk i sur., 2016.; Hammons i sur., 2010.; Hilmi i sur., 2007.; Guan i sur., 2003.). Ostale bakterijske vrste izolirane iz voljke uključuju *Bifidobacterium*, *Klebsiella pneumoniae*, *K. ozaenae*, *Escherichia coli*, *E. fergusonii*, *Enterobacter aerogenes*, *Eubacterium spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus lentus* i *Sarcina spp.* (Fathima i sur., 2022.; Rychlik, 2020.; Wessels, 2022.; Kierończyk i sur., 2016.; Smith i Berrang, 2006.). Laktobacili imaju mogućnost suzbijanja stvaranja kolonija *Salmonelle* i *E. coli* u probavnom traktu peradi jer svojim fermentacijama izlučuju kiseline i snižavaju pH voljke na 4,5 do 6. Upravo to spuštanje pH vrijednosti u voljci može poboljšati i apsorpciju hranjivih tvari ujedno time pokazujući jedan pozitivan i nadasve koristan učinak Laktobacila u voljci. Može se reći kako manje promjene u sastavu hrane za piliće mogu uvelike utjecati na sojeve Laktobacila koji se mogu profilirati u gornjem dijelu probavnog trakta pilića. Utjecaj hrane na populaciju Laktobacila vrlo je bitan jer se te bakterije često koriste kao probiotici u hranidbi peradi (Classen i sur., 2016.; Hammons i sur., 2010.; Hilmi i sur., 2007.). Voljka kao prva prepreka kolonizaciji mikroorganizama posebno je važna u smislu cjelovitosti i homeostaze mikroflore daljnjih dijelova gastrointestinalnog trakta s dobro uspostavljenom adaptivnom i urođenom imunološkom funkcijom. Neizravno, voljka je uključena u suzbijanje potencijalno patogenih bakterija i smanjuje kontaminaciju daljnjih dijelova gastrointestinalnog trakta peradi. Međutim, sastav mikrobnih populacija voljke može se promijeniti pod utjecajem hranidbenih čimbenika dodavanjem različitih prirodnih dodataka hrani za životinje na način da se pokuša spriječiti razmnožavanje patogenih bakterija te posljedično tome poboljša imunološki status i zdravstveno stanje životinja (Classen i sur., 2016.; Kierończyk i sur.,

2016.; Classen, 2014.; Kročko i sur., 2012.). Visoka granica sigurnosti prirodnih proizvoda kao dodatka u usporedbi s komercijalnim dodatcima učinila ih je popularnima kao dodatcima stočnoj hrani, osobito u zemljama u razvoju u nastojanju da se postigne ravnoteža između profitabilnosti i sigurnosti životinjskih proizvoda (Nemauluma i sur., 2022.).

Uzimajući sve prethodno spomenuto u obzir cilj je ovoga istraživanja bio utvrditi utjecaj dodatka propolisa i/ili pčelinjeg peluda krmnim smjesama brojlera na sastav mikrobiološke flore voljke.

MATERIJAL I METODE

Istraživanje je provedeno na ukupno 200 jednodnevnih pilića hibrida Ross 308 pri čemu su spolovi bili ravnomjerno raspoređeni. Svi pilići bili su podijeljeni u pet skupina jednakog broja (40 pilića u svakoj): jedna kontrolna skupina (K) i četiri pokusne skupine (P1, P2, P3, P4). Sedmog dana pokusa svi su pilići bili označeni prstenovima. Tov pilića trajao je 42 dana, podnim načinom držanja na steli od drvene strugotine. U razdoblju od 1. do 21. dana istraživanja pilići su bili hranjeni standardnom krmnom smjesom starter (21,02 % sirovih bjelančevina), a u razdoblju od 22. do 42. dana istraživanja krmnom smjesom finiše (19,15 % sirovih bjelančevina) prema recepturi Tvornice stočne hrane Valpovka, Valpovo (Tablica 1.). Tijekom cijelog pokusa hrana i voda pilićima su bile dostupne po volji. Za vrijeme cijelog istraživanja K skupina pilića bila je hranjena standardnom krmnom smjesom bez istraživanih podataka dok su skupine P1, P2, P3 i P4 bile hranjene standardnom krmnom smjesom uz dodatak propolisa i/ili pčelinjeg peluda, svaki dodatak zasebno ili u njihovoj kombinaciji u određenom omjeru. Dodatci krmnoj smjesi u pokusnim skupinama pilića bili su kako slijedi: skupina P1 - propolis u koncentraciji od 0,25 g/kg smjese uz 20 g pčelinjeg peluda/kg smjese; skupina P2 - 0,5 g propolisa/kg smjese; skupina P3 - 1,0 g propolisa/kg smjese i skupina P4 - 20 g pčelinjeg peluda/kg smjese. I propolis i pčelinji pelud korišteni u ovom pokusu su prije umješavanja u krmnu smjesu bili usitnjeni, a njihovo umješavanje u standardne krmne smjese obavljeno je u Tvornici stočne hrane Valpovka, Valpovo. Na kraju istraživanja, 42. dan te nakon 10-satnog gladovanja slučajnim je odabirom žrtvovano po deset pilića iz svake skupine. Svim žrtvovanim pilićima uzeti su uzorci sadržaja

voljki u sterilne bočice te se u izuzetim uzorcima u mikrobiološkom laboratoriju utvrđivao ukupni broj bakterija (HRN EN ISO 4833, 2008), broj bakterija iz roda *Enterobacteriaceae* (HRN ISO 21528-2, 2008) te broj bakterija iz roda *Lactobacillus* (HRN EN ISO 4833, 2008). Transport uzoraka u sterilnim bočicama proveden je pomoću prijenosnog hladnjaka te su svi izuzeti uzorci istog dana dopremljeni u mikrobiološki laboratorij, gdje je započeta analiza u razdoblju unutar jednog sata od uzorkovanja sadržaja voljke kako bi se spriječio nekontrolirani razvoj mikroorganizama u uzorcima. Za potrebe nasađivanja korisne su gotove, komercijalno dostupne podloge za ukupan broj bakterija (Standard metoda agar), broj bakterija iz roda *Enterobacteriaceae* (VRBD agar) te broj bakterija iz roda *Lactobacillus* (MRS agar). Mikrobiološke analize svih prikupljenih uzoraka bile su obavljene u Službi za mikrobiologiju Zavoda za javno zdravstvo Osječko-baranjske županije.

Za obradu podataka korišten je statistički paket Statistica for Windows 2010 (inačica 10.0, StatSoft Inc., Tulsa, OK). Za utvrđivanje oblika distribucije svih varijabli upotrijebljen je Shapiro-Wilkinsonov test. Za usporedbu vrijednosti numeričkih varijabli više nezavisnih skupina kod varijabli kod kojih nije utvrđena normalna distribucija korišten je Kruskal-Wallis test. Za utvrđivanje razlika između pojedinih skupina, kod varijabli koje nisu bile normalno distribuirane nakon testiranja Kruskal-Wallis testom, primijenjen je Mann-Whitney U test. Značajnost razlika utvrđenih statističkim testiranjem iskazana je na razinama $P < 0,05$ te $P < 0,01$.

REZULTATI I RASPRAVA

Na Grafikonu 1. prikazan je ukupan broj bakterija u sadržaju voljki pilića 42. dana tova. Prosječne vrijednosti ukupnog broja bakterija u sadržaju voljke pilića na kraju tova u K skupini su iznosile $31,73 \times 10^4$, u P1 skupini $25,21 \times 10^4$, u P2 skupini $53,20 \times 10^4$, u P3 skupini $12,70 \times 10^4$ te u P4 skupini $4,60 \times 10^4$.

Na Grafikonu 2. prikazan je broj bakterija iz roda *Lactobacillus* u sadržaju voljki pilića 42. dana tova. Prosječne vrijednosti broja bakterija iz roda *Lactobacillus* u sadržaju voljke pilića na kraju tova u K skupini su iznosile $14,74 \times 10^4$, u P1 skupini $11,44 \times 10^4$, u P2 skupini $1,53 \times 10^4$, u P3 skupini $20,35 \times 10^4$ te u P4 skupini $10,44 \times 10^4$.

Na Grafikonu 3. prikazan je broj bakterija iz roda *Enterobacteriaceae* u sadržaju voljki pilića 42. dana tova. Prosječne vrijednosti broja bakterija iz roda *Enterobacteriaceae* u sadržaju voljke pilića na kraju tova u K skupini su iznosile $30,31 \times 10^4$, u P1 skupini $11,27 \times 10^4$, u P2 skupini $54,10 \times 10^4$, u P3 skupini $13,32 \times 10^4$ te u P4 skupini $13,51 \times 10^4$.

Statističkom analizom je utvrđeno kako ne postoji statistički značajna razlika u ukupnom broju bakterija u sadržaju voljke (Kruskal-Wallis test; $P=0,600$) te broju bakterija iz roda *Lactobacillus* u sadržaju voljke (Kruskal-Wallis test; $P=0,773$) između analiziranih skupina pilića na kraju tova.

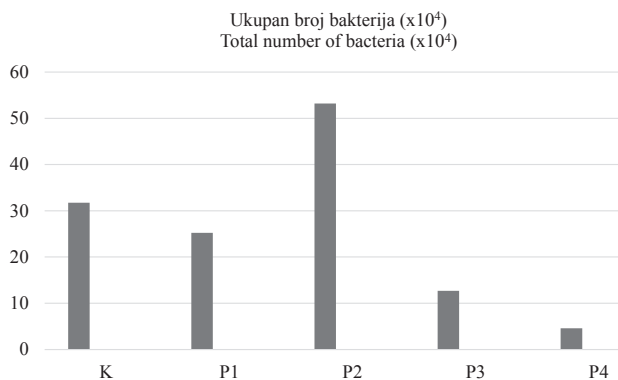
Tablica 1. Sastav i izračunata analiza krmnih smjesa

Table 1 The composition and calculated analysis of feed mixture

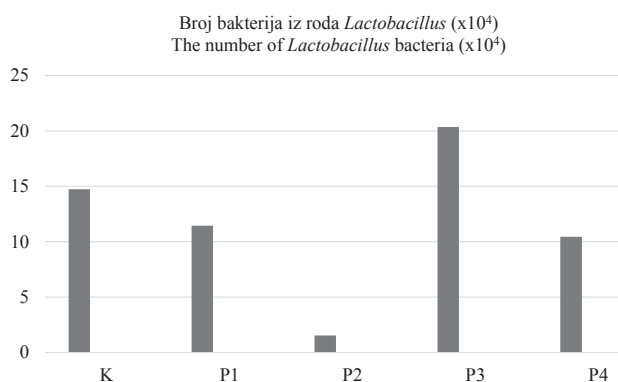
| Krmiva, % Fodders, % | Starter | Finišer / Finisher |
|---|-----------------------|-------------------------|
| | 1.–21. dan / 1–21 day | 22.–42. dan / 22–42 day |
| Kukuruz zrno / Corn grain | 45,00 | 46,10 |
| Saćma soje / Soybean meal | 20,20 | 10,00 |
| Soja punomasna/ Full fat soybean | 12,40 | 20,00 |
| Saćma suncokreta / Sunflower meal | 4,00 | 4,00 |
| Dehidrirana lucerna / Dehydrated alfalfa | 2,80 | 4,00 |
| Krmno brašno / Flour middling | 2,80 | 3,00 |
| Stočni kvasac / Yeast | 4,00 | 3,00 |
| Biljno ulje / Vegetable oil | 3,70 | 5,00 |
| Vapnenac / Limestone | 1,60 | 1,40 |
| MKF / Monocalcium phosphate | 1,20 | 1,20 |
| Sol / Salt | 0,30 | 0,30 |
| Valpopremiks / Valopremix | 1,00 | 1,00 |
| Pigozen 801 | 1,00 | 1,00 |
| Ukupno / Total | 100,00 | 100,00 |
| Izračunata analiza / Calculated analysis | | |
| Sirove bjelančevine, % / Crude protein, % | 21,02 | 19,15 |
| Sirova vlakna, % / Crude fiber, % | 4,96 | 5,05 |
| Sirova mast, % / Crude fat, % | 8,36 | 10,96 |
| Lizin, % / Lysine, % | 1,11 | 0,96 |
| Metionin, % / Methionine, % | 0,66 | 0,61 |
| Triptofan, % / Tryptophan, % | 0,26 | 0,23 |
| Kalcij, % / Calcium, % | 1,04 | 0,98 |
| Fosfor, % / Phosphorus, % | 0,70 | 0,67 |
| ME, MJ/kg | 12,30 | 13,10 |

* Sastav Valpopremiksa: vitamin A 1200,000 IJ; vitamin D3 200,000 IJ; vitamin E 3000 mg; vitamin K3 250 mg; vitamin B1 150 mg; vitamin B2 600 mg; vitamin B6 200 mg; vitamin B12 1 mg; folna kiselina 50 mg; niacin 4400 mg; Ca pantotenat 1500 mg; biotin 10mg; kolin klorid 50,000 mg; željezo 5000 mg; bakar 700 mg; mangan 8000 mg; cink 5000 mg; jod 75 mg; kobalt 20 mg; magnezij 750 mg; selen 15 mg; antioksidans BHT 10,000 mg; metionin 100,000 mg; biljni nosač 1000 g.

* Composition of Valpopremix: vitamin A 1200,000 IU; vitamin D3 200,000 IU; vitamin E 3000 mg; vitamin K3 250 mg; vitamin B1 150 mg; vitamin B2 600 mg; vitamin B6 200 mg; vitamin B12 1 mg; folic acid 50 mg; niacin 4400 mg; Ca pantothenate 1500 mg; biotin 10mg; choline chloride 50,000 mg; iron 5000 mg; copper 700 mg; manganese 8000 mg; zinc 5000 mg; iodine 75 mg; cobalt 20 mg; magnesium 750 mg; selenium 15 mg; antioxidant butylated hydroxytoluene (BHT) 10,000 mg; methionine 100,000 mg; herbal carrier 1000 g.

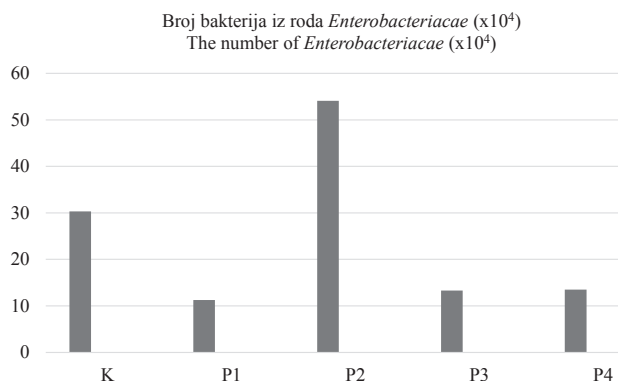


Grafikon 1. Ukupan broj bakterija u sadržaju voljki pilića
 Graph 1 Total number of bacteria in a broiler's crop



Grafikon 2. Broj bakterija iz roda *Lactobacillus* u sadržaju voljki pilića

Graph 2 The number of *Lactobacillus* bacteria in a broiler's crop



Grafikon 3. Broj bakterija iz roda *Enterobacteriaceae* u sadržaju voljki pilića

Graph 3 The number of *Enterobacteriaceae* in a broiler's crop

Statističkom analizom je nadalje utvrđeno kako postoji statistički značajna razlika u broju bakterija iz roda *Enterobacteriaceae* u sadržaju voljke (Kruskal-Wallis test; $P=0,042$) između analiziranih skupina pilića na kraju tova. Daljnjom analizom je utvrđeno kako postoji statistički značajna razlika u broju bakterija iz roda *Enterobacteriaceae* u sadržaju voljke između P1 i P2 skupine (Mann-Whitney U test; $P=0,008$); P2 i P3 skupine (Mann-Whitney U test; $P=0,012$) te P2 i P4 skupine (Mann-Whitney U test; $P=0,014$) pilića na kraju tova.

Analizirajući rezultate provedenih mikrobioloških analiza sadržaja voljke pilića na kraju tova vidljivo je kako među skupinama pilića nisu postojale statistički značajne razlike u ukupnom broju bakterija i broju bakterija iz roda *Lactobacillus* dok su postojale statistički značajne razlike u broju bakterija iz roda *Enterobacteriaceae* u sadržaju voljke pilića kontrolne i pokusnih skupina. Najveći ukupni broj bakterija te najveći broj bakterija iz roda *Enterobacteriaceae* u sadržaju voljke utvrđen je kod pilića P2 skupine te K skupine, dok je najveći broj bakterija iz roda *Lactobacillus* utvrđen kod pilića P3 skupine. Najmanji ukupni broj bakterija u sadržaju voljke utvrđen je u pilića P4 skupine, najmanji broj bakterija iz roda *Enterobacteriaceae* utvrđen je u sadržaju voljke pilića P1 skupine, a najmanji broj bakterija iz roda *Lactobacillus* utvrđen je pak u sadržaju voljke pilića P2 skupine. Rezultati ovog istraživanja djelomično se podudaraju s rezultatima istraživanja Kročko i sur. (2012.) koji su u svom istraživanju pokazali kako su niske doze propolisa dodane smjesi (400 mg/kg) i visoke doze pčelinjeg peluda dodane smjesi pilića (45 g/kg) statistički značajno smanjile broj bakterija iz roda *Enterobacteriaceae* u sadržaju voljke. Spomenuto istraživanje Kročko i sur. (2012.) uz to je pokazalo kako se broj korisnih bakterija mliječne kiseline (laktobacila) povećao dodatkom propolisa smjesama, što je potvrđeno u ovom istraživanju budući da je najveći broj bakterija iz roda *Lactobacillus* utvrđen kod pilića P3 skupine koji su konzumirali smjesu s najvećom količinom propolisa. Pri tumačenju rezultata ovog istraživanja veza-nog uz brojnost bakterija iz roda *Enterobacteriaceae* treba imati na umu kako voljka ima prirodnu sposobnost sprječavanja rasta salmonela i ostalih bakterija iz roda *Enterobacteriaceae* (Ramirez i sur., 1997.; Hinton i sur., 2000.), a koja je pak značajno

smanjena u situacijama kada je životinjama tijekom nekog vremena uskraćen pristup hrani (Hinton i sur., 2000.a). S obzirom na činjenicu da su pilići u ovom istraživanju bili izloženi 10–satnom gladovanju spomenuti se utjecaj gladovanja nikako ne smije zanemariti. Sukladno prethodno navedenom može se ustvrditi kako nakon gladovanja pilića, voljka zapravo predstavlja jedan od rezervoara *Salmonella* i drugih bakterija iz roda *Enterobacteriaceae* kod pilića kojima je uskraćen pristup hrani (Hinton i sur., 2000.a). Budući da se tijekom gladovanja pilića voljka zapravo isprazni, dolazi do snižavanja njezine prirodne inhibitorne aktivnosti usmjerene na rast bakterija iz roda *Enterobacteriaceae* (Hinton i sur., 2000.a). Istraživači smatraju kako je spomenuto snižavanje inhibitorne aktivnosti voljke usmjerene na rast bakterija iz roda *Enterobacteriaceae* tijekom gladovanja povezano sa snižavanjem broja bakterija iz roda *Lactobacillus*, snižavanjem koncentracije octene, propionske i mliječne kiseline u voljci te povećanjem pH sadržaja voljke (Hinton i sur., 2000.; Hinton i sur., 2000.a). Navedeni obrnuto proporcionalni odnos između broja bakterija iz roda *Lactobacillus* te bakterija iz roda *Enterobacteriaceae* slijedom kojeg prisutnost većeg broja jednih u sadržaju voljke pilića istodobno znači manji broj drugih dokazan je i u ovom istraživanju budući da je razvidno da je kod skupine pilića P2, u kojoj je utvrđen najveći broj bakterija iz roda *Enterobacteriaceae* istovremeno utvrđen najmanji broj bakterija iz roda *Lactobacillus* u sadržaju voljke.

ZAKLJUČAK

Provedeno istraživanje potvrdilo je kako dodatak propolisa i/ili pčelinjeg peluda krmnoj smjesi za tov pilića značajno pozitivno utječe na pojavu korisnih i patogenih mikroorganizama u sadržaju voljke, što je vidljivo iz statistički značajno manje vrijednosti broja bakterija iz roda *Enterobacteriaceae* u sadržaju voljke pilića pokusnih skupina na kraju tova u odnosu na piliće kontrolne skupine. Istraživanje je naposljetku također potvrdilo kako postoji obrnuto proporcionalni odnos između broja bakterija iz roda *Lactobacillus* i broja bakterija iz roda *Enterobacteriaceae* slijedom čega prisutnost većeg broja jednih bakterija u sadržaju voljke pilića istodobno znači manji broj drugih.

LITERATURA

1. Al-Kahtani, S. N., Alaqil, A. A., Abbas, A. O. (2022.): Modulation of Antioxidant Defense, Immune Response, and Growth Performance by Inclusion of Propolis and Bee Pollen into Broiler Diets. *Animals*, 12(13): 1658.
2. Almuhayawi, M. S. (2020.): Propolis as a novel antibacterial agent. *Saudi journal of biological sciences*, 27(11): 3079–3086.
3. Bhargava, P., Mahanta, D., Kaul, A., Ishida, Y., Terao, K., Wadhwa, R., Kaul, S. C. (2021.): Experimental evidence for therapeutic potentials of propolis. *Nutrients*, 13(8): 2528.
4. Bogut, I., Grbavac, J., Križek, I. (2013.): Morfofiziologija probavnog sustava domaćih životinja i riba. Poljoprivredni fakultet u Osijeku; Agronomski i prehrambeno-tehnološki fakultet u Mostaru.
5. Capcarova, M., Kolesarova, A., Kalafova, A., Galik, B., Simko, M., Juracek, M., Toman, R. (2013.): The role of dietary bee pollen in antioxidant potential in rats. *Eurasian Journal of Veterinary Science*, 29: 133–137.
6. Classen, H. L., Apajalahti, J., Svihus, B., Choct, M. (2016.): The role of the crop in poultry production. *World's Poultry Science Journal*, 72(3): 459–472.
7. Classen, H. L. (2014.): The crop: role in poultry performance and health. *Proceedings: Advancing Poultry Production, Massey Technical Update Conference*, vol. 16.
8. Domaćinović, M., Prakatur, I., Miškulin, I., Čačić Kenjerić, D., Šerić, V., Prakatur, B., Miškulin, M., Čačić Kenjerić, F. (2020.): The effects of propolis supplementation on weight gain, feed conversion and selected biochemical blood parameters of broilers. *Journal of Hygienic Engineering and Design*, 33: 138–143.
9. Fathima, S., Shanmugasundaram, R., Adams, D., Selvaraj, R. K. (2022.): Gastrointestinal Microbiota and Their Manipulation for Improved Growth and Performance in Chickens. *Foods*, 11(10): 1401.
10. Grond, K., Sandercock, B. K., Jumpponen, A., Zeglín, L. H. (2018.): The avian gut microbiota: community, physiology and function in wild birds. *Journal of Avian Biology*, 49(11): e01788.
11. Guan, L. L., Hagen, K. E., Tannock, G. W., Korver, D. R., Fasenko, G. M., Allison, G. E. (2003.): Detection and identification of *Lactobacillus* species in crops of broilers of different ages by using PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and amplified ribosomal DNA restriction analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(11): 6750–6757.

12. Hammons, S., Oh, P. L., Martínez, I., Clark, K., Schlegel, V. L., Sitorius, E., Scheideler, S.E., Walter, J. (2010.): A small variation in diet influences the *Lactobacillus* strain composition in the crop of broiler chickens. *Systematic and applied microbiology*, 33(5): 275–281.
13. Haščik, P., Pavelková, A., Tkáčová, J., Čuboň, J., Kačániová, M., Habánová, M., Mlyneková, E. (2020.): The amino acid profile of broiler chicken meat after dietary administration of bee products and probiotics. *Biologia*, 75(11): 1899–1908.
14. Hilmi, A., Surakka, H. T., Apajalahti, A., Saris, P. E. (2007.): Identification of the most abundant *Lactobacillus* species in the crop of 1-and 5-week-old broiler chickens. *Applied and environmental microbiology*, 73(24): 7867–7873.
15. Hinton, A. Jr., Buhr, R. J., Ingram, K. D. (2000.): Physical, chemical and microbiological changes in the crop of broiler chickens subjected to incremental feed withdrawal. *Poultry Science*, 79: 212–218.
16. Hinton, A. Jr., Buhr, R. J., Ingram, K.D. (2000.a): Reduction of *Salmonella* in the crop of broiler chickens subjected to feed withdrawal. *Poultry Science*, 79: 1566–1570.
17. HRN EN ISO 4833 (2008.): Horizontalna metoda brojenja mikroorganizama – tehnika brojenja kolonija na 30 °C.
18. HRN ISO 21528–2 (2008.): Horizontalna metoda za dokazivanje prisutnosti i brojenje *Enterobacteriaceae*– Metoda određivanja broja kolonija.
19. Hsu, P. S., Wu, T. H., Huang, M. Y., Wang, D. Y., & Wu, M. C. (2021.): Nutritive Value of 11 Bee Pollen Samples from Major Floral Sources in Taiwan. *Foods*, 10(9): 2229.
20. Ilie, C. I., Oprea, E., Geana, E. I., Spoiala, A., Buleandra, M., Gradisteanu Pircalabioru, G., Badea, I. A., Ficai, D., Andronesu, E., Ficai, A., Ditu, L.M. (2022.): Bee Pollen Extracts: Chemical Composition, Antioxidant Properties and Effect on the Growth of Selected Probiotic and Pathogenic Bacteria. *Antioxidants*, 11: 959.
21. Jabbar, A. M., Al Mashhdani, H. E., Farhan, S. H. (2022.): Effect of Adding Iraqi Bee Propolis in Diet on Production Performance and Histological Traits in Broilers. *Indian Journal of Ecology*, 49(18): 597–601.
22. Khalifa, S. A., Elashal, M. H., Yosri, N., Du, M., Mus-harraf, S. G., Nahar, L., Sarker, S. D., Guo, Z., Cao, W., Zou, X., El-Wahed, A. A., Xiao, J., Omar, H. A., Hegazy, M. E. F., El-Seedi, H. R. (2021.): Bee pollen: Current status and therapeutic potential. *Nutrients*, 13(6): 1876.
23. Kierończyk, B., Rawski, M., Długosz, J., Świątkiewicz, S., Józefiak, D. (2016.): Avian crop function—a review. *Annals of Animal Science*, 16(3): 653–678.
24. Kiczorowska, B., Samolińska, W., Al-Yasiry, A. R. M., Kiczorowski, P., Winiarska-Mieczan, A. (2017.): The natural feed additives as immunostimulants in monogastric animal nutrition—a review. *Annals of animal science*, 17(3): 605–625.
25. Klarić, I., Domaćinović, M., Šerić, V., Miškulin, I., Pavić, M., Paradinović, K. (2018.): Effects of bee pollen and propolis on performance, mortality, and some haematological blood parameters in broiler chickens. *Slovenian Veterinary Research*, 55(1): 23–34.
26. Klaric, I., Miskulin, I., Seric, V., Dumic, A., Jonjic, J., Miskulin, M. (2018.a): The effects of propolis and bee pollen supplementation on biochemical blood parameters of broilers. *Acta Veterinaria-Beograd*, 68(2): 190–200.
27. Klaric, I., Pavic, M., Miskulin, I., Blazicevic, V., Dumic, A., Miskulin, M. (2018.b): Influence of dietary supplementation of propolis and bee pollen on liver pathology in broiler chickens. *Animals*, 8(4): 54.
28. Konanç, K., Ozturk, E. (2020.): Use of propolis as a digestive system regulator in poultry. *Proceeding book, IV. International Eurasian Agriculture and Natural Sciences Congress*, pp 146.
29. Kročko, M., Čanigová, M., Bezeková, J., Lavová, M., Hašek, P., Ducková, V. (2012.): Effect of nutrition with propolis and bee pollen supplements on bacteria colonization pattern in gastrointestinal tract of broiler chickens. *Animal Science and Biotechnologies*, 45: 63–67.
30. Manav, S., Yilmaz, M., Baytekin, H., Çelik, K., Çağlı, A. (2020.): The use of propolis as an antimicrobial in livestock—an overview. *Agricultural Science & Technology*, 12(3): 205–209.
31. Mir, S. H., Lone, S. A. (2018.): Role of gut microbes in avian energy metabolism. *Int J Avian & Wildlife Biol*, 3(2): 109–110.
32. Nemauluma, M., Jw-Kolobe, S. D., E-Manyelo, T. G., Chitura, T. (2022.): Bee pollen an alternative to growth promoters for poultry production—a review. *Applied Ecology and Environmental Research*, 20(5): 3817–3832.
33. Prakatur, I., Miškulin, I., Senčić, Đ., Pavić, M., Miškulin, M., Samac, D., Galović, D., Domaćinović, M. (2020.): The influence of propolis and bee pollen on chicken meat quality. *Veterinarski arhiv*, 90(6): 617–625.

34. Prakatur, I., Miškulin, I., Galović, D., Steiner, Z., Lachner, B., Domaćinović, M. (2019.): Performance indicators of broilers fed propolis and bee pollen additive. *Poljoprivreda*, 25(1): 69–75.
35. Petričević, V., Lukić, M., Škrbić, Z., Rakonjac, S., Stanjković, A., Nikšić, D., Živković, V. (2022.): Production Parameters, microbiological Composition of Intestines and Slaughter Performance of Broilers fed with Bee Pollen. *Züchtungskunde*, 94(1): 36–46.
36. Puvača, N. (2018.): Honeybee and medicinal plants products in poultry postantibiotic era production. *Journal of Agronomy*, 11: 8–17.
37. Rychlik, I. (2020.): Composition and function of chicken gut microbiota. *Animals*, 10(1): 103.
38. Ramirez, G. A., Sarlin, L. L., Caldwell, D. J., Yezak, C. R. Jr., Hume, M. E., Corrier, D. E., DeLoach, J. R., Hargis, B. M. (1997.): Effect of feed withdrawal on the incidence of *Salmonella* in the crops and ceca of market age broiler chickens. *Poultry Science*, 76: 654–656.
39. Sadarman, S., Erwan, E., Irawan, A., Sholikin, M. M., Solfaine, R., Harahap, R. P., Irawan, A. C., Sofyan, A., Nahrowi, N., Jayanegara, A. (2021.): Propolis supplementation affects performance, intestinal morphology, and bacterial population of broiler chickens. *South African Journal of Animal Science*, 51(4): 477–487.
40. Sforcin, J. M. (2007.): Propolis and the immune system: a review. *Journal of Ethnopharmacology*, 113: 1–14.
41. Smith, D. P., Berrang, M. E. (2006.): Prevalence and numbers of bacteria in broiler crop and gizzard contents. *Poultry science*, 85(1): 144–147.
42. StatSoft, Inc. (2010.): *Statistica for Windows 2010* (inačica 10.0). StatSoft Inc., Tulsa, OK, SAD.
43. Trembecká, L., Haščík, P., Čuboň, J., Bobko, M., Cviková, P., Hleba, L. (2017.): Chemical and sensory characteristics of chicken breast meat after dietary supplementation with probiotic given in combination with bee pollen and propolis. *Journal of microbiology, biotechnology and food sciences*, 275–280.
44. Waite, D. W., Taylor, M. W. (2015.): Exploring the avian gut microbiota: current trends and future directions. *Frontiers in microbiology*, 6: 673.
45. Wessels, A. G. (2022.): Influence of the gut microbiome on feed intake of farm animals. *Microorganisms*, 10(7): 1305.

SUMMARY

The aim of this study was to determine the influence of the addition of propolis and/or bee pollen to broiler feed mixtures on the composition of the microbiological flora of a broiler's crop. The study was conducted on a total of 200 one-day-old chickens of the Ross 308 hybrid, evenly distributed between the sexes, which were divided into five groups. During the entire experiment, the control group of chickens was fed with a feed mixture, while the experimental groups of chickens were fed with the same feed mixture with the addition of propolis and bee pollen, each additive separately or in combination in a certain ratio. Fattening was conducted on the wooden sawdust, and lasted for 42 days. From days 1-21 of the study chickens were fed a feed mixture of starter, and from days 22-42 of the study they were fed a finisher feed mixture. During the study, feed and water were given to chickens' ad libitum. At the end of the study, on the 42nd day and after a 10-hour starvation, 10 chickens were randomly selected from each group and sacrificed. Samples of the broiler's crop contents were taken in sterile vials, in which the total number of bacteria, the number of bacteria from the genus *Enterobacteriaceae* and the number of bacteria from the genus *Lactobacillus* were determined in an authorized microbiological laboratory. Microbiological analysis of the broiler's crop contents showed that there were no statistically significant differences between the groups of chickens in the total number of bacteria and the number of bacteria from the genus *Lactobacillus*, while there were statistically significant differences in the number of bacteria from the genus *Enterobacteriaceae* ($P=0.042$) in the broiler's crop content of the chickens of the control and experimental groups. The present study confirmed that the addition of propolis and/or bee pollen to the feed mixtures has a significantly positive effect on the occurrence of beneficial and pathogenic microorganisms in the contents of broiler's crop, which was manifested by a statistically significantly lower number of bacteria from the genus *Enterobacteriaceae* in the broiler's crop content of chickens of the experimental groups on the 42nd day of fattening compared to chickens of the control group.

Key words: natural additives, propolis, bee pollen, broilers, broiler's crop