

Latvijas Lauksaimniecības universitāte
Latvia University of Life Sciences and Technologies

Veterinārmedicīnas fakultāte
Faculty of Veterinary Medicine



Sintija Jonova 

**TOPINAMBŪRA KONCENTRĀTA UN TĀ
KOMBINĀCIJAS AR SACCHAROMYCES CEREVISIAE
IETEKME UZ TEĻU POSTNATĀLO ATTĪSTĪBU**

***THE EFFECT OF JERUSALEM ARTICHOKE
CONCENTRATE AND ITS COMBINATION WITH
SACCHAROMYCES CEREVISIAE ON THE POSTNATAL
DEVELOPMENT OF CALVES***

Promocijas darba
KOPSAVILKUMS
Zinātniskā doktora grāda (*Ph.D.*) iegūšanai
Veterinārmedicīnas zinātnē

SUMMARY
*of the Doctoral thesis for acquiring a Doctoral degree in
Veterinary Medicine (Ph.D.)*

Jelgava 2022

INFORMĀCIJA

Promocijas darbs izstrādāts Saldus novada, Jaunlutriņu pagasta z/s “Ratenieki”; Latvijas Lauksaimniecības universitātes Veterinārmedicīnas fakultātes Preklīniskajā institūtā; Latvijas Lauksaimniecības universitātes Biotehnoloģiju zinātniskajā laboratorijā un Molekulārās bioloģijas un mikrobioloģijas nodaļā; Latvijas Lauksaimniecības universitātes Veterinārās klīnikas laboratorijā; Latvijas Lauksaimniecības universitātes Veterinārmedicīnas fakultātes Preklīniskā institūta Salīdzinošās patoloģijas laboratorijā un Pārtikas drošības, dzīvnieku veselības un vides zinātniskajā institūtā “BIOR” no 2016. gada līdz 2021. gadam.

Doktora studiju programma – veterinārmedicīna

Promocijas darba zinātniskā vadītāja – LLU Veterinārmedicīnas fakultātes Preklīniskā institūta profesore, *Dr.med.vet.* Aija Ilgaža

Promocijas darba zinātniskā aprobācija noslēguma posmā

- Apspriests un aprobēts LLU Veterinārmedicīnas fakultātes Preklīniskā institūta akadēmiskā personāla pārstāvju sēdē 2021. gada 9. martā.
- Apspriests un aprobēts LLU Veterinārmedicīnas fakultātes akadēmiskā personāla pārstāvju Preklīniskā institūta atvērtajā sēdē 2022. gada 11. martā.
- Atzīts par pilnīgi sagatavotu un pieņemts Promocijas padomē 2022. gada 22. aprīlī.

Oficiālie recenzenti

1. *Dr.med.vet.* **Anda Valdovska** – Latvijas Zinātnes padomes korespondētājlocekle, Latvijas Lauksaimniecības universitātes profesore.

2. *Dr.med.vet.* **Ruta Medne** – Latvijas Zinātnes padomes eksperte, vadošā pētniece Pārtikas drošības, dzīvnieku veselības un vides zinātniskajā institūtā “BIOR”, Latvijas Lauksaimniecības universitātes docente.

3. *M.D., D.M.Sci.* **Piret Hussar** – Tartu universitātes, Igaunijas Dzīvības zinātņu universitātes asociētā profesore.

Promocijas darba aizstāvēšana notiks LLU Veterinārmedicīnas zinātnes Promocijas padomes atklātā sēdē 2022. gada 9. septembrī Veterinārmedicīnas fakultātē (Helmaņa iela 8, Jelgava) A 300 auditorijā plkst. 13:00.

Ar promocijas darbu var iepazīties LLU Fundamentālajā bibliotēkā, Lielā ielā 2, Jelgavā un http://lufb.llu.lv/promoc_darbi.html

Atsauksmes sūtīt Promocijas padomes sekretārei vieslektorei *Mg.med.vet.* Annai Krūklītei – Helmaņa ielā 8, Jelgavā, LV-3001, tālr.: 63021946, e-pasts: anna.kruklite@llu.lv. Atsauksmes vēlams sūtīt ieskenētā veidā ar parakstu.

Promocijas padomes sekretāre: vieslektore *Mg.med.vet.* Anna Krūklīte

SYNOPSIS

The doctoral thesis has been elaborated at Saldus region, Jaunlutriņi parish, farm “Ratenieki”; Latvia University of Life Sciences and Technologies, Faculty of Veterinary Medicine, Preclinical Institute; Latvia University of Life Sciences and Technologies, Research Laboratory of Biotechnology, Division of Molecular Biology and Microbiology; Laboratory of the Veterinary Hospital of Latvia University of Life Sciences and Technologies; Latvia University of Life Sciences and Technologies, Faculty of Veterinary Medicine, Laboratory of Comparative Pathology of the Preclinical Institute and Institute of Food Safety Animal health and Environment “BIOR” from 2016 to 2021.

Doctoral study programme – Veterinary Medicine.

Supervisor of the Doctoral thesis – *Dr.med.vet.* Aija Ilgaža, professor of LLU Faculty of Veterinary Medicine, Preclinical Institute.

Scientific approbation of the Doctoral thesis at the final stage

- Approbated at the meeting of academic personnel of the Preclinical Institute, Faculty of Veterinary Medicine, LLU on 9 March 2021.
- Discussed and approbated at the interdepartmental meeting of academic personnel of the Faculty of Veterinary Medicine, LLU on 11 March 2022.
- Recognized as fully prepared and accepted by the LLU Doctoral Council in Veterinary Medicine on 22 April 2022.

Official reviewers:

1. *Dr.med.vet.* **Anda Valdovska** – the Corresponding member of the Latvian Academy of Sciences, professor of Latvia University of Life Sciences and Technologies.

2. *Dr.med.vet.* **Ruta Medne** – expert of Latvian Academy of Sciences, lead researcher Institute of Food Safety Animal health and Environment “BIOR”, docent at Latvia University of Life Sciences and Technologies.

3. *M.D., D.M.Sci.* **Piret Hussar** – professor associate at the University of Tartu, Estonian University of Life Sciences.

The presentation and defence of the doctoral thesis will be held at the open meeting of the LLU Doctoral Council for Veterinary Medicine at 13:00 on September 9, 2022 at the Faculty of Veterinary Medicine, 8 Helmana Street, Jelgava, auditorium No A 300.

The doctoral thesis is available for review at the Fundamental Library of Latvia University of Agriculture, 2 Liela Street, Jelgava and on the website http://llufb.llu.lv/promoc_darbi_en.html

You are welcome **to send your comments** to the secretary of Doctoral Council - lecturer, *Mg.med.vet.* Anna Krūklīte, 8 Helmana Street, Jelgava, LV-3001, Latvia, phone No +371 63021946, e-mail: anna.kruklite@llu.lv. It is advised to send your comments in scanned form and undersigned.

Secretary of the Doctoral Council: lecturer *Mg.med.vet.* Anna Krūklīte

SATURS

Informācija par publikācijām un zinātniski pētniecisko darbu	6
IEVADS	8
1. MATERIĀLS UN METODES	11
1.1. Pētījuma laiks, objekts, raksturojums.....	11
1.2. Teļu veselības stāvokļa novērtēšana	12
1.3. Teļu dzīvmasas noteikšana.....	13
1.4. Spurekļa gāzu paraugu iegūšana un metāna, oglekļa dioksīda daudzuma noteikšana	13
1.5. Spurekļa šķidrums un fekāliju paraugu iegūšana.....	14
1.6. Kopējo prokariotu, metanogēnu un atsevišķu metanogēnu sugu noteikšana spurekļa šķidrums un fekāliju paraugos.....	15
1.7. Barības piedevu izbarošanas ekonomiskā ieguvuma izvērtējums.....	16
1.8. Iekšējās vides pH noteikšana dažādās gremošanas kanāla daļās (<i>post-mortem</i>).....	17
1.9. Daudzkameru kuņģa masas noteikšana.....	18
1.10. Dažādu gremošanas kanāla daļu histoloģisko paraugu iegūšana un izmeklēšana.....	18
1.11. Imūnhistoķīmiskās krāsošanas izmantošana greļina IR šūnu skaita noteikšanai glumnieka un tievo zarnu histoloģiskajos paraugos.....	20
1.12. Datu statistiskā analīze.....	21
2. REZULTĀTI UN DISKUSIJA.....	22
2.1. Topinambūra koncentrāta un tā sinbiotikas ar raugu <i>S.cerevisiae</i> izbarošanas ietekme uz hematoloģiskajiem un bioķīmiskajiem asins rādītājiem	22
2.2. Barības piedevu ietekme uz teļu dzīvmasas izmaiņām	28
2.3. Greļina imūnreaktīvo šūnu skaits 13 – 14 nedēļu vecu teļu gremošanas kanālā atkarībā no izbarotajām barības piedevām.....	31
2.4. Iekšējās vides pH izmaiņas teļiem dažādās gremošanas kanāla daļās atkarībā no izbarotajām barības piedevām (<i>post-mortem</i>)	35
2.5. Topinambūra koncentrāta un tā sinbiotikas ar raugu izbarošanas ietekme uz gremošanas kanāla atsevišķu daļu attīstību teļiem 13 – 14 nedēļu vecumā	38
2.6. Topinambūra koncentrāta ar tā sastāvā esošo prebiotiku inulīnu un <i>S.cerevisiae</i> rauga celma 1026 izbarošanas ietekme uz metanogēnajiem mikroorganismiem un spureklī producētā CH ₄ un CO ₂ daudzumu teļiem	47
SECINĀJUMI	54
IETEIKUMI PRAKSEI.....	55

CONTENT

INTRODUCTION	56
1. MATERIAL AND METHODS.....	59
1.1. Study time, object, characteristics.....	59
1.2. Calf health assessment	60
1.3. Determination of live weight of calves	61
1.4. Sampling of rumen gases and determination of methane and carbon dioxide	61
1.5. Collection of rumen fluid and faecal samples	62
1.6. Determination of total prokaryotes, methanogens and individual methanogenic species in rumen fluid and faecal samples	63
1.7. Evaluation of the economic benefits of feed additives.....	64
1.8. Determination of the pH of the internal environment in different parts of the digestive canal (<i>post-mortem</i>).....	65
1.9. Determination of multi-chambered stomach mass	66
1.10. Obtaining and examining histological specimens of different parts of the digestive canal.....	66
1.11. Use of immunohistochemical staining to determine the number of ghrelin-IR cells in the abomasum and the small intestine histological specimens.....	68
1.12. Statistical data analysis	69
2. RESULTS AND DISCUSSION	70
2.1. Effects of feeding Jerusalem artichoke concentrate and its synbiotic with <i>S.cerevisiae</i> on haematological and biochemical blood parameters.....	70
2.2. Effects of feed additives on changes in calf live weight	76
2.3. Number of ghrelin-immunoreactive cells in the digestive tract of 13 – 14-week-old calves depending on the feed additives	78
2.4. Changes in the internal pH of calves in different parts of the digestive canal depending on the feed additives (<i>post-mortem</i>).....	80
2.5. Effect of feeding Jerusalem artichoke concentrate and its combination with the yeast on the development of certain parts of the digestive canal of calves at 13 – 14 weeks of age.....	82
2.6. Effect of feeding Jerusalem artichoke concentrate (containing prebiotic inulin) and its combination with <i>S.cerevisiae</i> strain 1026 on methanogens and the amounts of CH ₄ and CO ₂ produced in the rumen of calves	86
CONCLUSIONS	92
RECOMMENDATIONS FOR PRACTICE	93

INFORMĀCIJA PAR PUBLIKĀCIJĀM UN ZINĀTNISKI PĒTNIECISKO DARBU/ *INFORMATION ABOUT PUBLICATIONS AND SCIENTIFIC RESEARCH WORK*

Pētījuma rezultāti publicēti sešos rakstos starptautiskos un nacionālos zinātniskos un periodiskos izdevumos/ *The research results are published in six research papers in international and national scientific conference proceedings and journals*

Žurnāli/ Journals

1. **S. Jonova**, A. Ilgaza, A. Ilgazs, M. Zolovs, L. Gatina. (2022) The amount of ghrelin-immunoreactive cells in the abomasum and intestines of 13-14-week-old calves supplemented with Jerusalem artichoke flour alone or in combination with *Saccharomyces cerevisiae* yeast. *Veterinary World*, 15(4): 1080-1086. (*Q1* ranga zinātniskais žurnāls) *Indeksēts Scopus, Web of Science/ (Q1 ranked scientific journal) Indexed by Scopus, Web of Science.* www.doi.org/10.14202/vetworld.2022.1080-1086
2. **S. Jonova**, A. Ilgaza, M. Zolovs. (2021) The impact of inulin and a novel synbiotic (yeast *Saccharomyces cerevisiae* strain 1026 and inulin) on the development and functional state of the gastrointestinal canal of calves. *Veterinary Medicine International*, 2021, article ID 8848441: 1-9. (*Q1* ranga zinātniskais žurnāls) *Indeksēts Scopus, Web of Science/ (Q1 ranked scientific journal) Indexed by Scopus, Web of Science.* <https://doi.org/10.1155/2021/8848441>
3. **S. Jonova**, A. Ilgaza, M. Zolovs, A. Balins. (2020) Impact of inulin and yeast containing synbiotic on calves' productivity and greenhouse gas production. *Veterinary World*, 13(6): 1017-1024. (*Q2* ranga zinātniskais žurnāls) *Indeksēts Scopus/ (Q2 ranked scientific journal) Indexed by Scopus.* <https://doi.org/10.14202/vetworld.2020.1017-1024>
4. **S. Jonova**, A. Ilgaza, I. Grinfelde, M. Zolovs. (2018) Impact of the flour of Jerusalem artichoke on the production of methane and carbon dioxide and growth performance in calves. *Veterinary World*, 11(11): 1532-1538. (*Q2* ranga zinātniskais žurnāls) *Indeksēts Scopus/ (Q2 ranked scientific journal) Indexed by Scopus.* <https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.1532-1538>

Konferenču rakstu krājumi/ Proceedings of conferences

1. **S. Jonova**, A. Ilgaza, I. Grinfelde, M. Zolovs. (2018) Impact of inulin on production of methane, carbon dioxide and gastrointestinal canal functionality in calves. *Research for rural development 2018*, vol.1: 264-270. *Indeksēts Scopus/ Indexed by Scopus.* <https://doi.org/10.22616/rrd.24.2018.042>
2. **S. Jonova**, A. Ilgaza, I. Grinfelde. (2017) Methane mitigation possibilities and weight gain in calves fed with prebiotic inulin. *Research for rural development 2017*, vol.1: 265-270. *Indeksēts Scopus/ Indexed by Scopus.* <https://doi.org/10.22616/rrd.23.2017.039>

Par pētījumu rezultātiem autore ziņojusi 7 starptautiskās un nacionālās zinātniskās konferencēs/ *The research results are presented in 7 international and national scientific conferences*

1. **S. Jonova**, A. Ilgazs, A. Ilgaza, L. Gatina, M. Zolovs. Growth performance and production of rumen gases in calves supplemented with prebiotic inulin or a novel synbiotic (inulin and yeast). Biosystems Engineering 2021, May 5-7, 2021, Tartu, Estonia. (stenda referāts/poster)
2. **S. Jonova**, A. Ilgaza, I. Grinfelde, M. Zolovs. Impact of the flour of Jerusalem artichoke on production of methane and carbon dioxide and weight gain in calves. 26th NJF congress "Agriculture for the next 100 years", June, 27-29, 2018, Kaunas, Lithuania (stenda referāts/poster)
3. A. Ilgaza, **S. Jonova**, A. Arne, L. Gatina, A. Ilgazs. Influence of various concentrations of synbiotic feeding on the growth and development of calves during the first four months of postnatal development. Agriculture and Food, June, 20-24, 2018, Elenite, Bulgaria. (stenda referāts/poster)
4. **S. Jonova**, A. Ilgaza, I. Grinfelde, M. Zolovs. Impact of inulin on production of methane, carbon dioxide and gastrointestinal canal functionality in calves. Research for rural development, May, 16-18, 2018, Jelgava, Latvia. (mutiska prezentācija/oral presentation)
5. **S. Jonova**, A. Ārne, A. Ilgaza. Dažādu prebiotisku un sinbiotisku piedevu ietekme uz teļu veselību un dzīvmasas pieaugumu. Projekta Nr.3. LOPKOPIBA "Vietējās izcelsmes slaucamo govju un cūku saimnieciski nozīmīgo pazīmju ģenētiskā izpēte kvalitatīvu pārtikas produktu ražošanai un dabīgas izcelsmes barības sastāvdaļu izstrāde un pārbaude" noslēguma seminārs, 27. aprīlis, 2018. gads, Jelgava, Latvija. (*Effects of various prebiotic and synbiotic additives on calf health and weight gain. The project State research program AGROBIORES "Agricultural resources for sustainable production of quality and healthy food in Latvia" Project No.3 Genetic study of the economic significance of domestic dairy cows and pigs for the production of quality foodstuffs and feed materials of natural origin (Livestock farming), closing seminar, April 27, 2018, Jelgava, Latvia*) (mutiska prezentācija/oral presentation)
6. **S. Jonova**, A. Ilgaza, I. Grinfelde. Methane mitigation possibilities and weight gain in calves fed with prebiotic inulin. Research for rural development, May, 17-19, 2017, Jelgava, Latvia. (mutiska prezentācija/oral presentation)
7. A. Ilgaza, **S. Jonova**, I. Grinfelde. Impact of inulin on increase of calves' body weight and methane emission. 6th Global Veterinary Summit, November, 14-16, 2016, Atlanta, ASV. (attālināts stenda referāts/e-poster)

IEVADS

Pētījums aktualitāte. Pārejas periods no piena izbarošanas uz tilpumainās barības izbarošanu teļu dzīvē ir saistīts ar dažādām fizioloģiskām un anatomiskām izmaiņām gremošanas kanālā. Tajā notiek straujas mikrobiālas un strukturālas pārmaiņas. Šis periods dzīvniekiem rada papildus stresu un var veicināt dažādu infekcijas slimību attīstību, kas var negatīvi ietekmēt teļu augšanu un attīstību (Meale et al., 2017).

Jaundzimušo atgremotāju spurekļa mikrobiālā kolonizācija ir īpaši nozīmīga spurekļa fizioloģiskajā attīstībā (Fonty et al., 1988). Spureklī no mikroorganismiem visvairāk novēro baktērijas, kam seko vienšūņi, metanogēni un sēnes. Straujš mikrobiālās populācijas daudzveidīguma pieaugums pirms piena izbarošanas perioda beigām veicina ātrāku spurekļa funkcionālo attīstību un uzlabo produktivitāti. Spurekļa mikrobioma daudzveidība ir nepieciešama normālai spurekļa fizioloģiskai attīstībai un tilpumainās barības pārstrādei (Li et al., 2012). Mikrobiālās fermentācijas procesu rezultātā spureklī un arī resnajā zarnā veidojas dažādas gāzes, tai skaitā oglekļa dioksīds (CO₂) un metāns (CH₄) (Öztürk, 2007). Spureklī metanoģenēzes procesa rezultātā producētais CH₄ ietekmē dzīvnieku produktivitāti (GHGMP, 2005), radot enerģijas zudumus līdz pat 15% (Hegarty, 2002; Giger-Reverdin et al., 1998). Metāns tiek minēts arī kā viena no galvenajām gāzēm, kas paaugstina globālo temperatūru (Hansen et al., 2007). No lauksaimniecības nozares siltumnīcas efektu izraisīto gāzu emisijas, īpaši liellopiem, ir atraugu un zarnu gāzu veidā (Muñoz et al., 2012; Murray et al., 1999).

Spureklī un zarnās producētās gāzes un gaistošās taukskābes ietekmē vides pH. Spurekļa iekšējās vides pH un gaistošo taukskābju koncentrācija atgremotājiem ir būtiski fermentācijas aktivitātes rādītāji, kas atspoguļo spurekļa funkcijas (Feng et al., 2020), ietekmē barības uzņemšanu, mikrobiālo vielmaiņu un barības vielu noārdīšanu (Wang, 2012), kā arī ietekmē spurekļa anatomisko attīstību (Thompson et al., 2006). Teļu augšanā un attīstībā piedalās arī nozīmīgs hormons grelīns, kas ne tikai veicina augšanas hormona izdalīšanu no hipofīzes, bet arī piedalās apetītes regulēšanā (Solomis, Korbonits, 2014; Kojima et al., 1999).

Mūsdienās, strauji attīstoties piena lopkopībai, pieaug nepieciešamība pēc tādu teļu iegūšanas, kas ir veselīgāki, ar labākiem augšanas rādītājiem un augstāku produktivitāti. Nereti to vēlas panākt ar antibiotiku profilaktisku pielietošanu. Tomēr Eiropas Savienības valstīs kopš 2006. gada 1. janvāra antibiotiku lietošana dzīvniekiem slimību profilaksei un produktivitātes paaugstināšanai ir aizliegta.

Kā iespējamie alternatīvie līdzekļi ar šādām īpašībām ir prebiotikas, probiotikas un abu šo vielu kombinācija – sinbiotikas. Šo piedevu būtiskākā ietekme ir uz gremošanas kanāla mikrofloru. Tiek veicināta organismam labvēlīgo mikroorganismu augšana un vairošanās. Tas, savukārt, atstāj pozitīvu

efektu uz visu organismu: dzīvniekiem novēro labāku dzīvības pieaugumu, mazāku patogēno mikroorganismu daudzumu gremošanas kanālā (Martínez et al., 2014; Gibson, Roberfroid, 1995), tiek veicināta spurekļa un zarnu strukturālā un funkcionālā attīstība (Samal, Behura, 2015; Brewer et al., 2014; Ghosh, Mehla, 2012; Heinrichs et al., 2009; Lesmeister et al., 2004), kā arī šīs barības piedevas var samazināt metāna produkciju spureklī (Zhou et al., 2004).

Uzsākot šo pētījumu, vēlējamies noskaidrot Latvijā ražota topinambūra koncentrāta, kura sastāvā prebiotika inulīns sasniedz 48.5 – 50.1%, un tā sinbiotikas ar raugu (*Saccharomyces cerevisiae* (*S.cerevisiae*)) celmu 1026) ietekmi uz teļu veselības stāvokli, gremošanas kanāla anatomisko, histoloģisko un funkcionālo attīstību, kā arī teļu augšanu un metanoģenēzi teļu spureklī un resnajā zarnā tiem fizioloģiski nozīmīgā periodā, kļūstot par pilnvērtīgiem atgremotājiem.

Aizstāvamās tēzes

1. Topinambūra koncentrāta (inulīna saturs 48.5 – 50.1%) un tā kombinācijas ar raugu *S.cerevisiae* (celms 1026) izbarošana uzlabo teļu veselības stāvokli, veicina teļu dzīvības pieaugumu un samazina greļina imūnreaktīvo šūnu skaitu gremošanas kanālā.
2. Topinambūra koncentrāta (inulīna saturs 48.5 – 50.1%) un tā kombinācijas ar *S.cerevisiae* izbarošana veicina gremošanas kanāla morfofunkcionālo attīstību.
3. Topinambūra koncentrāta (inulīna saturs 48.5 – 50.1%) un tā kombinācijas ar *S.cerevisiae* izbarošana samazina metanoģēno mikroorganismu daudzumu teļu gremošanas kanālā, kā arī samazina CO₂ un CH₄ produkciju spureklī.
4. Rauga pievienošana topinambūra koncentrātam, izveidojot jaunu sinbiotiku, samazina CO₂ un CH₄ produkciju teļu spureklī, veicina morfofunkcionālo attīstību, uzlabo dzīvības pieaugumu un paaugstina ekonomisko ieguvumu.

Promocijas darba mērķis ir noskaidrot topinambūra koncentrāta un tā sinbiotikas ar raugu (*Saccharomyces cerevisiae* celms 1026) izbarošanas ietekmi uz teļu veselības stāvokli un augšanu, gremošanas kanāla morfofunkcionālo attīstību, kā arī metanoģenēzi spureklī un resnajā zarnā pārejas periodā no piena uz tilpumainās barības izbarošanu.

Mērķa sasniegšanai izvirzīti sekojoši uzdevumi

1. Izpētīt, kā topinambūra koncentrāta un sinbiotikas (topinambūra koncentrāts un raugs *Saccharomyces cerevisiae*) izbarošana ietekmē veselības stāvokli, dzīvības pieaugumu un ekonomisko ieguvumu, kā arī izsalkuma un sāta sajūtu teļiem no 4 līdz 14 nedēļu vecumam.

- Noskaidrot 56 dienu ilgā pētījumā iekļauto barības piedevu izbarošanas ietekmi uz dažādu gremošanas kanāla daļu (spurekļa, glumenieka, tievās un resnās zarnas) morfofunkcionālo attīstību pārejas periodā no piena uz tiļpumainās barības izbarošanu.
- Izvērtēt topinambūra koncentrāta un sinbiotikas izbarošanas ietekmi uz kopējo prokariotu, tai skaitā, metanogēno mikroorganismu daudzumu 13 – 14 nedēļu vecu teļu spureklī un resnajā zarnā.
- Noteikt pētījumā iekļauto barības piedevu izbarošanas ietekmi uz metāna (CH₄) un oglekļa dioksīda (CO₂) daudzumu spureklī 4 – 14 nedēļu veciem teļiem.

Pētījuma zinātniskā novitāte

- Iegūti oriģināli dati par sinbiotikas (12 g topinambūra koncentrāts kombinācijā ar 5 g *S.cerevisiae* rauga celmu 1026 dnn⁻¹) izbarošanas ietekmi uz 4 – 14 nedēļu vecu teļu augšanu, t.sk., gremošanas kanāla morfoloģisko un fizioloģisko attīstību.
- Iegūti oriģināli dati par greļina imūnreaktīvo šūnu skaitu divpadsmitpirkstu un tukšajā zarnā 13 – 14 nedēļu veciem teļiem, kuri saņēma standartbarību, un teļiem, kuriem papildus izbaroja 12 g topinambūra koncentrātu (inulīna saturs 6 g) dnn⁻¹.
- Iegūti oriģināli dati par greļina imūnreaktīvo šūnu skaitu dažādās gremošanas kanāla daļās (glumenieka pilorisko un fundālo dziedzeru zonā, divpadsmitpirkstu un tukšajā zarnā) teļiem 13 – 14 nedēļu vecumā, kuriem pie barības papildus izbaroja sinbiotiku, kuru veido 12 g topinambūra koncentrāts un 5 g *S.cerevisiae* rauga celms 1026 dnn⁻¹.
- Pirmo reizi Latvijā iegūti oriģināli dati par topinambūra koncentrāta (12 g dnn⁻¹; satur 6 g prebiotiku inulīnu) un tā sinbiotikas ar *S.cerevisiae* rauga celmu 1026 (5 g dnn⁻¹) izbarošanas ietekmi uz prokariotu, t.sk., metanogēno mikroorganismu un producēto CH₄, CO₂ daudzumu 4 – 14 nedēļu vecu teļu spureklī.

Personīgais ieguldījums: veicu pētījumā iekļauto dzīvnieku veselības stāvokļa novērtēšanu, nosakot sirdsdarbības frekvenci, elpošanas frekvenci, ķermeņa temperatūru, izvērtējot fekāliju konsistenci un izanalizējot iegūto asins paraugu hematoloģiskos un bioķīmiskos rādītājus, kā arī veicu dzīvnieku mērīšanu, ieguvu spurekļa šķidrums un gāzes paraugus, mērīju dažādu gremošanas kanāla daļu satura pH, noteicu daudzkameru kuņģa dažādo nodalījumu masu, ieguvu nepieciešamos paraugus gremošanas kanāla struktūru histoloģiskajai analīzei (veicu paraugu fiksāciju, piegriešanu, ievietošanu histoloģijas paraugu kasetēs), veicu histoloģisko paraugu mikroskopisko izmeklēšanu, kā arī visu iegūto rezultātu analīzi, prezentēšanu konferencēs un publicēšanu.

1. MATERIĀLS UN METODES

1.1. Pētījuma laiks, objekts, raksturojums

Promocijas darbs izstrādāts ar projekta Valsts pētījumu programmas AGROBIORES “Lauksaimniecības resursi ilgtspējīgai kvalitatīvas un veselīgas pārtikas ražošanai Latvijā” projekts Nr.3 “Vietējās izcelsmes slaucamo govju un cūku saimnieciski nozīmīgo pazīmju ģenētiskā izpēte kvalitatīvu pārtikas produktu ražošanai un dabīgas izcelsmes barības sastāvdaļu izstrāde un pārbaude (Lopkopība)” (2014 – 2018) atbalstu (VPP 2014/VPP2014-2017, apakšprojekts VPP29.3). Pētījuma metodika izvērtēta LLU Dzīvnieku labturības un aizsardzības ētikas padomes sēdē Nr.DzLĒP/2017/2-1.

Promocijas darba pētījums tika veikts Saldus novada, Jaunlūtrīņu pagasta z/s “Ratenieki” 2017./2018. gadā, laika posmā no decembra līdz februāra beigām. Pētījums ilga 56 dienas. Pētījuma norises kopējā shēma tika izveidota, vadoties pēc citu zinātnieku aprakstītās metodikas (Król, 2011; Hassan et al., 2016). Visa pētījuma laikā tika novērtēts teļu veselības stāvoklis, ko veica gan pētījumā iesaistītās personas, gan saimniecības veterinārārsts. Teļiem netika novērotas ilgstošas diarejas, respiratorās saslimšanas vai citas slimības, kas varētu ietekmēt pētījuma norisi un iegūtos rezultātus. Teļu izmeklēšana un visu paraugu iegūšana notika saimniecības veterinārārsta uzraudzībā. Pētījumā veikto izmeklējumu rezultāti tika izmantoti visa ganāmpulka, t.sk., teļu vispārējā veselības stāvokļa novērtēšanai un augšanas rādītāju uzlabošanai.

Pētījumā tika iekļauti 15 klīniski veseli, nejauši izvēlēti dažāda dzimuma Holšteinas melnraibās un Holšteinas sarkanās šķirnes krustojuma teļi (*Bos taurus*) ar vidējo vecumu 32±4 dienas (jaunākie teļi bija vismaz 28 dienas jeb 4 nedēļas veci) un vidējo dzīvmasu 72.1±11.34 kg.

Veidojot pētījuma grupas, tika izvēlēti teļi ar atbilstošu vecumu, bez būtiskām dzīvmasas atšķirībām starp atsevišķiem indivīdiem, ar labu veselības stāvokli, kas tika novērtēts pēc veiktās klīniskās izmeklēšanas. Katrā teļu grupā tika iekļauti 2 vīrišķās kārtas un 3 sievišķās kārtas teļi.

Katras nokomplektētās pētījuma grupas teļi tika turēti kopā vienā teļu turēšanai atbilstoši aprīkotā telpā. Telpu izmēri: garums 5.3 m, platums 4.5 m, augstums 2.6 m, loga lielums: 1.2 × 1.2 m, durvju lielums: 1.95 × 1.0 m. Telpa bija pietiekami liela, lai dzīvnieki varētu apgulties, kā arī brīvi pārvietoties un savstarpēji saskarties. Grīda bija no betona, kas nosepta ar nelielu daudzumu salmiem. Novietnē bija 2 barošanas galdi, viens sienam un otrs piena aizvietotājam, prestarterim un miežu miltiem un viena ūdens dzirdne.

Pēc piedzimšanas, 2 h laikā, visi teļi saņēma pirmpienu, nākamās 5 dienas teļi saņēma pilnpienu (3.5 L 2 × dienā) un vēlāk piena aizvietotāju ražotāja rekomendētajā teļu vecumam un dzīvmasai atbilstošā devā. 4 – 6 nedēļu vecumā teļi saņēma 5 L piena aizvietotāja dienā un prestartera barību (aptuveni 0.5 kg uz

teļu dienā). Pēc 8 nedēļu vecuma, teļi saņēma aptuveni 1.5 kg miežu miltu un 6 L piena aizvietotāja dienā. Teļiem visu laiku bija brīvi pieejams ūdens un siens.

Kopā tika izveidotas trīs pētījuma grupas. Pieci teļi bija kontroles grupā (CoG) un saņēma standartbarību. Katram no 5 teļiem prebiotikas grupā (PreG) papildus izbaroja 12 g topinambūra (*Helianthus tuberosus*) koncentrātu dienā, kas satur 6 g prebiotiku inulīnu. 5 teļi no sinbiotikas grupas (SynG) katrs dienā papildus saņēma eksperimentālu sinbiotiku, kas sastāvēja no 2 dažādiem produktiem: 12 g topinambūra koncentrāta, kas satur 6 g prebiotiku inulīnu un 5 g probiotiku *S.cerevisiae* rauga kultūru *Yea-Sacc*[®] 1026 (*Alltech Inc.*, Francija), kas satur vismaz 1×10^9 koloniju veidojošās vienības (KVV) g^{-1} *S.cerevisiae* rauga celmu 1026. Pētījumā izmantotā rauga barības piedeva ir reģistrēta lietošanai Eiropas Savienības valstīs (Komisijas īstenošanas regula Nr. 1109/2014). Savukārt pētījumā izmantotā sinbiotika nav komerciāli pieejama un tika sakombinēta tieši šim pētījumam. Topinambūra koncentrāts un sinbiotika tika pievienota pie spēkbarības $1 \times$ dienā, no rītiem.

Pētījumā teļiem izbarotā topinambūra koncentrāta deva tika izvēlēta, vadoties no cita ar tāda paša sastāva topinambūru koncentrāta veikta pētījuma metodikā norādītās devas (Arne, Ilgaza, 2016), kā arī 6 g inulīns tika izmantots Król (2011) pētījumā. Jāpiemin, ka topinambūrs satur tikai aptuveni 10% inulīna, bet, izmantojot speciālas tehnoloģijas, inulīna saturu var palielināt līdz pat 48.5 – 50.1% no sausnes (Fleming, Groot, 1979). Topinambūra koncentrāts ražots SIA “Herbe” pēc Latvijas Universitātes Mikrobioloģijas un Biotehnoloģiju institūta izstrādātās tehnoloģijas. Savukārt probiotikas *S.cerevisiae* celma 1026 deva tika izvēlēta balstoties uz 2016. gadā publicētu pētījuma metodiku (Hassan et al., 2016).

1.2. Teļu veselības stāvokļa novērtēšana

Pētījuma 1., 28. un 56. dienā teļiem tika noteikta **sirdsdarbības frekvence** ($x \text{ min}^{-1} \pm \text{SD}$), **elpošanas frekvence** ($x \text{ min}^{-1} \pm \text{SD}$) un **ķermeņa temperatūra** ($^{\circ}\text{C} \pm \text{SD}$). Sirdsdarbības frekvence noteikta veicot sirds auskultāciju krūškurvja kreisajā pusē, 4. ribstarpā, 2-3 cm virs elkoņa līmeņa. Elpošanas frekvence noteikta, veicot auskultāciju krūšu sienas vidusdaļā labajā vai kreisajā pusē. Sirds un plaušu auskultācija veikta ar *Littmann Cardiology IV* (3M, ASV) stetoskopu. Ķermeņa temperatūra tika noteikta, to mērot rektāli ar elektronisko termometru *DIGI-VET* (Kruuse, Dānija).

Iepriekš minētajās pētījuma dienās tika novērtēta teļu **fekāliju konsistence**, izmantojot ballu skalu no 0 līdz 3, kurā ar 0 ballēm novērtē stingras, sugai raksturīgas konsistences fekālijas, ar 1 balli tiek apzīmētas mīkstas fekālijas, ar 2 ballēm – šķidrās fekālijas, bet ar 3 ballēm tiek apzīmētas udeņainas fekālijas (Larson et al., 1977). Šajās pētījuma dienās fekāliju konsistenci novērtēja trīs veterinārārsti. Arī pārējās pētījuma dienās saimniecības darbinieki sekoja līdzī

fekāliju konsistencei, lai teļiem varētu noteikt diareju. Jāpiemin, ka diarejas epizodes netika konstatētas.

Kā arī pētījuma 1., 28. un 56. dienā teļiem tika noņemti asins paraugi, veicot punkciju jugulārajā vēnā (*vena jugularis*), izmantojot vakutainera adatas 20 G (30 mm garums) un vakutainera adatu turētāju. **Hematoloģisko** analīžu veikšanai asinis noņemtas *S-Monovette EDTA 2.7 mL (SARSTEDT AG&Co. KG, Vācija)* vakutainera stobriņos. Iegūtajos asins paraugos tika noteikts kopējais leukocītu skaits (WBC, 10^9 L^{-1}), eritrocītu skaits (RBC, 10^{12} L^{-1}), hematokrīts (HCT, %), hemoglobīna daudzums eritrocītos (HGB, g dL^{-1}) un trombocītu skaits (PLT, 10^9 L^{-1}). Asins paraugu analīze veikta, izmantojot *Exigo EOS (Boule Medical AB, Zviedrija)* automatisko veterināro asins hematoloģijas analizatoru. **Asinis bioķīmisko** rādītāju noteikšanai iegūtas, izmantojot *S-Monovette* seruma vakutainerus 2.7 mL ar asins recēšanas aktivatoru (*SARSTEDT AG&Co. KG, Vācija*). Tika noteikta gamma glutamiltransferāze (GGT, U L^{-1}), aspartātaminotransferāze (ASAT, U L^{-1}), urīnviela (UREA, mmol L^{-1}), kreatinīns (CREA, mmol L^{-1}), kopējais proteīns (TP, g L^{-1}), albumīns, g L^{-1} , globulīni, g L^{-1} un glikoze mmol L^{-1} . Asins paraugu analīze veikta izmantojot *Mindray BS-200E (Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co., Ltd., Ķīna)* asins bioķīmijas analizatoru. Glikoze asinīs tika noteikta nekavējoties pēc asins parauga iegūšanas izmantojot glikozimetru *ACCU-CHEK instant (Roche, Vācija)*. Asins paraugu izmeklēšana veikta Latvijas Lauksaimniecības universitātes Veterinārās klīnikas laboratorijā.

1.3. Teļu dzīvmasas noteikšana

Pētījuma 1., 28. un 56. dienā tika noteikta teļu dzīvmasa ar citu zinātnieku atzītu netiešās dzīvmasas noteikšanas metodi (Heinrichs, Hargrove, 1987), izmantojot speciālu mērlenti *Animeter (Albert Kerbl GmbH, Vācija)*. Dzīvmasu var noteikt, izmērot krūšu apkārtmēru tieši aiz elkoņiem un nolaset rezultātu uz mērlentes esošās kg skalas. Šī metode, kas balstīta uz liellopu standarta augšanas līknēm, ir plaši pielietota dzīvmasas noteikšanai saimniecībās (Heinrichs, Hargrove, 1987).

1.4. Spurekļa gāzu paraugu iegūšana un metāna, oglekļa dioksīda daudzuma noteikšana

Pētījuma 1., 28. un 56. dienā no rīta, 2 h pēc teļu barošanas, tika noteikts metāna (CH_4) un oglekļa dioksīda (CO_2) daudzums spureklī. Lai iegūtu teļu spurekļa gāzu paraugus ar rumenocentēzes metodi, teļš tika fiksēts stāvus pozīcijā, piespiežot teļa labo sānu pie sienas, vai labajā laterālajā guļā.

Kreisajos sānos aiz ribu loka zem jostas skriemeļu sānu izaugumiem tika sagatavots rumenocentēzes laukums, izcērpot apmatojumu un dezinficējot ādu ar 70% spirta šķīdumu. Adata (14 G, ārējais diametrs 2.1 mm, garums 60 mm) tika ievadīta vēdera dobumā 45° leņķī pret vēdera sienu orientējoši virzienā uz labās priekšējās elkoņa locītavu, apmēram 4 – 6 cm dziļumā. Spurekļa gāzes tika iegūtas ar 20 mL tilpuma vienreiz lietojamu šļirci. Pēc parauga iegūšanas, nekavējoties adatas gals tika aiztaisīts ar elastīgu, gaisa necaurlaidīgu, inertu materiālu (līdzīgu silikonam), lai novērstu gāzu izplūšanu no šļircēs. Pēc punkcijas veikšanas, dūruma vieta tika dezinficēta ar 70% spirta šķīdumu (Atkinson, 2017).

Spurekļa gāzes (CH₄ un CO₂) tika mērītas, izmantojot mobilo gāzu spektrofotometru *Picarro G2508* (*Picarro*, ASV). Iekārtas tehniskie parametri ir sīkāk aprakstīti ražotāja tehniskajā dokumentācijā (*Picarro G2508 Analyzer Datasheet*) un izmantošanas iespējas aprakstītas Fleck et al. (2013) pētījumā. Gāzu analīzi veicām saimniecībā sadarbībā ar Latvijas Lauksaimniecības universitātes Meža un Ūdens resursu zinātniskās laboratorijas zinātniekiem uzreiz pēc parauga iegūšanas.

Gāzu mērījumi tika veikti, izmantojot necaurspīdīgu kameru, kuras tilpums bija 1 L. Kamera ar mērīšanas iekārtu un ārēju nulles noplūdes vakuumsūkni tika savienota slēgtā cirkulācijas sistēmā, izmantojot 9 metrus garu teflona cauruli (iekšējais diametrs 1/16 collas, ārējais diametrs 1/8 collas). Mērījumi tika veikti 180 sekundes ar vienas sekundes vidējo intervālu, un tika analizēts 10 mL liels spurekļa gāzu daudzums (Grinfelde et al., 2018).

1.5. Spurekļa šķidruma un fekāliju paraugu iegūšana

Pētījuma 56. dienā no rīta, 2 h pēc teļu barošanas, tika noņemti arī teļu spurekļa šķidruma paraugi. Ja nelielās spurekļa pildījuma pakāpes dēļ spurekļa šķidrumu nebija iespējams iegūt pēc 1.4. apakšnodaļā aprakstītās metodikas, tad tika mainīts injekcijas adatas virziens (ventrāli) un vienlaicīgi ar dūri tika radīts pretspiediens uz labās vēdera sienas. Spurekļa šķidruma iegūšanai netika veikts papildus dūriens spureklī, bet, pēc spurekļa gāzu parauga iegūšanas, tika nomainīta tikai šļirce. Spurekļa šķidrums tika iegūts ar 20 mL tilpuma vienreiz lietojamu šļirci, vadoties pēc Atkinson (2017) metodes.

Pēc parauga iegūšanas, spurekļa šķidrums tika iepildīts stikla stobriņos. Uz spurekļa šķidruma parauga tika uzpilināti 5 pilieni minerāleļļas un stobriņš tika cieši noslēgts ar gumijas aizbāzni, lai nodrošinātu maksimāli anaerobu vidi. Pēc punkcijas veikšanas, dūruma vieta tika atkārtoti dezinficēta ar 70% spirta šķīdumu. Pēc nogādāšanas laboratorijā (3 h laikā), spurekļa šķidruma paraugi tika sasaldēti -80 °C.

Pētījuma 56. dienā, no taisnās zarnas manuāli tika paņemti fekāliju paraugi un ievietoti tam domātos polietilēna maisiņos. Pēc nogādāšanas laboratorijā,

fekāliju paraugi tika sasaldēti -80 °C līdz tālākai mikrobioloģiskajai izmeklēšanai.

1.6. Kopējo prokariotu, metanogēnu un atsevišķu metanogēnu sugu noteikšana spurekļa šķidruma un fekāliju paraugos

Individuālajos spurekļa šķidruma paraugos (n=15), kā arī katras grupas (n=3) visu piecu teļu fekāliju kopparaugā tika noteikta kopējo metanogēnu, atsevišķu metanogēnu sugu (*Methanosphaera stadtmanae*, *Methanobrevibacter ruminantium*, *Methanobrevibacter smithii*) un kopējo prokariotu sastopamība. Attiecīgo metanogēnu noteikšana paraugos izvēlēta balstoties uz citu autoru pētījuma rezultātiem, kuri šos metanogēnus identificējuši kā dominējošos spureklī (Nicholson et al., 2007; Wright et al., 2007; Whitford et al., 2001).

DNS no teļu spurekļa satura un fekālijām izdalīts izmantojot *QIAamp® DNA Stool Mini Kit* (*Qiagen Ltd.*, Lielbritānija). Tā iegūšanai izmantoti 200 mg sasaldēta parauga un izmeklējums veikts sekojot ražotāja klāt pievienotajām instrukcijām (*QIAamp Fast DNA Stool Mini Handbook*) (Yu, Morrison, 2004).

DNS daudzums un tīrība pārbaudīta, izmantojot *NanoDrop-1000* (*Thermo Fisher Scientific Inc.*, ASV) spektrofotometru (McCartney et al., 2013). Iegūtie DNS paraugi uzglabāti -20°C līdz to tālākai analīzei.

Metanogēni un prokarioti noteikti, izmantojot specifiskus praimeru komplektus. Metanogēnu un kopējo prokariotu praimeru sekvenses bija sekojošas:

- 1) kopējie metanogēni (rrs): Met630F: 5'-GGATTAGATACCCSGGTAGT-3'; Met803R: 5'-GTTGARTCCAATTAACCGCA-3'
- 2) kopējie prokarioti (rrs, references gēns): V3-F: 5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3'; V3-R: 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'
- 3) *Methanosphaera stadtmanae* (rrs): Stad-F: 5'-CTTA ACTATAAGAATTGCTGG-3'; Stad-R: 5'-TTCGTTACTCACCGTCAAGAT-3'
- 4) *Methanobrevibacter ruminantium* (rrs): Rum16S 740F: 5'-TCCCAGGGTAGAGGTGAAA-3'; Rum16S 862R: 5'-CGTCAGAATCGTTCCAGTCA-3'; Rum16S FAM: 5'-CCGTCAGTTTCGTTCCAGTTAG-3'
- 5) *Methanobrevibacter smithii* (rrs): Smit.16S-740F: 5'-CCGGGTATCTAATCCGGTTC-3'; Smit.16S862R: 5'-TCCCAGGGTAGAGGTGAAA-3'; Smit.16S FAM: 5'-CGTCAGAATCGTTCCAGTCA-3'

Polimerāzes ķēdes reakcijas veiktas, izmantojot *QuantiNova™ Probe PCR Kit* (*Qiagen Ltd.*, Lielbritānija) un *QuantiNova™ SYBR® Green PCR Kit* (*Qiagen Ltd.*, Lielbritānija) reaģentu komplektus, un sekojot ražotāja instrukcijām (*QuantiNova Probe PCR Handbook*; *QuantiNova™ SYBR® Green*

PCR Handbook). DNS amplifikācija veikta reālā laika PCR iekārtā *RotorGene Q* (*Qiagen, Ltd.*, Lielbritānija), ar sākotnējo denaturāciju pie 95°C 2 min, kam sekoja 40 denaturācijas cikli (95°C 5 s) un praimeru hibridizācija 60°C 10 s (kopējiem metanogēniem (*rrs*, *mcrA*), kopējiem prokariotiem un *M.stadtmanae*) un 60°C 5 s (*M.ruminantium* un *M.smithii*) (McCartney et al., 2013).

Metanogēnu un kopējo prokariotu līmenis tika novērtēts kā C_t vērtība (cikls, pie kura PCR amplifikācija ir sasniegusi eksponenciālo fāzi). Jo C_t vērtība bija mazāka, jo lielāks daudzums meklētās sekvences bija paraugā. Pēc tā arī var secināt, cik lielā daudzumā izmeklētajā paraugā bija kopējie metanogēni, prokarioti vai konkrētie metanogēni. Izmeklējumi veikti Latvijas Lauksaimniecības universitātes Biotehnoloģiju zinātniskajā laboratorijā, Molekulārās bioloģijas un mikrobioloģijas nodaļā.

1.7. Barības piedevu izbarošanas ekonomiskā ieguvuma izvērtējums

Tika veikts pētījumā iekļauto barības piedevu (topinambūra koncentrāta un tā kombinācijas ar raugu *S.cerevisiae* celmu 1026) ekonomiskā ieguvuma izvērtējums pēc to 56 dienu ilgās izbarošanas teļiem, balstoties uz Dar un kolēģu (2017) līdzīgā pētījumā aprakstītajām aprēķinu metodēm. Noteicām sekojošus rādītājus.

1. Vienam teļam izbarotās barības piedevas daudzums visā pētījuma laikā (2.1. formula)

$$a \times b = c, \quad (2.1.)$$

kur a – vienam teļam izbarotās barības piedevas daudzums dienā (g),

b – izbarošanas dienu skaits,

c – vienam teļam izbarotās barības piedevas daudzums visā pētījuma laikā (g)

2. Vienam teļam izbarotās barības piedevas izmaksas visā pētījuma laikā (2.2. formula)

$$e \times b = g, \quad (2.2.)$$

kur e – vienam teļam izbarotās barības piedevas izmaksas dienā (EUR),

b – izbarošanas dienu skaits,

g – vienam teļam izbarotās barības piedevas izmaksas pētījuma laikā (EUR)

3. Izbarotās barības piedevas izmaksas uz vienu dzīvmasas kg (2.3. formula)

$$\frac{g}{f} = d, \quad (2.3.)$$

kur g – vienam teļam izbarotās barības piedevas izmaksas pētījuma laikā (EUR),

f – teļu vidējā dzīvmasa pēc 56 dienu ilgas attiecīgās barības piedevas izbarošanas (kg),

d – barības piedevas izmaksas uz vienu dzīvmasas kg (1 kg EUR⁻¹)

4. Prognozējamais ienākums, vairumtirgotājiem pārdodot 1 teļu (2.4. formula)

$$j \times f = i, \quad (2.4.)$$

kur j – vairumtirgotāju noteiktā vidējā iepirkuma cena par vienu attiecīgā vecuma teļa dzīvmasas kg (EUR) (*informācija iegūta 2021.gada septembrī*),

f – teļu vidējā dzīvmasa pēc 56 dienu ilgas attiecīgās barības piedevas izbarošanas (kg),

i – prognozējamais ienākums, pārdodot 1 teļu (EUR)

5. Ekonomiskais ieguvums, pārdodot vienu teļu un ņemot vērā izbarotās attiecīgās barības piedevas izmaksas (2.5. formula)

$$i - g = x, \quad (2.5.)$$

kur i – prognozējamais ienākums, pārdodot 1 teļu (EUR),

g – vienam teļam izbarotās barības piedevas izmaksas pētījuma laikā (EUR),

x – ekonomiskais ieguvums, pārdodot vienu teļu un ņemot vērā izbarotās attiecīgās barības piedevas izmaksas (EUR).

1.8. Iekšējās vides pH noteikšana dažādās gremošanas kanāla daļās (*post-mortem*)

Pēc dzīvnieku nokaušanas saimnieciskā nolūkā pētījuma 56. dienā (teļu vecums 88±4 dienas jeb vismaz 12 nedēļas veci), dažādās gremošanas kanāla daļās tika noteikts iekšējās vides skābju-sārnu līdzsvars (pH):

- 1) mutes dobumā zem mēles saknes,
- 2) spurekļa priekštelpas apvidū (*atrium ruminis*),
- 3) spureklī ventrālajā maisā (*rumen saccus ventralis*),
- 4) glumeniekā pie piloriskā sfinktera (*abomasum pars pylorica*),

- 5) glumenieka (*abomasum*) vidusdaļā,
- 6) tukšās zarnas vidusdaļā (*jejunum*),
- 7) lokzarnas vidusdaļā (*colon*)

Iekšējās vides pH noteikšanai tika izmantots pārnēsājams pH metrs *ProfiLine pH 3110*, (*Xylem Inc.*, Vācija). Diapazons: pH -2.000...+19.999 (± 0.005 pH). Izmantotā pH metra kalibrēšana tika veikta ar rūpnieciski ražotiem standartšķīdumiem (pH 4.01 un pH 7.00) (*Xylem Inc.*, Vācija) 20 °C temperatūrā.

1.9. Daudzkameru kuņģa masas noteikšana

Tika noteiktas atsevišķu kuņģa daļu masas (kopējā tukša kuņģa masa, glumenieka masa, priekškuņģu masa), izmantojot digitālos rokas svarus (*Rapala, Ķīna*), kļūda ± 10 g.

Kā arī tika aprēķināta kopējā kuņģa, priekškuņģu un glumenieka relatīvā masa attiecībā pret dzīvmasu (2.6. formula) un aprēķināta glumenieka un priekškuņģu masas procentuālā attiecība pret kopējo kuņģa masu (2.7. formula).

$$\frac{A}{B} \times 100 = C\%, \quad (2.6.)$$

kur A – kopējā kuņģa, glumenieka vai priekškuņģu masa (kg),

B – teļu dzīvmasa (kg),

C – attiecīgās kuņģa daļas relatīvā masa (%) (Jonova et al., 2021)

$$\frac{D}{E} \times 100 = F\%, \quad (2.7.)$$

kur D – glumenieka vai priekškuņģu masa (kg),

E – kopējā kuņģa masa (kg),

F – attiecīgās kuņģa daļas procentuālā attiecība pret kopējo kuņģa masu (Górka et al., 2011)

1.10. Dažādu gremošanas kanāla daļu histoloģisko paraugu iegūšana un izmeklēšana

Audu paraugi histoloģiskiem izmeklējumiem tika iegūti no spurekļa dorsālā maīsa (*rumen saccus dorsalis*) un ventrālā maīsa (*rumen saccus ventralis*), glumenieka (*abomasum*) kardiālo (*pars cardiaca*), fundālo (*pars fundalis*) un pilorisko dziedzeru zonas (*pars pylorica*), divpadsmitpirkstu zarnas (*duodenum*), tukšās zarnas (*jejunum*) vidusdaļas, kā arī tukšās zarnas beigu daļas un gūžas zarnas (*ileum*) vidusdaļas un lokzarnas (*colon*) vidusdaļas.

Ar grieznēm tika iegūts 4×4 cm liels audu paraugs, to noskaloja ar 0.9% NaCl šķīdumu, lai atbrīvotos no kuņģa un zarnu satura. Tad, turot ar pinceti, paraugus skaloja 10% formalīna šķīdumā, lai nofiksētos gļotāda un formalīns vienmērīgi iekļūtu visos ņemto zarnu paraugu lūmenos, un tad paraugi tika ievietoti cieši noslēdzamos plastmasas traukos ar 10% buferēto neitrālo formalīnu (audu un formalīna attiecība 1:10). Paraugus 2 dienas uzglabāja istabas temperatūrā un tad tika veikta audu piegriešana un ievietošana histoloģijas paraugu kasetēs. Audu histoloģisko paraugu dehidratācijai, sagatavošanai un ieslēgšanai parafīna blokos izmantoja audu procesoru *Leica ASP200 S* (*Leica Biosystems Nussloch GmbH*, Vācija) pēc standartizētas audu histoloģiskās sagatavošanas metodes (Kiernan, 2008; Carson, 1997).

Kopumā nofiksēti un parafīna blokos tika ieslēgti 90 dažādu gremošanas kanāla daļu paraugi. Pēc paraugu ieslēgšanas parafīna blokos, preparāti ar mikrotomu tika griezti 5 μm plānos griezumos un tika uznesti uz priekšmetstikliņiem. Sagatavotos priekšmetstikliņus ievietoja termostatā 60 °C uz 30 min – žāvēšanai un nostiprināšanai uz priekšmetstikliņa.

Audu paraugu histoloģiskai krāsošanai izmantota **hematoksilīna-eozīna krāsošanas metode** (H&E) (Carson, 1997). Lai veiktu paraugu atbrīvošanu no parafīna (deparafinizācija), paraugus 2 reizes pa 5 min noturēja ksilolā. Parauga rehidratācijai tika izmantota spirta koncentrācijas samazināšanas rinda (99%, 96%, 70%, un 50% koncentrācijās). Katrā koncentrācijā paraugi tika turēti 2 min. Tad veica audu iekrāsošanu ar hematoksilīnu. Priekšmetstikliņus krāsā atstāja uz 3 min un tad noskaloja ar destilētu ūdeni un veica krāsošanu ar eozīnu 3 – 5 min. Pēc krāsošanas tika veikta paraugu dehidratācija, izmantojot pieaugošu spirta koncentrācijas rindu (70%, 96% un 99% koncentrācijās) (katrā koncentrācijā 1 min) un paraugu dzidrināšana, ievietojot ksilolā (2 reizes pa 5 min). Paraugus pēc dehidratācijas un dzidrināšanas nosedza ar ksilolā šķīstošu histoloģisko līmi un segstikliņiem.

Spurekļa dorsālā maisa (*rumen saccus dorsalis*) un spurekļa ventrālā maisa (*rumen saccus ventralis*) histoloģiskajos paraugos tika mērīts kārpiņu garums, platums (μm), visa epitēlija un epitēlija pārragotās kārtas (*stratum corneum*) biezums (μm).

Kārpiņas garums tika mērīts no kārpiņas epitēlija apikālā gala līdz gļotādas muskuļu plātnītei. Ja kārpiņa bija izliektas formas, tad tās garuma mērīšanai tika lietotas lauztas līnijas. Kārpiņas platums tika mērīts tās vidusdaļā līdz epitēlija šūnu apikālajiem galiem perpendikulāri kārpiņu garumam. Katrā paraugā mērījumi tika veikti 5 dažādos redzeslaukos visām tur esošajām kārpiņām.

Katrā paraugā spurekļa kārpiņu visa epitēlija un epitēlija pārragotās kārtas (*stratum corneum*) biezums (μm) tika mērīts 5 dažādos redzeslaukos un katrā redzeslaukā tika veikti 3 mērījumi.

Glumenieka kardiālo (*pars cardiaca*), fundālo (*pars fundalis*) un pilorisko dziedzeru (*pars pylorica*) zonā tika mērīts gļotādas biezums (μm) 5 redzeslaukos, katrā 3 mērījumi.

Divpadsmitpirkstu zarnas (*duodenum*), tukšās zarnas (*jejunum*) vidusdaļā, kā arī tukšās zarnas beigu daļā un gūžas zarnas (*ileum*) vidusdaļā tika mērīts gļotādas biežums (bārkstiņas garums un kriptas dziļums), kā arī visas zarnu sienas biežums (μm). Katrā paraugā tika veikti 3 – 5 mērījumi, 5 redzeslaukos.

Lokzarnas (*colon*) vidusdaļā tika mērīts kriptu dziļums no kriptu epitēlija apikālā gala līdz gļotādas muskuļu plātnītei (*lamina muscularis mucosae*) un visas zarnas sienas biežums (μm). Katrā paraugā tika veikti 3 – 5 mērījumi, 5 redzeslaukos.

Kopumā izvērtēti 200 histoloģisko preparātu griezumī no dažādām gremošanas kanāla daļām. Visi mērījumi veikti, izmantojot gaismas mikroskopiju ar multifunkcionālu mikroskopu *Leica DM 750* (*Leica Microsystems*, Vācija). Iegūto histoloģisko izmeklējumu fotografēšana, apstrāde un mērīšana tika veikta, izmantojot kameru *Leica ICC50 HD* (*Leica Microsystems*, Vācija) un programmatūru *Leica Application Suite* (*Leica Microsystems*, Vācija). Izmeklējumi veikti Latvijas Lauksaimniecības universitātes, Veterinārmedicīnas fakultātes, Preklīniskā institūta Salīdzinošās patoloģijas laboratorijā.

1.11. Imūnhistoķīmiskās krāsošanas izmantošana greļina IR šūnu skaita noteikšanai glumenieka un tievo zarnu histoloģiskajos paraugos

Grelīna imūnreaktīvo šūnu noteikšanai tika izmantota audu imūnhistoķīmiskās krāsošanas metode. Grelīna imūnreaktīvo šūnu skaits noteikts glumenieka un tievās zarnas audu griezumos. Imūnreaktīvo šūnu iezīmēšana veikta izmantojot streptavidīna – biotīna kompleksu (*Dako REAL™ EnVision™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse, Agilent Technologies*, ASV). Izmeklētie audu paraugi uznesti uz priekšmetstikliņiem ar silāna pārklājumu (*HistoBond®+, Paul Marienfeld GmbH & Co. KG*, Vācija), tad tie tika žāvēti 12 stundas 37 °C termostatā. Pēc tam tika veikta paraugu deparafinizācija ar ksilolu un rehidratācija ar etanola koncentrācijas samazināšanas rindu. Pēc paraugu rehidratācijas, tie tika ievietoti 65 °C buferšķīdumā ar pH 9.0 (*Target Retrieval solution, pH 9, Dako, Agilent Technologies*, ASV) un apstrādāti 2 reizes ar pārtraukumu līdz 70 °C, ar mikroviļņiem 450W 5 min epitopu atbrīvošanai, lai antigēns tiktu piesaistīts pie antivielas. Tad paraugi tika atdzesēti līdz 22 °C (istabas temperatūra) un amplicēti 5 min ar endogēnās peroksidāzes bloķēšanas reaģentu (*Dako Endogenous enzyme block, Agilent Technologies*, ASV), lai bloķētu endogēno peroksidāzi. Kā primārās antivielas tika izmantotas žurku un peļu poliklonālās antivielas (*H-031-31, Phoenix Pharma. Inc.*, ASV) ar atšķaidījumu 1:500. Imūnreaktīvo šūnu un primārās antivielas reakciju konstatēšanai, antigēna un antivielas komplekss tika iezīmēts tam aplicējot 30 min sekundāro antivielu un

vēlāk tas iekrāsots 5 min aplicējot DAB+ kompleksu (*Dako REAL™ EnVision™ Detection System, Agilent Technologies, ASV*). Kontrasta radīšanai paraugā un, lai izvairītos no artefaktiem, audus iekrāsoja ar hematoksilīnu. Nokrāsoto paraugu inkubācija tika veikta mitrā kamerā istabas temperatūrā un paraugi tika skaloti ar fosfāta buferšķīdumu (*Wash Buffer, pH 7.4, Dako, Agilent Technologies, ASV*).

Pozitīvajai kontrolei greļīna antivielai tika izmantoti suņu kuņģa piloriskās daļas histoloģiskie griezumī. Kā negatīvā kontrole tika lietoti tie paši paraugi, tikai tiem primārās antivielas vietā aplicēts antivielu atšķaidītājs (tajos netika konstatēta imūnreakcija pret greļīnu).

Imūnreaktīvo šūnu kvantitatīvais sastāvs tika vērtēts katrā paraugā 10 redzes laukos, nosakot gļotādas laukumu 1 mm^2 pozitīvo šūnu skaitu tajā.

Paraugi tika izmeklēti 400x palielinājumā ar EVOS M5000 (*Invitrogen™, ASV*) mikroskopu. Izmeklējumi veikti Latvijas Lauksaimniecības universitātes, Veterinārmedicīnas fakultātes, Preklīniskā institūta Salīdzinošās patoloģijas laboratorijā.

1.12. Datu statistiskā analīze

Pētījuma datu sadalījums noteikts, izmantojot Šapiro – Vilka testu, kā arī vizuāli novērtējot *box-plot*, histogrammas un normālus Q-Q *plot* grafikus. Dispersiju viendabīguma pieņēmums pārbaudīts ar Levene testu. Lai noteiktu, vai starp trim un/vai vairākām neatkarīgām grupām pastāv statistiski nozīmīgas atšķirības, veica vienvirziena ANOVA ar Tukeja *post hoc* testu (ja dati bija normāli sadalīti, homogēni un nesaturēja izlēcienus) (*sirds darbības frekvences, elpošanas frekvences, temperatūras, hematoloģisko, asins bioķīmisko rādītāju, teļu dzīvības izmaiņu, metanogēno mikroorganismu daudzuma, gremošanas kanāla pH un daudzkameru kuņģa nodalījumu masas analīze*). Pretējā gadījumā veica Kruskala – Valisa H testu, pielietojot Dunn (1964) procedūru ar Bonferroni korekciju (*fekāliju konsistences, metāna un oglekļa dioksīda koncentrācijas, gremošanas kanāla histoloģisko paraugu parametru analīze un greļīna imūnreaktīvo šūnu skaita analīze*). *Post hoc* salīdzināšanu veic, kad jāsalīdzina trīs un vairāk grupas savā starpā. Lai to izdarītu izmanto speciālus indeksus, kuri veic korekcijas attiecībā uz p-vērtību. Indeksu izvēle ir atkarīga no grupu skaita, datu sadalījuma, pētījuma dizaina sabalansētības un datu dispersijas. Piemēram, nelielam grupu skaitam (līdz 5 pāriem) ar vienādu dispersiju un normālo datu sadalījumu izmanto Tukeja testu, savukārt Bonferroni korekciju izmanto, kad ir liels grupu skaits vai arī dati nav normāli sadalīti. Lai noteiktu, vai starp divām grupām pastāv statistiski nozīmīga atšķirība, tika izmantots Manna – Vītņija U tests, neatkarīgu izlašu T – tests vai Velča tests. Lineārais attiecības ciešums un virziens starp diviem mainīgajiem lielumiem novērtēts, izmantojot Spīrmena rangū vai Pīrsona korelācijas testu.

Datu analīzei izmantota statistiskās apstrādes programma *SPSS Statistics* 22. versija (*IBM Corporation*, Čikāga, Ilinoisa). Visas statistiskās analīzes tika veiktas pie nozīmības līmeņa $\alpha=0.05$, un dati parādīti kā vidējais aritmētiskais \pm standartnovirze, ja dati piederēja intervālu vai attiecību mērījumu skalai, bija normāli sadalīti un nesaturēja būtiskus izlēcienus vai mediāna un starpkvartīļu intervāls, ja dati piederēja rangu skalai, nebija normāli sadalīti un/vai saturēja būtiskus izlēcienus. Diagrammu veidošanai izmantota programma *Microsoft Excel 2016* (*Microsoft Corporation*, ASV).

2. REZULTĀTI UN DISKUSIJA

2.1. Topinambūra koncentrāta un tā sinbiotikas ar raugu *S.cerevisiae* izbarošanas ietekme uz hematoloģiskajiem un bioķīmiskajiem asins rādītājiem

Asins analīzes spēj sniegt būtisku informāciju par atsevišķu teļu un visa ganāmpulka veselību. Tomēr jāatceras, ka teļi, īpaši jaundzimuši, un arī teļi pārejas periodā no piena izbarošanas uz tilpumainās barības izbarošanu, nav pilnībā pielīdzināmi pieaugušām govīm, jo vēl netiek uzskatīti par pilnvērtīgiem atgremotājiem. Atšķirības ir novērojamas arī asins analīzēs, kuras ietekmē ne tikai teļa vecums, bet arī daudzi citi faktori kā, piemēram, uzņemtās barības veids un dažādas barības piedevas (Dillane et al., 2018; Mohri et al., 2007). Īpaši liela nozīme barības veidam un barošanas režīmam ir sasniedzot aptuveni 5 nedēļu vecumu, kad teļi sāk vairāk uzņemt tilpumaino barību (sienu, starterbarību) (Reece, 1980).

Promocijas darba pētījumā tika novērots, ka noteiktie hematoloģiskie rādītāji (leikocītu skaits, eritrocītu skaits, hematokrīts, hemoglobīna līmenis eritrocītos un trombocītu skaits) visās asins paraugu ņemšanas reizēs PreG (prebiotikas grupa) un SynG (sinbiotikas grupa) un CoG (kontroles grupa) grupu teļiem bija bez būtiskām atšķirībām starp grupām, $p>0.05$.

Eritrocītu skaits līdz ar teļu vecuma palielināšanos vienmērīgi paaugstinājās, arī hematokrīts un hemoglobīna koncentrācija eritrocītos bija ar tendenci paaugstināties līdz ar teļu vecuma palielināšanos gan teļu grupās, kuras papildus saņēma barības piedevas, gan arī kontroles grupā. Līdzīgi novērojumi konstatēti pētījumā ar 65 Holšteinas melnraibās šķirnes teļiem no dzimšanas līdz 24 nedēļu vecumam (Ježek et al., 2011). Teļiem pēc 5. dzīves nedēļas eritrocītu daudzums palielinājās. Līdzīga dinamika bija novērojama saistībā ar hemoglobīna koncentrāciju asinīs un hematokrītu. Rādītāji palielinājās līdz 2. teļu dzīves nedēļai, tad tie samazinājās līdz 6. dzīves nedēļai, bet vēlāk līdz ar vecumu palielinājās. Zemāku eritrocītu daudzumu, kā arī zemāku hemoglobīna daudzumu un hematokrītu varētu izskaidrot ar to, ka pēc piedzimšanas samazinās

eritrocītu produkcija, kā arī teļu organismā cirkulējošo intrauterīni producēto eritrocītu dzīves ilgums ir īsāks (Harvey, 1997). Savukārt pēc 5. – 6. dzīves nedēļas eritrocītu, hemoglobīna un hematokrīta rādītāji palielinās, kas varētu būt saistīts ar to, ka teļi vairāk uzņem tilpumaino barību (starterbarību, sienu), kas satur vairāk dzelzi nekā piens (Reece, 1980).

Kā jau tika minēts, ne tikai teļu vecums, bet arī barības piedevas var ietekmēt asins analīžu rezultātus. Promocijas pētījumā netika novērots, ka topinambūra koncentrāts (sastāvā 48.5 – 50.1% inulīns) un tā kombinācija ar raugu *Saccharomyces cerevisiae* (celms 1026) būtiski ietekmētu eritrocītu skaitu, hemoglobīna līmeni eritrocītos un hematokrīta līmeni. Līdzīgi novērojumi bija pētījumā ar teļiem no to dzimšanas līdz 6 mēnešu vecumam, kuriem pie barības papildus izbaroja 10 g *S.cerevisiae* (*Yea-Sacc 1026*) uz teļu dienā. Rauga izbarošana būtiski neietekmēja eritrocītu skaitu un hemoglobīna līmeni eritrocītos (Mikolaychik et al., 2020). Arī citā pētījumā ar Holšteinas šķirnes teļiem no to 1.-56. dzīves dienai, kuriem izbaroja prebiotiku inulīnu devā 3 g un 6 g uz teļu dienā, novēroja, ka šī barības piedeva neietekmēja eritrocītu daudzumu pētījuma grupām, salīdzinot ar kontroles grupas teļiem, kā arī līdzīgi novērojumi bija saistībā ar hematokrīta līmeni. Pētījumā iegūtie rezultāti par hemoglobīna līmeni nesakrīta ar mūsu iegūtajiem rezultātiem. Zinātnieks novērojis, ka pētījuma 56. dienā hemoglobīna līmenis eritrocītos būtiski augstāks bija teļu grupai, kurai papildus izbaroja inulīnu devā 3 g uz teļu dienā, $p \leq 0.05$ nekā citās grupās (Król, 2011).

Literatūrā minēts, ka leukocītu skaits teļiem ir augstāks nekā pieaugušiem dzīvniekiem un ir vairāk mainīgs nekā citi hematoloģiskie rādītāji (Kraft, 1999). Promocijas darba pētījumā novērots, ka leukocītu skaits visās teļu grupās un arī visa pētījuma laikā bija ļoti līdzīgs un būtiski neatšķīrās, kā arī būtiski nemainījās atkarībā no teļu vecuma. Līdzīgi rezultāti par leukocītu skaitu iegūti jau iepriekš pieminētajā Mikolaychik un viņa kolēģu (2020) pētījumā ar teļiem no to dzimšanas līdz 6 mēnešu vecumam, kuriem pie barības papildus izbaroja 10 g *S.cerevisiae* (*Yea-Sacc 1026*) uz teļu dienā. Šī barības piedeva neietekmēja leukocītu skaitu asinīs. Savukārt Król (2011) pētījumā ar Holšteinas šķirnes teļiem no to 1.-56. dzīves dienai, kuriem izbaroja prebiotiku inulīnu devā 3 g un 6 g uz teļu dienā novēroja, ka pētījuma 56. dienā būtiski augstāks leukocītu skaits bija teļiem, kuriem papildus izbaroja 6 g inulīnu uz teļu dienā, salīdzinot ar citām grupām, $p < 0.05$. Tomēr šajā pētījumā netika noteikts, vai tieši izbarotajām barības piedevām bija ietekme uz leukocītu skaitu, vai tomēr to skaitu ietekmēja kādi citi faktori, piemēram, teļu vispārējais veselības stāvoklis vai stress.

Promocijas pētījumā konstatēts, ka trombocītu skaits visās teļu grupās pētījuma 1., 28. un 56. dienā bija bez būtiskām atšķirībām, $p > 0.05$. Citu autoru pētījumos novērots, ka trombocītu skaits palielinās teļu pirmajos 3 dzīves mēnešos (Mohri et al., 2007; Brun-Hansen et al., 2006), tomēr promocijas darba pētījumā šāda tendence netika novērota. Lai arī visu grupu teļiem trombocītu skaits palielinājās un 8-9 nedēļu veciem teļiem tas bija augstāks nekā 4-5 nedēļu

veciem teļiem, tomēr 12 – 14 nedēļu veciem teļiem trombocītu skaits, lai arī ne būtiski, bet bija samazinājies un bija pat zemāks nekā 4-5 nedēļu vecumā. Tātad promocijas darba pētījumā augstākais trombocītu skaits visās grupās tika novērots 8-9 nedēļas veciem teļiem, bet visaugstākais teļu grupai, kas pie spēkbarības papildus saņēma 12 g topinambūra koncentrātu, kas satur 6 g prebiotiku inulīnu un 5 g rauga *S.cerevisiae* 1026 celmu. Pētījumā ar Holšteinas šķirnes teļiem no to 1.-56. dzīves dienas, kuriem tika izbarots inulīns devā 3 g un 6 g uz teļu dienā, viszemākais trombocītu skaits tika novērots 2 – 4 dienu vecumā un 56 dienu vecumā (8 nedēļu vecumā) tiem teļiem, kas saņēma inulīnu devā 3 g uz teļu dienā, bet visaugstākais trombocītu skaits 2 – 4 dienu vecumā un 56 dienu vecumā tika novērots teļiem, kas saņēma inulīnu devā 6 g uz teļu dienā. Tomēr atšķirības starp grupām nebija būtiskas (Król, 2011).

Nozīmīgi asins seruma biokīmiskie parametri, kas var sniegt būtisku informāciju par dzīvnieka vispārējo veselības stāvokli ir kopējais proteīns (TP), albumīns un globulīni. Promocijas darba pētījumā novērots, ka TP līmenis asins serumā līdz ar teļu vecuma pieaugumu visās grupās palielinājās, bet viszemākais TP līmenis asins serumā pētījuma 56. dienā bija SynG grupas teļiem $59.4 \pm 2.63 \text{ g L}^{-1}$, kas bija arī būtiski zemāks nekā PreG grupas teļiem $65.4 \pm 3.34 \text{ g L}^{-1}$, $p=0.017$. Kontroles grupas teļiem kopējā proteīna līmenis asins serumā bija $62.3 \pm 2.63 \text{ g L}^{-1}$ un tas būtiski neatšķīrās no SynG un PreG grupu teļu proteīna līmeņa asins serumā. Līdzīgi rezultāti par raugu novēroti 12 nedēļu garā pētījumā ar 75 dienas veciem bifeļa teļiem, kuriem izbaroja *S.cerevisiae* 30 g un 60 g uz teļu dienā. TP līmenis asins serumā šiem teļiem pētījuma beigās bija nebūtiski, bet tomēr zemāks nekā kontroles grupas teļiem (Abdalla et al., 2013). Pavisam pretēji rezultāti novēroti pētījumā, kurā aitām izbaroja raugu *S.cerevisiae*. Aitām, kurām izbaroja raugu, TP līmenis asins serumā bija augstāks nekā kontroles grupas aitām (El-Ashry et al., 2003). Līdzīgi novērojumi konstatēti arī Hossain un viņa kolēģu (2012) pētījumā ar teļiem, kuriem papildus pie barības izbaroja *S.cerevisiae* devās 5 g un 10 g. Arī šajā pētījumā teļiem, kuriem izbaroja raugu, TP līmenis asins serumā bija augstāks nekā kontroles grupas teļiem un rauga grupas teļiem, kuriem izbaroja 10 g *S.cerevisiae* dienā, pat būtiski augstāks nekā kontroles grupas teļiem, $p<0.05$. Arī Hassan un kolēģu (2016) pētījumā, kurā Holšteinas melnraibās šķirnes krustojuma teļiem no dzimšanas līdz 90 dienu vecumam papildus izbaroja 2.5 g un 5 g raugu *S.cerevisiae* uz teļu dienā (*Yea-sacc 1026*), novēroja būtiski augstāku TP līmeni asins serumā nekā kontroles grupas teļiem, $p=0.004$. Kā pamatojumu šiem rezultātiem zinātnieki min iespējams labāku proteīna uzsūkšanu no gremošanas kanāla.

Promocijas pētījumā teļu grupai, kurai pie barības papildus pievienoja topinambūra koncentrātu, kura sastāvā ir 48.5 – 50.1% prebiotika inulīns, TP līmenis asins serumā, kā jau tika pieminēts iepriekš, bija nebūtiski, bet tomēr augstāks nekā kontroles grupas teļiem. Šie rezultāti ir pretēji Tóth un viņa kolēģu (2020) pētījumā novērotajam. Šie pētnieki teļiem izbaroja prebiotiku inulīnu

devā 18.7 g uz teļu dienā un novēroja, ka 60. pētījuma dienā inulīna grupas teļiem TP līmenis asins serumā bija būtiski zemāks nekā kontroles grupas teļiem, $p < 0.05$. TP samazināšanos varētu radīt pastiprināta fermentācija tievajā zarnā un tai sekojoša mikrobiālo procesu darbības rezultātā radusies palielinātā slāpekļa daudzuma iepļūšana resnajā zarnā (Verdonk et al., 1998).

Runājot par albumīnu, tad tā līmenis asins serumā promocijas darba pētījuma visās grupās bija līdzīgs un būtiski neatšķīrās ne starp grupām, ne arī palielinoties teļu vecumam, $p > 0.05$. Arī jau iepriekš pieminētajā Hossain un viņa kolēģu (2012) pētījumā ar teļiem, kuriem papildus pie barības izbaroja *S.cerevisiae* devās 5 g un 10 g, netika novērota būtiska albumīna līmeņa atšķirība starp teļu grupām, kurām papildus izbaroja raugu un kontroles grupu. Līdzīgus rezultātus ieguvuši Tóth un viņa kolēģi (2020) pētījumā ar teļiem, kuriem izbaroja prebiotiku inulīnu devā 18.7 g uz teļu dienā. Pētnieki novēroja, ka inulīns neietekmēja albumīna līmeni asins serumā.

Promocijas darba pētījumā novērots, ka globulīnu līmenis asins serumā PreG un SynG grupu teļiem līdz ar teļu vecumu palielinājās, bet CoG teļu grupai globulīnu līmenis pētījuma vidū samazinājās, tomēr pētījuma beigās, tāpat kā citām grupām, arī palielinājās. Pētījuma 56. dienā visaugstākais globulīnu līmenis asins serumā tika konstatēts PreG grupas teļiem $29.4 \pm 4.45 \text{ g L}^{-1}$, nedaudz zemāks CoG grupas teļiem – $28.7 \pm 1.70 \text{ g L}^{-1}$, bet viszemākais SynG grupas teļiem – $23.9 \pm 2.66 \text{ g L}^{-1}$, un PreG grupas teļiem globulīnu līmenī asins serumā bija būtiski augstāks nekā SynG grupas teļiem, $p = 0.042$. Līdzīgi rezultāti iegūti 12 nedēļu garā pētījumā ar 75 dienas veciem bifēja teļiem, kuriem izbaroja *S.cerevisiae* 30 g un 60 g uz teļu dienā. Šiem teļiem globulīnu līmenis asins serumā pētījuma beigās bija nebūtiski, bet tomēr zemāks nekā kontroles grupas teļiem (Abdalla et al., 2013). Savukārt pretēji rezultāti iegūti Hossain un viņa kolēģi (2012) pētījumā ar teļiem, kuriem papildus pie barības izbaroja *S.cerevisiae* devās 5 g un 10 g. Teļiem, kuriem izbaroja raugu, globulīnu līmenis asins serumā bija augstāks nekā kontroles grupas teļiem. Arī pētījumā ar 24 Holšteinas melnraibās šķirnes krustojuma teļiem no dzimšanas līdz 90 dienu vecumam, kuriem papildus izbaroja 2.5 g un 5 g raugu *S.cerevisiae* uz teļu dienā (*Yea-sacc 1026*), novēroja būtiski augstāku globulīnu līmeni asins serumā, $p = 0.004$ (Hassan et al., 2016).

Kopumā izvērtējot promocijas pētījumā iegūtos rezultātus par kopējo proteīna, albumīna un globulīnu līmeni asins serumā, nevar viennozīmīgi apgalvot, ka topinambūra koncentrāta ar tā sastāvā esošo prebiotiku inulīnu un rauga *S.cerevisiae* celms 1026 izbarošana būtiski ietekmētu šo rādītāju līmeni asins serumā.

Promocijas pētījuma ietvaros tika novērots, ka glikozes līmenis asinīs 4 – 14 nedēļu veciem teļiem bija mainīgs, bet būtiski neatšķīrās atkarībā no teļu vecuma, bet tika novērotas glikozes līmeņa atšķirības asinīs atkarībā no izbarotās barības piedevas. Glikozes līmenis asinīs pētījuma 1. un 28. dienā visaugstākais bija SynG grupas teļiem, bet šī atšķirība starp visām grupām nebija būtiska,

$p > 0.05$. Savukārt pētījuma 56. dienā CoG teļiem vidējais glikozes līmenis asinīs bija būtiski zemāks $5.3 \pm 0.38 \text{ mmol L}^{-1}$ nekā teļu grupai, kas papildus pie barības saņēma topinambūra koncentrātu un nekā teļu grupai, kura pie barības papildus saņēma šo koncentrātu kombinācijā ar rauga *S.cerevisiae* celmu 1026 (attiecīgi $6.6 \pm 0.48 \text{ mmol L}^{-1}$, $p = 0.001$ un $6.5 \pm 0.40 \text{ mmol L}^{-1}$, $p = 0.002$). Augstāku glikozes līmeni asinīs teļiem, kuriem papildus pie barības pievienoja *S.cerevisiae*, varētu izskaidrot ar to, ka raugs uzlabo barības vielu sagremošanu un palielina propionskābes produkciju spureklī, kas tiek tālāk izmantota glikozes producēšanai glikoneoģenēzes procesā aknās (Hassan et al., 2016). Iegūtie rezultāti ir līdzīgi Hossain un viņa kolēģu (2012) izpētītajam, kas arī novēroja, ka *S.cerevisiae* piedevas (5 g un 10 g) būtiski palielina ($p < 0.05$) glikozes līmeni augošu teļu asins serumā. Līdzīgi novērojumi ir arī par šī rauga ietekmi uz glikozes līmeni asinīs slaucamajām govīm (Szucs et al. 2013). Arī pētījumā ar 24 Holšteinas melnraibās šķirnes krustojuma teļiem no dzimšanas līdz 90 dienu vecumam, kuriem papildus pie barības izbaroja 2.5 g un 5 g rauga *S.cerevisiae* celmu 1026 uz teļu dienā, novēroja asinīs būtiski augstāku glikozes līmeni, $p < 0.001$, salīdzinot ar kontroles grupas teļiem (Hassan et al., 2016). Savukārt Dobicki ar kolēģiem (2005) pētījumā ar teļiem no dzimšanas līdz 120. dzīves dienai, kuriem pie piena un spēkbarības pievienoja 1-4% *S.cerevisiae*, novēroja būtiski zemāku ($p \leq 0.05$) glikozes koncentrāciju asinīs nekā kontroles grupas teļiem.

Pētījumi par prebiotikas inulīna ietekmi uz glikozes līmeni asinīs ir pretrunīgi. Vairākos pētījumos, kuros izmantota prebiotika inulīns, kas ir arī mūsu pētījumā izmantotā topinambūra koncentrāta sastāvā, novērots, ka inulīna izbarošana neietekmēja glikozes līmeni asinīs. Piemēram, pētījumā ar teļiem no dzimšanas līdz 63. dzīves dienai, kas pie barības saņēma 18.7 g inulīnu uz teļu dienā, nenovēroja asins glikozes līmeņa būtiskas atšķirības, salīdzinot ar kontroles grupas teļiem (Tóth et al., 2020). Pretēji rezultāti iegūti pētījumā ar Holšteinas šķirnes teļiem, kuriem no dzimšanas līdz dzīves 56. dienai papildus izbaroja inulīnu devā 3 g un 6 g uz teļu dienā. Šiem teļiem pētījuma beigās bija augstāks glikozes līmenis asinīs nekā kontroles grupai, bet šī atšķirība nebija būtiska, $p > 0.05$ (Król, 2011). To varētu izskaidrot ar augstāku uzņemtās enerģijas daudzumu un labāku tās uzsūkšanu un izmantošanu audos. Teļiem augstāks glikozes līmenis asinīs ir cieši saistīts ar labāku dzīvmasas pieaugumu (Król, 2011), kas tika arī novērtots promocijas darba pētījumā.

Runājot par urīnvielu (UREA) un kreatinīnu (CREA), šo asins seruma bioķīmisko rādītāju līmenis var izmainīties pie nieru darbības traucējumiem (Hammond, 1998). Vairākos pētījumos novērots, ka UREA daudzums asins serumā mainās atkarībā no teļa vecuma, kā arī to var ietekmēt barība (Knowles et al., 2000; Abdalla et al., 2013). Uzsākot promocijas pētījumu, teļu vidējais vecums bija 32 ± 4 dienas un noslēgumā 88 ± 4 dienas, un tika novērots, ka CoG un SynG grupu teļiem vidējais UREA līmenis asins serumā bija ar tendenci palielināties un pētījuma beigās bija attiecīgi $4.5 \pm 0.91 \text{ mmol L}^{-1}$ un

3.4±0.47 mmol L⁻¹. Savukārt PreG grupas teļiem UREA līmenis asins serumā pētījuma beigās bija pat zemāks nekā uzsākot pētījumu (attiecīgi 3.2±0.61 mmol L⁻¹ un 3.8±0.54 mmol L⁻¹). Knowles ar kolēģiem (2000) 83 dienu garā pētījumā ar 14 teļiem novēroja UREA koncentrācijas strauju samazināšanos pēc teļu piedzimšanas līdz to 10. dzīves dienai, bet pēc 40. dzīves dienas UREA līmenis asinīs pakāpeniski palielinājās un pētījuma beigās jau sasniedza pieaugušu govju UREA normu zemāko robežu. Promocijas darba pētījuma teļiem, kuriem pie barības papildus izbaroja barības piedevas, UREA līmenis asina serumā pētījuma beigās bija zemāks nekā CoG teļiem un tas nesasniedza pieaugušu govju normu zemāko robežu, kas ir 3.57 mmol L⁻¹ (Radostits et al., 2006). Līdzīgi rezultāti iegūti 12 nedēļu garā pētījumā ar 75 dienas veciem bifeļa teļiem, kuriem izbaroja *S.cerevisiae* 30 g un 60 g uz teļu dienā. Urīnvielas līmenis asins serumā šiem teļiem pētījuma laikā bija nebūtiski, bet tomēr zemāks nekā kontroles grupas teļiem (Abdalla et al., 2013). Arī citā pētījumā ar Holšteinas šķirnes teļiem no 1. – 56. dzīves dienai, kuriem pie piena aizvietotāja pievienoja prebiotiku inulīnu 3 g un 6 g dienā uz teļu, novēroja, ka UREA līmenis asins serumā kontroles grupai bija būtiski augstāks nekā teļiem, kuriem izbaroja 3 g un 6 g inulīnu, attiecīgi p<0.01 un p<0.05 (Król, 2011). Noskaidrots, ka UREA koncentrācija asinīs samazinās, ja palielinās ar barību uzņemtās enerģijas daudzums. Tas varētu būt saistīts ar to, ka spureklī tiek efektīvāk izmantots UREA sastāvā esošais slāpekļs (Hammond, 1998), kā arī spureklī palielinās proteīna sintēze, ko sintezē tur esošie mikroorganismi (Blowey et al., 1973). Savukārt citā pētījumā ar teļiem no dzimšanas līdz 63. dzīves dienai, tika novērots, ka teļu grupai, kura pie barības saņēma 18.7 g inulīnu uz teļu dienā, asins seruma UREA līmenis nesamazinājās, bet bija līdzīgs kā teļiem no kontroles grupas (Tóth et al., 2020).

Promocijas pētījumā novērots, ka CREA līmenis asins serumā visa pētījuma laikā bija mainīgs un tikai SynG teļu grupai novērots, ka CREA līmenis pakāpeniski paaugstinājās līdz ar teļu vecuma palielināšanos. Pētījuma 56. dienā CoG teļu CREA līmenis asins serumā 79.8±4.24 mmol L⁻¹ bija būtiski augstāks nekā PreG un SynG grupu teļiem (attiecīgi 68.9±2.85 mmol L⁻¹, p=0.001 un 70.1±3.58 mmol L⁻¹, p=0.003). Arī savstarpēji salīdzinot PreG un SynG teļu vidējo CREA līmeni asins serumā, tika konstatēts, ka tas būtiski atšķiras starp grupām, p=0.001. Līdzīgi rezultāti iegūti 12 nedēļu garā pētījumā ar 75 dienas veciem bifeļa teļiem, kuriem izbaroja *S.cerevisiae* 30 g un 60 g uz teļu dienā. Kreatinīna līmenis asins serumā šiem teļiem pētījuma laikā arī bija mainīgs, tomēr atšķirības starp pētījuma grupām un kontroles grupu nebija būtiskas (Abdalla et al., 2013). Kā zināms, CREA ir kreatīna un kreatīna fosfāta sadalīšanās produkts muskuļos (Yu, 2019) un šī rādītāja koncentrācija asins serumā palielinās tikai pie nopietniem nieru bojājumiem (Kraft, Durr, 1999a). Tātad var secināt, ka promocijas pētījumā pie barības pievienotais topinambūra koncentrāts un tā kombinācija ar rauga *S.cerevisiae* celmu 1026 neietekmēja vielmaiņas procesus muskuļos.

Lai varētu spriest par iespējamām aknu darbības problēmām, tika novērtēts GGT (gamma-glutamilttransferāze) un ASAT (asparāta aminotransferāze). Abi šie asins seruma bioķīmiskie rādītāji būtiski neatšķīrās starp visām teļu grupām, $p > 0.05$. Arī El-Ashry ar kolēģiem (2001) un El-Shaer (2003) pētījumos ar raugu, kas pievienots pie bifēļu teļu un aitu barības, nenovēroja būtisku ietekmi uz ASAT līmeni asins serumā. Citā pētījumā ar Holšteinas šķirnes teļiem, kuriem izbaroja prebiotiku inulīnu 3 g un 6 g dienā uz teļu no to 1.-56. dzīves dienai, pētnieks arī novēroja, ka ASAT līmenis asinīs būtiski neatšķīrās inulīna grupu teļiem un kontroles grupas teļiem (Król, 2011).

Promocijas darba pētījuma ietvaros noteiktais GGT līmenis asins serumā gan teļu grupām, kurām papildus pie barības izbaroja barības piedevas, gan arī kontroles grupai, līdz ar vecumu samazinājās, un 13 – 14 nedēļu veciem teļiem šis rādītājs jau iekļāvās pieaugušu govju normu robežās. Savukārt ASAT līmenis asins serumā joprojām bija zemāks nekā tas ir pieaugušām govīm, lai gan vairākos pētījumos novērots, ka ASAT pieaugušu govju līmeni sasniedz jau aptuveni 8. – 10. dzīves nedēļā (Mohri et al., 2007). Tātad, ne topinambūra koncentrāts, ne arī tā kombinācija ar rauga *S.cerevisiae* celmu 1026 neietekmē ASAT un GGT līmeni teļu asins serumā.

2.2. Barības piedevu ietekme uz teļu dzīvmasas izmaiņām

Prebiotikas var pozitīvi ietekmēt atgremotāju produktivitāti, uzlabojot teļu diennakts dzīvmasas pieaugumu gan piena izbarošanas periodā, gan tilpumainās barības izbarošanas periodā, kā arī uzlabot barības izmantojamību tilpumainās barības izbarošanas periodā (Heinrichs et al., 2009). Šī promocijas darba pētījuma rezultāti parādīja, ka topinambūra koncentrāts ar tā sastāvā esošo prebiotiku inulīnu (48.5 – 50.1% no kopējā sastāva), kas tika pievienots teļu barībā pie spēkbarības vienreiz dienā, veicina straujāku teļu dzīvmasas pieaugumu.

Promocijas darba pētījumā novērots, ka teļu grupām, kurām pie barības papildus tika izbarots 12 g topinambūra koncentrāts ar tā sastāvā esošo prebiotiku inulīnu (6 g) un 12 g topinambūra koncentrāts (inulīna saturs 6 g) kombinācijā ar 5 g raugu *Saccharomyces cerevisiae* (celms 1026), dzīvmasas pieaugums bija lielāks nekā kontroles grupas teļiem. Teļiem no PreG grupas vidējais dzīvmasas pieaugums visā pētījuma laikā bija 65.8 ± 6.57 kg, kas bija arī būtiski augstāks nekā CoG grupas teļiem – 36.8 ± 7.98 kg, $p = 0.002$. Kā arī SynG grupas teļiem dzīvmasas pieaugums 62.6 ± 13.75 kg bija būtiski augstāks nekā CoG grupas teļiem, $p = 0.004$ (1.tabula).

Topinambūra koncentrāta un tā sinbiotikas ar *S.cerevisiae* rauga celmu 1026 izbarošanas ietekme uz teļu dzīvmasas pieaugumu dažādos pētījuma posmos (no 1. līdz 28., no 28. – 56. un 1. – 56. dienai) un vidēji diennaktī/ *Effect of feeding Jerusalem artichoke concentrate and its synbiotic with S.cerevisiae strain 1026 on the increase in calf live weight at different stages of the study (days 1 to 28, days 28 to 56 and 1 to 56) and mean daily live weight gain*

Grupā/ Group	Vidējais dzīvmasas pieaugums (kg±SD)/ Mean live weight gain (kg ±SD)			Vidējais diennakts dzīvmasas pieaugums (kg d ⁻¹ ±SD)/ Mean daily live weight gain in the group (kg d ⁻¹ ±SD)
	1. – 28. pētījuma diena/ day 1-28 of the study	28. – 56. pētījuma diena/ day 28-56 of the study	1. – 56. pētījuma diena/ day 1-56 of the study	
CoG	17.6±4.92	19.2±4.96 ^a	36.8±7.98	0.65±0.14
PreG	22.0±4.41	43.8±6.91 ^{bc}	65.8±6.57	1.17±0.11
SynG	21.8±4.81	40.8±11.16 ^{bc}	62.6±13.75	1.11±0.24

^{a-c} Vidējie vienā kolonā bez kopīgiem burtiem ir būtiski atšķirīgi ($p < 0.05$) / ^{a-c} The values with different superscript letters in a column are significantly different ($p < 0.05$)

Procentuāli PreG grupai teļu dzīvmasa pētījuma beigās palielinājās par 48.7% un SynG grupai par 48.2%, bet CoG par 31.7%. Tātad PreG grupas teļiem dzīvmasas pieaugums bija par 17% labāks nekā CoG grupas teļiem, bet SynG tas bija par 16.5% labāks nekā CoG teļiem. Šie iegūtie rezultāti ir līdzīgi citu pētnieku publicētajiem datiem, kuri savos pētījumos izmantoja prebiotiku inulīnu un arī novēroja būtiski labāku teļu dzīvmasas pieaugumu (Verdonk, Van Leeuwen, 2004; Webb et al., 1992). Citā līdzīgā pētījumā, kurā tika izmantots tas pats topinambūra koncentrāts ar inulīna saturu 48.5–50.1%, kā šī promocijas darba pētījumā, devās 6 g, 12 g un 24 g, arī tika novērots labāks dzīvmasas pieaugums prebiotiku grupām, īpaši tai teļu grupai, kurai dienā izbaroja 24 g topinambūra koncentrāta, kas saturēja 12 g prebiotiku inulīnu (Ilgaza et al., 2016). Ļoti labus rezultātus savā 56 dienu garajā pētījumā ar 36 Holšteinas šķirnes piena teļiem novēroja Król (2011). Viņš teļiem izbaroja inulīnu devās 3 g un 6 g dienā un konstatēja, ka tiem teļiem, kuri saņēma 6 g inulīnu, dzīvmasa pētījuma beigās bija būtiski augstāka nekā tiem teļiem, kas saņēma 3 g inulīnu vai bija no kontroles grupas, $p < 0.01$.

Noskaidrots, ka prebiotikas pozitīvi ietekmē gremošanas kanāla mikrobiomu, veicinot labvēlīgās zarnu mikrofloras augšanu un vairošanos un kavējot patogēno mikroorganismu proliferāciju un adhēziju pie zarnu gļotādas, kas arī varētu būt kā iespējama izskaidrojums labākiem teļu augšanas rādītājiem (Król, 2011). Tomēr jāņem vērā, ka pieaugušiem atgremotājiem spureklī notiek intensīvi fermentatīvie procesi un inulīns var tikt pilnībā fermentēts un var nesasniegt

tālākās gremošanas kanāla daļas (Van Leeuwen, Verdonk, 2004). Spureklī prebiotikas tiek pamatā fermentētas ar dažādu baktēriju palīdzību, kas tās izmanto kā enerģijas avotu (Samanta et al., 2013; Öztürk, 2008). Tātad pieaugušu atgremotāju spureklī prebiotikas var tikt pilnībā fermentētas un to iedarbības efekts var izpalikt. Bet teļiem, kuriem pamatā izbaro pienu vai piena aizvietotāju, spureklis tik labi vēl nav attīstījies, un noteiktu laiku teļus var uzskatīt par monogastriskiem dzīvniekiem (Van Leeuwen, Verdonk, 2004). Atgremošanas procesi teļiem pilnīgi sākas aptuveni 6 – 8 nedēļu vecumā un spureklis sastāda aptuveni 70% no visiem kuņģa nodalījumiem. Bet par pilnvērtīgiem atgremotājiem teļus var uzskatīt no 12 nedēļu vecuma, kad teļu spureklis ir attīstījies tādā līmenī, ka spēj sagremot tīlpumaino barību tikpat labi, kā to spēj pieaugušie atgremotāji (Govil et al., 2017). Tātad, balstoties uz šo informāciju, var secināt, ka prebiotiku, ieskaitot inulīnu, ietekme teļiem vislabāk izpaužas pirms tie kļuvuši par pilnvērtīgiem atgremotājiem. Promocijas darba pētījumā iekļautie teļi bija pārejas vecumā no nosacīti monogastriskiem dzīvniekiem uz pilnvērtīgiem atgremotājiem (teļu vidējais vecums uzsākot pētījumu bija 4 – 5 nedēļas un to noslēdzot bija 13 – 14 nedēļas), tādēļ var pieņemt, ka topinambūra sastāvā esošā prebiotika inulīns netika pilnībā fermentēta spureklī, bet nokļuva arī tālākās gremošanas kanāla daļās.

Promocijas darba pētījuma ietvaros vienai teļu grupai tika izbarota arī sinbiotika (sastāvā 12 g topinambūra koncentrāts, kas satur 6 g prebiotiku inulīnu kombinācijā ar 5 g *S.cerevisiae* rauga celmu 1026) un šī piedeva būtiski uzlaboja teļu dzīvmasas pieaugumu 56 dienu garajā pētījumā. Teļiem, kuriem izbaroja sinbiotiku, dzīvmasas pieaugums pētījuma beigās bija 62.6 ± 13.75 kg, kas, salīdzinot ar CoG grupas teļu dzīvmasas pieaugumu 36.8 ± 7.98 kg, bija būtiski lielāks, $p=0.004$. Arī daudzos pētījumos novērots, ka ne tikai prebiotikas, vai probiotikas, bet arī abu šo piedevu kombinācijas – sinbiotikas, var uzlabot dzīvnieku augšanas rādītājus. Piemēram, Lesmeister ar līdzautoriem (2004) novēroja, ka tiem teļiem, kuriem 42 dienu garā pētījumā izbaroja 2% *S.cerevisiae* dzīvmasas pieaugums bija par 15.6% labāks nekā kontroles grupas teļiem. Bet Roodposhti un Dabiri (2012) novēroja, ka teļu vidējais diennakts dzīvmasas pieaugums būtiski palielinājās, kad 8 nedēļas pie teļu barības pievienoja 1 g probiotiku, kas saturēja 7 baktēriju celmus un 2 raugu celmus ar 2×10^9 KVV g^{-1} un 4 g prebiotiku, kas saturēja polisaharīdus no *S.cerevisiae* šūnu sienas. Arī citi autori savos pētījumos pierādījuši, ka probiotikas var veiksmīgi izmantot kā augšanas veicinātājus. Di Francia ar līdzautoriem (2008) novēroja, ka 12 nedēļu ilga *S.cerevisiae* rauga kultūras produktu pievienošana pie 10 dienas vecu teļu barības devā 26 g saussnē, uzlabo vidējo diennakts dzīvmasas pieaugumu, salīdzinot ar kontroles grupu. Kā arī Nehru ar kolēģiem (2017) pētījumā ar 2 nedēļas veciem Holšteinas šķirnes krustojuma teļiem, kuriem 16 nedēļas tika izbarota probiotika *S.cerevisiae* celms 1026 devā 2 g (1×10^{10} KVV), novēroja būtisku uzlabojumu diennakts dzīvmasas pieaugumā (560.27 ± 8.56 g), salīdzinot ar kontroles grupas teļiem (512.28 ± 6.52 g). Līdzīgi rezultāti tika sasniegti arī citā

pētījumā, kurā raugs *S.cerevisiae* devā 2.5 g un 5 g tika pievienots pie 24 jaundzimušu Holšteinas šķirnes teļu barības 90 dienas (Hassan et al., 2016). Citā pētījumā, kurā pētnieki 7 – 10 dienu veciem bifeļu teļiem 120 dienas izbaroja topinambūra miltus devās 8 g, 16 g un 24 g dienā, tikai ar daudz zemāku inulīna saturu (15 – 20%), arī novēroja labāku dzīvmasas pieaugumu visām eksperimenta teļu grupām, salīdzinot ar kontroles grupas teļiem (Khare et al., 2018). Tomēr ir arī pētījumi, kuru rezultāti bija pretēji iepriekš minētajiem. Tóth ar līdzautoriem (2020) savā 60 dienu garajā pētījumā ar Holšteinas šķirnes teļiem, kuriem izbaroja MOS devā 18.7 g uz teļu dienā un inulīnu devā 18.7 g uz teļu dienā, nenovēroja nekādu pozitīvu ietekmi uz teļu dzīvmasas un diennakts dzīvmasas pieaugumu, salīdzinot ar kontroles grupu.

Promocijas darba ietvaros vēlējamies noskaidrot, vai 5 g rauga *S.cerevisiae* celma 1026 pievienošana pie 12 g topinambūra koncentrāta (inulīna saturs 6 g) uzlabo teļu dzīvmasas pieaugumu, salīdzinot ar teļu grupu, kurai papildus pie barības pievienoja tikai 12 g topinambūra koncentrātu. Tika novērots, ka kopējais dzīvmasas pieaugums un diennakts dzīvmasas pieaugums, lai arī ne būtiski, bet bija lielāks tiem teļiem, kuriem izbaroja tikai topinambūra koncentrātu, kas satur prebiotiku inulīnu (attiecīgi kopējais dzīvmasas pieaugums pētījuma laikā bija 65.8 ± 6.57 kg un diennakts dzīvmasas pieaugums 1.17 ± 0.11 kg), bet kombinācijā ar *S.cerevisiae* rauga celmu 1026, teļu augšanas rādītāji nebija tik augsti: 62.6 ± 13.75 kg un 1.11 ± 0.24 kg, bet joprojām būtiski labāki nekā kontroles grupas teļiem: 36.8 ± 7.98 kg, 0.65 ± 0.14 kg, $p=0.004$. To varētu izskaidrot ar rauga spēju fermentēt ogļhidrātu inulīnu. Lim ar kolēģiem (2011) atklāja, ka *S.cerevisiae* celms KCCM50549 spēj efektīvi fermentēt inulīnu saturošos ogļhidrātus topinambūrā. Arī cits *S.cerevisiae* celms (NCYC625) spēj fermentēt inulīnu, tikai mazākā daudzumā. Izanalizējot pētījumā iegūtos rezultātus, var pieņemt, ka tieši inulīna daļējā fermentācija bija par iemeslu nedaudz sliktākiem teļu augšanas rādītājiem SynG grupas teļiem, salīdzinot ar PreG grupas teļiem.

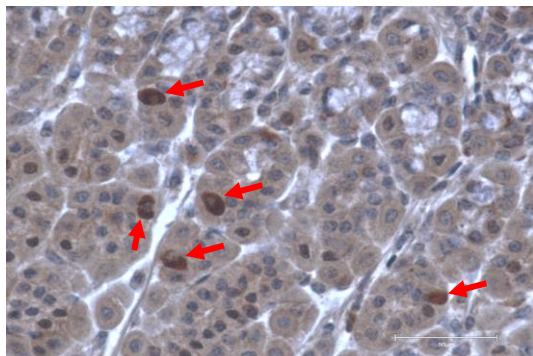
Ekonomiskais ieguvums, pārdodot vienu teļu un ņemot vērā izbarotās attiecīgās barības piedevas izmaksas, bet izvērtējumā neiekļaujot citas ar teļu audzēšanu saistītās izmaksas (teļu barības izmaksas, veterinārārsta un kopēju algas u.c. saimnieciskie izdevumi), PreG grupā bija 196.08 EUR un SynG grupā bija 186.60 EUR, kas attiecīgi bija par 21.78 EUR un 12.30 EUR vairāk nekā par katru kontroles grupas teļu.

2.3. Grelīna imūnreaktīvo šūnu skaits 13 – 14 nedēļu vecu teļu gremošanas kanālā atkarībā no izbarotajām barības piedevām

Grelīns ir hormons, kuram ir būtiska nozīme dažādu fizioloģisko procesu regulēšanā. Tas ietekmē organisma augšanu un attīstību, jo veicina augšanas

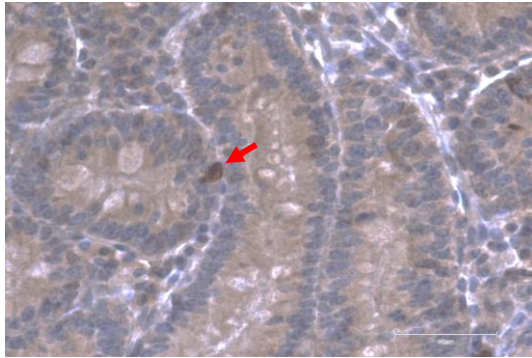
hormona izdalīšanos no hipofīzes (Masuda et al., 2000; Date et al., 2000a), kā arī grelīnam ir būtiska nozīme izsalkuma un sāta sajūtas regulēšanā (Coll et al., 2007; Stanley et al., 2005).

Atgremotājiem grelīns galvenokārt tiek ražots glumenieka gļotādas endokrīnajās šūnās (Hayashida et al., 2001). Kuņģī grelīna saturošās šūnas lielākā daudzumā ir atrodamas fundālo dziedzeru zonā (1. attēls), mazākā daudzumā – pilorisko dziedzeru zonā.



1.att./ Fig.1 Grelīna IR+ šūnas (bultiņas) 13 nedēļas vecam teļam no kontroles grupas glumenieka fundālo dziedzeru zonā (DAB + hematoksilīns, 400x)/ Ghrelin IR + cells (arrows) in a 13-week-old calf from the control group in the abomasum pars fundalis (DAB + hematoxylin, 400x)

Grelīnu producējošās šūnas ir atrodamas arī zarnās, bet tajās to daudzums nav tik liels kā glumeniekā un pakāpeniski samazinās virzienā no divpadsmitpirkstu zarnas uz lokzarnu (Date et al. 2000a) (2.attēls).



2.att./ Fig. 2 Grelīna IR+ šūna (bultiņa) 13 nedēļu vecam teļam no kontroles grupas divpadsmitpirkstu zarnas vidusdaļā (DAB + hematoksilīns, 400x)/ *Ghrelin IR + cell (arrow) in a 12-week-old calf from the middle of the duodenum of a control group (DAB + hematoxylin, 400x)*

Arī promocijas pētījumā tika konstatēts, ka glumnieka fundālo dziedzeru zonā grelīna imūnreaktīvo (IR) šūnu skaits gan kontroles grupas teļiem, gan arī teļiem, kas papildus pie barības saņēma barības piedevas, bija lielāks nekā pilorisko dziedzeru zonā un šo šūnu daudzums izteikti mazāks bija divpadsmitpirkstu un tukšās zarnas vidusdaļā (2.tabula).

2.tabula/ Table 2

Grelīna imūnreaktīvo pozitīvo šūnu skaits 1 mm² teļiem glumniekā un zarnās pēc 56 dienu ilgās topinambūra koncentrāta un tā sinbiotikas ar raugu *S.cerevisiae* izbarošanas/ Number of ghrelin-immunoreactive positive cells in the abomasum and intestine of 1 mm² in calves after 56 days of feeding Jerusalem artichoke concentrate and its synbiotic with *S.cerevisiae*

Grelīna IR+ šūnu lokalizācija/ <i>Localization of ghrelin IR + cells</i>	Grelīna IR+ šūnu skaits grupā (n=9)/ <i>The number of ghrelin IR + cells in the group (n=9)</i>						P-vērtība, K-W tests/ p-value, <i>Kruskal-Wallis test</i>
	CoG		PreG		SynG		
	Me	Q1-Q3	Me	Q1-Q3	Me	Q1-Q3	
Glumnieka fundālo dziedzeru zona/ <i>Abomasum fundic zone</i>	12 ^a	10-14	6 ^b	5-9	5 ^b	4-8	0.0001

Grelīna IR+ šūnu lokalizācija/ <i>Localization of ghrelin IR + cells</i>	Grelīna IR+ šūnu skaits grupā (n=9)/ <i>The number of ghrelin IR + cells in the group (n=9)</i>						p-vērtība, K-W tests/ p-value, <i>Kruskal-Wallis test</i>
	CoG		PreG		SynG		
	Me	Q1-Q3	Me	Q1-Q3	Me	Q1-Q3	
Glumenieka pilorisko dziedzeru zona/ <i>Abomasum pyloric zone</i>	2	0.75-3	1.5	1-2	1	0-2	0.289
Divpadsmitpirkstu zarnas vidusdaļa/ <i>Middle part of the duodenum</i>	1	0-2	0.5	0-1	1	0-2	0.098
Tukšās zarnas vidusdaļa/ <i>Middle part of the jejunum</i>	1	0-1	0	0-1	0	0-1	0.222

^{a-b} Vērtības vienā līnijā bez neviena kopīga burtā ir būtiski atšķirīgas/ ^{a-b} Values on the same line without any common letter are significantly different

Pētījumā ar 16 divus mēnešu vecām aitām ar vienādu izbarotās barības veidu, bet dažādiem barošanas režīmiem (1. grupa – *ad libitum*, 2. grupa – *ad libitum* un intravenoza grelīna injekcija ($1\mu\text{g kg}^{-1}$), 3. grupa – baro vienu reizi dienā, 4. grupa – baro divas reizes dienā), kurš ilga vienu mēnesi, tika novērots, ka grelīna IR šūnu skaits glumenieka kardiālo, fundālo un pilorisko dziedzeru zonās būtiski neatšķīrās starp aitu grupām ar dažādo barošanas režīmu (Özfiliz et al., 2011). Promocijas pētījumā visām teļu grupām pamatbarība un barošanas režīms bija vienāds, tikai atšķīrās pievienotās barības piedevas. Tātad var izteikt pieņēmumu, ka tieši barības piedevas ietekmēja grelīna IR šūnu skaitu. Grelīna IR šūnas glumeniekā, divpadsmitpirkstu zarnā un tukšajā zarnā lielākā daudzumā bija kontroles grupas teļiem un mazākā daudzumā teļu grupām, kurām pie barības papildus izbaroja topinambūra koncentrātu vai šo koncentrātu kombinācijā ar rauga *S.cerevisiae* celmu 1026. Piemēram, kontroles grupas teļiem grelīna IR šūnu skaits glumenieka fundālo dziedzeru zonā bija Me=12, IQR 10 – 14, PreG Me=6, IQR 4 – 9, bet SynG Me=5, IQR 5 – 8 (2.tabula). Lielāks grelīna IR šūnu skaits gremošanas kanālā varētu norādīt uz lielāka daudzuma grelīna sekrēciju. Zinot to, ka grelīns tiek producēts reaģējot uz izsalkumu un badu un samazinās pēc ēšanas, kad dzīvniekam rodas sāta sajūta (Nakazato et al., 2001; Wren et al., 2000), var pieņemt, ka kontroles grupas teļi izjuta lielāku izsalkumu nekā teļi, kuri saņēma barības piedevas. Daudzos pētījumos ir novērots, ka dažādas barības piedevas dzīvniekiem uzlabo barības

vielu sagremojamību, tātad tā pati barības deva dzīvniekiem ilgāk saglabā sāta sajūtu un uzlabojas uzņemto barības līdzekļu izmantojamība. Piemēram, Sullivan un Martin (1999) ziņojuši, ka rauga *S.cerevisiae* pievienošana pie govju barības uzlaboja celulozes sagremojamību, bet Samanta ar kolēģiem (2012) konstatējuši, ka prebiotikas FOS pievienošana pie barības būtiski uzlabo organisko vielu un sausnes sagremojamību spureklī.

Ir pieejams ļoti ierobežots daudzums informācijas par greļina IR šūnu skaita izmaiņām saistībā ar barības uzņemšanu. Tomēr pētījumā ar žurkām konstatēts, ka pēc 7 dienu badošanās greļina IR šūnu skaits kuņģī būtiski palielinājās, bet pēc barības uzņemšanas aktīvo šūnu daudzums samazinājās līdz normālam līmenim (Sönmez, Ozan, 2007). Tātad pēc barības uzņemšanas paaugstinātais glikozes līmenis asinīs nomāc greļina sekrēciju (Date et al., 2002b). Tomēr promocijas darba pētījumā netika konstatēta korelācija starp greļina IR šūnu skaitu dažādās gremošanas kanāla daļās un glikozes līmeni asinīs, $r=0.080$ $n=9$ $p=0.839$.

Par lielāku izsalkumu un sliktāku barības sagremojamību vai arī mazāku uzņemtās barības apjomu ilgākā laika posmā varētu liecināt arī mazāka teļu dzīvmasa. Lai arī kontroles grupu teļu dzīvmasa 115.3 ± 21.73 kg bija mazāka nekā teļiem, kuriem papildus izbaroja barības piedevas (PreG 130.0 ± 17.32 kg un SynG 119.0 ± 7.93 kg), tomēr netika konstatēta korelācija starp greļina IR šūnu skaitu dažādās gremošanas kanāla daļās un teļu dzīvmasu pētījuma 56. dienā, $r=0.025$, $p=0.948$.

2.4. Iekšējās vides pH izmaiņas teļiem dažādās gremošanas kanāla daļās atkarībā no izbarotajām barības piedevām (*post-mortem*)

Priekškuņģos notiek intensīvi mikrobiālie procesi, kuru rezultātā tiek fermentēti dažādi barības līdzekļi un tiek saražotas daudz dažādas organiskās skābes. Dažas no tām var uzkrāties un samazināt spurekļa satura pH, ja spurekļa buferspējas nespēj neitralizēt to ietekmi. Zems spurekļa iekšējās vides pH ilgstošu periodu var negatīvi ietekmēt barības uzņemšanu, spureklī esošo mikroorganismu augšanu un aktivitāti un barības vielu noārdīšanu, un var novest pie acidozes, iekaisuma, laminīta, diarejas. Tāpēc spurekļa iekšējās vides pH regulācija ir vissvarīgākais faktors optimālu spurekļa funkciju uzturēšanai (Chaucheyras-Durand et al., 2012).

Promocijas darba pētījumā teļiem 10 min laikā pēc nokaušanas tika noteikts iekšējās vides (satura) pH dažādās gremošanas kanāla daļās un tika noskaidrots, ka pētījumā izmantotais topinambūra koncentrāts ar sastāvā esošo prebiotiku inulīnu un topinambūra koncentrāts kombinācijā ar raugu *S.cerevisiae* ietekmēja pH dažādās gremošanas kanāla daļās.

Iekšējās vides pH mērījums spurekļa priekštelas (*atrium ruminis*) apvidū PreG grupas teļiem bija 7.5 ± 0.85 pH vienības, bet CoG grupas teļiem 7.1 ± 0.12 pH vienības. Spurekļa ventrālajā maisā pH PreG grupas teļiem bija 7.5 ± 0.60 pH vienības, bet CoG grupas teļiem 7.1 ± 0.10 pH vienības. Abi šie rezultāti starp grupām bija ļoti līdzīgi un PreG grupas teļiem pH spureklī bija augstāks, tomēr šī atšķirība nebija statistiski būtiska, $p > 0.05$. Ir publicēti līdzīgi pētījumi, kuros novērots, ka prebiotika inulīns ietekmē spurekļa satura pH, to paaugstinot. Piemēram, Król ar līdzautoriem (2011) veica 56 dienu garu pētījumu ar 108 Holšteinas šķirnes teļiem, kuriem ar piena aizvietotāju izbaroja inulīnu devās 3 g un 6 g uz teļu, un tika konstatēts, ka zemāks spurekļa satura pH bija kontroles grupai, $p < 0.05$, bet inulīna grupu teļiem tas bija augstāks, īpaši tai teļu grupai, kura saņēma inulīnu devā 6 g uz teļu dienā. Šie paši autori pētīja arī MOS ietekmi uz spurekļa satura pH. Viņi izbaroja prebiotiku MOS devā 4 g d⁻¹ uz katru teļu un novēroja būtisku spurekļa satura pH paaugstināšanos, salīdzinot ar kontroles grupas teļiem. Arī izbarojot šo prebiotiku devās 3 g un 6 g, tika panākti līdzīgi rezultāti. Savukārt pretēji rezultāti iegūti *in vitro* pētījumā, kurā tika izmantots inulīns, kas iegūts no topinambūra pulvera. Tika novērots, ka šī prebiotika būtiski neietekmēja spurekļa satura pH (Öztürk, 2008). Arī citā *in vitro* pētījumā iegūti līdzīgi rezultāti un secināts, ka prebiotika inulīns būtiski neietekmē spurekļa satura pH (Umucalilar et al., 2010).

Ja topinambūra koncentrāts ar tā sastāvā esošo prebiotiku inulīnu spurekļa iekšējās vides pH uzturēja augstā līmenī, tad pētījuma rezultāti par sinbiotiku bija pilnīgi pretēji. Iekšējās vides pH mērījums spureklī *atrium ruminis* apvidū CoG grupas teļiem bija tuvu neitrālam 7.1 ± 0.12 pH vienības un būtiski augstāks nekā SynG grupas teļiem, kuriem spurekļa satura reakcija šajā apvidū bija izteikti skāba 4.7 ± 0.15 pH vienības, $p = 0.003$. Līdzīga situācija tika novērota spurekļa ventrālajā maisā – SynG grupas teļiem pH 4.8 ± 0.30 pH vienības, kas bija būtiski zemāks nekā CoG grupas teļiem pH 7.1 ± 0.10 pH vienības, $p < 0.001$. Arī PreG grupas teļu spurekļa pH rezultāti bija būtiski augstāki nekā SynG grupas teļiem, $p \leq 0.001$ (3.tabula).

3.tabula/ Table 3

Barības piedevu ietekme uz iekšējās vides pH spureklī/ Effect of feed additives on pH of internal environment in the rumen

Mērījuma veikšanas vieta/ <i>Place of measurement</i>	pH ($\bar{x} \pm SD$) grupā/ pH ($\bar{x} \pm SD$) in <i>group</i>			p-vērtība ANOVA/ <i>p-value</i> ANOVA
	CoG	PreG	SynG	
Spurekļa priekštelas apvidū/ <i>Rumen atrium ruminis</i>	7.1 ± 0.12^{ab}	7.5 ± 0.85^b	4.7 ± 0.15^c	0.001
Spureklis ventrālajā maisā/ <i>Rumen ventral sac</i>	7.1 ± 0.10^{ab}	7.5 ± 0.60^b	4.8 ± 0.30^c	<0.001

^{a-c} Vidējie vienā līnijā bez kopīgiem burtiem ir būtiski atšķirīgi/^{a-c} Means within a row without common superscripts are significantly different

Pētījumā SynG grupas teļu spurekļa satura pH iegūtie rezultāti bija ļoti pārsteidzoši. Tie bija izteikti zemi, jo, iespējams, pirms dzīvnieku kaušanas tie tika pārāk ilgi badināti un spureklī pieauga gaistošo taukskābju daudzums, vai arī teļiem ilgstoši tika liegta pieeja ūdenim un bija samazināts producēto siekalu daudzums. Siekalām piemīt buferespējas un tās spēj samazināt spureklī esošo skābes līmeni. SynG grupas teļiem pH mutes dobumā 7.6 ± 0.21 bija būtiski zemāks nekā PreG grupas teļiem 8.6 ± 0.35 , $p=0.008$.

Par spurekļa satura pH samazināšanos, izbarojot raugu *S.cerevisiae*, ziņo arī citi pētnieki. Sešdesmit dienu garā pētījumā ar 36 Holšteinas šķirnes govīm, kurām izbaroja raugu *S.cerevisiae* (celms 47) devās 2 g, 4 g, 6 g, 8 g un 10 g d^{-1} uz dzīvnieku, autori secināja, ka visiem eksperimenta grupu dzīvniekiem spurekļa satura pH bija būtiski ($p < 0.01$) zemāks nekā kontroles grupas dzīvniekiem (piemēram, grupai, kurai izbaroja 6 g raugu pH bija 6.11 ± 0.01 , bet kontroles grupai 6.3 ± 0.10 pH vienības), bet savstarpējās eksperimenta grupu pH atšķirības nebija būtiskas, $p > 0.05$ (Doležal et al., 2005).

Lai arī iepriekš minētajā pētījumā autori ieguvuši pārliecinošus rezultātus, ka raugs samazina spurekļa satura pH, tomēr vairākos pētījumos ir novērots, ka raugs *S.cerevisiae* paaugstina spurekļa iekšējās vides pH. Pētījumā ar Holšteinas šķirnes govīm, kurām 3 nedēļas izbaroja 3 g dzīvo raugu (BIOSAF Sc 47) autori novēroja, ka tām govīm, kurām izbaroja raugu spurekļa satura pH bija būtiski augstāks, nekā kontroles grupas govīm, $p < 0.001$, attiecīgi rauga grupai pH bija 5.9 – 6.7 (vidēji 6.26), bet kontroles grupas govīm pH variēja robežās no 5.90 līdz 6.60 (vidējais pH bija 6.16). (Křížová et al., 2011). Citā pētījumā ar 20 teļiem, kuriem 3 mēnešus izbaroja 5 g *S.cerevisiae* rauga celmu 1026 autori novēroja, ka probiotikas grupas teļiem spurekļa satura pH bija būtiski augstāks 6.53 ± 0.06 nekā kontroles grupas teļiem 6.1 ± 0.15 pH vienības, $p < 0.05$ (Eladawi et al., 2020).

Chaucheyras ar kolēģiem (1996) *in vitro* pētījumā novēroja, ka *S.cerevisiae* spēja nomākt *Streptococcus bovis* baktērijas, kas savai augšanai izmanto cukurus, jo rauga šūnām bija augstāka piesaistīšanās spēja pie cukuriem. Tādējādi samazinājās brīvi pieejamo fermentējamo substrātu daudzums, kas nepieciešams baktēriju augšanai un līdz ar to samazinājās producētā laktāta daudzums un stabilizējās spurekļa iekšējās vides pH. Pie līdzīgiem secinājumiem nonākuši arī citi autori (Bach et al., 2007). Jau pieminētais pētnieks Chaucheyras ar kolēģiem (1996) novēroja, ka *S.cerevisiae* stimulē arī celulolītisko baktēriju populācijas palielināšanos, kas arī palīdz uzturēt augstāku spurekļa pH.

Promocijas darba pētījumā novērots, ka lokzarnas vidusdaļā pH gan PreG grupas teļiem 6.5 ± 0.38 , gan CoG grupas teļiem 6.0 ± 0.12 bija būtiski augstāks nekā SynG grupas teļiem 5.3 ± 0.15 (attiecīgi $p=0.044$ un $p=0.002$). Pētījumā novērots arī, ka gan tukšās zarnas vidusdaļā, gan lokzarnas vidusdaļā prebiotikas grupas teļiem pH bija nedaudz augstāks nekā kontroles grupas teļiem, bet atšķirība nebija būtiska, $p > 0.05$ (4.tabula).

Intralumenālais pH zarnās/ Intraluminal pH in the intestines

Mērījuma veikšanas vieta/ <i>Place of measurement</i>	pH ($\bar{x}\pm SD$) grupā/ <i>pH ($\bar{x}\pm SD$) in group</i>			p-vērtība ANOVA/ <i>p-value</i> ANOVA
	CoG	PreG	SynG	
Tukšās zarnas vidusdaļa/ <i>Middle part of jejunum</i>	6.3±0.15 ^a	7.0±0.70 ^a	6.0±0.06 ^a	0.070
Lokzarnas vidusdaļa/ <i>Middle part of colon</i>	6.0±0.12 ^{ab}	6.5±0.38 ^b	5.3±0.15 ^c	0.003

^{a-c} Vidējie vienā līnijā bez kopīgiem burtiem ir būtiski atšķirīgi/ ^{a-c} Means within a row without common superscripts are significantly different

Citu autoru pētījumus par prebiotiku, probiotiku un sinbiotiku ietekmi uz atgremotāju zarnu satura pH mums atrast neizdevās. Tomēr šādi pētījumi veikti citām dzīvnieku sugām. Tzortzis ar līdzautoriem (2005) ziņoja, ka prebiotika inulīns devā 40g kg⁻¹, kas pievienots pie cūku barības 33 – 35 dienu garā eksperimentā, būtiski palielināja *Bifidobacterium* daudzumu, palielināja acetetiķskābes līmeni un samazināja zarnu satura pH, salīdzinot ar kontroles grupu. Šie rezultāti sakrīt ar Juskiewicz un viņa kolēģu (2006) ziņoto. Pētnieki novēroja zarnu satura pH samazināšanos tītariem, kuriem 8 nedēļas izbaroja 2% FOS. Savukārt Uyeno ar kolēģiem (2015) apgalvo, ka probiotikas liellopiem samazina patogēnu vairošanos zarnās, samazina satura pH un uzlabo zarnu gļotādas imunitāti.

2.5. Topinambūra koncentrāta un tā sinbiotikas ar raugu izbarošanas ietekme uz gremošanas kanāla atsevišķu daļu attīstību teļiem 13 – 14 nedēļu vecumā

Pārejas periods no piena izbarošanas uz tilpumainās barības izbarošanu teļu dzīvē ir saistīts ar dažādām fizioloģiskām un morfoloģiskām izmaiņām gremošanas kanālā. Tajā notiek straujas mikrobiālas un strukturālas pārmaiņas (Meale et al., 2017). Dažādas barības piedevas var ietekmēt gan atgremotāju kuņģa, gan zarnu dažādu struktūru attīstību.

Promocijas pētījuma ietvaros tika novērots, ka ne topinambūra koncentrāts ar tā sastāvā esošo prebiotiku inulīnu, ne arī topinambūra koncentrāts kombinācijā ar raugu *S.cerevisiae* (celms 1026), būtiski neietekmēja kopējo kuņģa masu, priekškuņģu un glumenieka masu, $p>0.05$. Vislielākā visa kuņģa masa bija PreG teļiem 4.4±0.4 kg, bet vismazākā SynG grupas teļiem 3.6±0.22 kg, bet CoG grupas teļiem 3.9±0.53 kg. Arī priekškuņģu masa (aceknis, spureklis un grāmatnieks) vislielākā bija PreG grupas teļiem 3.7±0.3 kg, nedaudz mazāka CoG grupas teļiem 3.2±0.39 kg un vismazākā SynG grupas teļiem 2.9±0.38 kg.

Savukārt glumenieka masa CoG grupas teļiem un PreG grupas teļiem bija attiecīgi 0.6 ± 0.14 kg un 0.6 ± 0.1 kg, bet SynG grupas teļiem 0.7 ± 0.16 kg.

Pētījumā tika novērots, ka arī visa kuņģa, priekškuņģu un glumenieka relatīvā masa attiecībā pret teļu ķermeņa masu būtiski neatšķīrās starp grupām, $p > 0.05$ (5.tabula). Pie līdzīgiem secinājumiem nonācis arī Xiao ar kolēģiem (2016), kas savā pētījumā ar teļiem, kuri 52 dienas saņēma *S.cerevisiae* fermentācijas produktus devās 0.5% un 1% no sausnes, novēroja, ka šī piedeva būtiski neietekmēja spurekļa, acekņa, grāmatnieka un glumenieka masu.

5.tabula/ Table 5

Topinambūra koncentrāta un tā sinbiotikas ar raugu 56 dienas ilgas izbarošanas ietekme uz dažādu kuņģa nodalījumu relatīvo masu (% no dzīvmasas) 13 – 14 nedēļas veciem teļiem/ Effect of 56 days feeding of Jerusalem artichoke concentrate and its synbiotic with yeast on the relative weight (% of live weight) of different stomach compartments in 13 – 14-week-old calves

Izmeklētais orgāns/ <i>Investigated organ</i>	Relatīvā masa (% , $\bar{x} \pm SD$) grupā/ <i>Relative weight (% , $\bar{x} \pm SD$) in the group</i>			p-vērtība, ANOVA/ <i>p-value, ANOVA</i>
	CoG	PreG	SynG	
Viss kuņģis/ <i>Whole stomach</i>	3.5 ± 1.17	3.4 ± 0.23	3.0 ± 0.37	0.505
Priekškuņģi/ <i>Forestomach</i>	2.9 ± 0.93	2.9 ± 0.19	2.4 ± 0.47	0.669
Glumenieks/ <i>Abomasum</i>	0.6 ± 0.25	0.5 ± 0.04	0.6 ± 0.10	0.412

Promocijas darba pētījumā aprēķinātais procentuālais glumenieka apjoms no kopējā kuņģa apjoma PreG grupas teļiem bija 14.6%, SynG grupas teļiem 19.8% un CoG grupas teļiem 16.2%. Bet priekškuņģu procentuālais apjoms no kopējā kuņģa apjoma PreG grupas teļiem bija 85.4%, SynG grupas teļiem 80.2% un CoG grupas teļiem 83.8%. Šīs atšķirības starp grupām nebija statistiski būtiskas, $p > 0.05$. Iegūtie rezultāti ir ļoti līdzīgi tiem, kādus novērojuši vairāki pētnieki 12 – 16 nedēļu veciem teļiem. Šī vecuma teļiem priekškuņģi aizņēma 85% no kopējā kuņģa apjoma, bet glumenieks attiecīgi 15% (Diao et al., 2017). Var secināt, ka promocijas darbā izmantotās barības piedevas būtiski neietekmēja normālu anatomisku teļu kuņģa nodalījumu attīstību.

Zinātniskajās publikācijās ir pieejama pretrunīga informācija par rauga *S.cerevisiae* ietekmi uz strukturālo un funkcionālo spurekļa attīstību. Mūsu promocijas darba pētījumā tika konstatēts, ka gan sinbiotika, gan arī prebiotika pozitīvi ietekmēja spurekļa kārpiņu attīstību. Prebiotikas grupas teļiem tika novēroti labāki rezultāti spurekļa *saccus dorsalis* apvidus kārpiņu platumā $Me=344$, IQR 312 – 431 μm , salīdzinot ar kontroles grupas teļiem $Me=282$,

IQR 246 – 341 μm , $p < 0.001$, bet spurekļa *saccus ventralis* apvidū prebiotikas grupai tika novērotas garākas un platākas kārpiņas, salīdzinot ar kontroles grupas teļiem, tomēr šīs atšķirības nebija būtiskas, $p > 0.05$ (6.tabula).

Sinbiotikas grupas teļiem spurekļa *saccus dorsalis* kārpiņu platums $\text{Me}=371$, IQR 310 – 475 μm bija būtiski lielāks nekā kontroles grupas teļiem $\text{Me}=282$, IQR 246 – 341 μm , $p < 0.001$ un spurekļa *saccus ventralis* kārpiņu garums $\text{Me}=1647$, IQR 1304 – 2203 μm bija būtiski lielāks nekā kontroles grupas teļiem $\text{Me}=1113$, IQR 850 – 1578 μm , $p < 0.001$. Šie rezultāti ir līdzīgi tiem, kas iegūti 5 nedēļu garā eksperimentā, kurā tika izmantoti rauga *S.cerevisiae* fermentācijas produkti devās 1 g uz teļu dienā un 3.5 g uz teļu dienā. Pētnieki teļu spureklī novēroja garākas un platākas kārpiņas (Brewer et al., 2014). Šie novērojumi sakrīt ar rezultātiem, par kuriem ziņojis Xiao ar kolēģiem (2016), veicot 52 dienas garu eksperimentu, kurā tika izmantoti *S.cerevisiae* fermentācijas produkti devās 0.5% un 1%. Turklāt tiem teļiem, kuriem izbaroja *S.cerevisiae*, autori novēroja arī kriptu dziļuma samazināšanos tukšajā zarnā.

Promocijas darba pētījuma sinbiotikas grupas teļiem tika novērots, ka gan spurekļa *saccus dorsalis*, gan spurekļa *saccus ventralis* apvidos kārpiņu garums bija būtiski lielāks, nekā teļu grupai, kura saņēma tikai topinambūra koncentrātu ar tā sastāvā esošo prebiotiku inulīnu, liekot domāt, ka *S.cerevisiae* rauga celma 1026 pievienošana pie topinambūra koncentrāta potenciāli varētu paātrināt spurekļa kārpiņu attīstību. Iegūtie rezultāti ir pretēji Magalhães un viņa kolēģu (2008) ziņotajam, kas 70 dienu garā eksperimentā, teļiem izbarojot rauga kultūru (2% no sausnes) un nenovēroja nekādas būtiskas izmaiņas spurekļa attīstībā. Līdzīgus rezultātus novēroja arī Kaldmae ar kolēģiem (2008). Pētnieki nenovēroja nekādas būtiskas atšķirības teļu spurekļa kārpiņu garumā un platumā, kā arī spurekļa sienas biezumā viena un divu mēnešu vecumā, 2 mēnešus izbarojot *S.cerevisiae* devā 2% no sausnes.

Četrdesmit divu dienu garā pētījumā novērots, ka 2% rauga kultūra tikai nedaudz uzlaboja teļiem spurekļa attīstību (Lesmeister, 2004). Šajā pētījumā autori novēroja, ka probiotikas grupas teļiem bija garākas un platākas spurekļa kārpiņas, tomēr šīs izmaiņas nebija būtiskas, salīdzinot ar kontroles grupas teļiem.

Promocijas darba pētījumā tika novērots, ka spurekļa *saccus dorsalis* un *saccus ventralis* epitēlija pārragotās kārtas (*stratum corneum*) biezums bija būtiski mazāks kontroles grupas teļiem (abos apvidos $\text{Me}=9$, IQR 7 – 12 μm), salīdzinot ar SynG (attiecīgi $\text{Me}=17$, IQR 14 – 22 μm un $\text{Me}=25$, IQR 15 – 32 μm) un PreG grupu teļiem (attiecīgi $\text{Me}=33$, IQR 24 – 38 μm un $\text{Me}=29$, IQR 24 – 36 μm), $p < 0.001$ (6.tabula). Šī spurekļa gļotādas slāņa šūnu citoplazmā atrodas liels daudzums keratīna, kas darbojas kā fizikāla barjera un samazina gaistošo taukskābju transportu uz dziļākajiem epitēlija slāņiem (Hinders, Owen, 1965). Kā arī pētījumā tika novērots, ka kopējais spurekļa epitēlija slāņa biezums bija būtiski mazāks CoG grupas teļiem, nekā SynG un PreG grupu teļiem, $p < 0.001$. Pilnīgi pretēji rezultāti par epitēlija pārragotās kārtas (*stratum corneum*)

un kopējo spurekļa epitēlija biezumu tika iegūti pētījumā ar aitām. Šajā pētījumā pie barības 42 dienas tika pievienots raugs *S.cerevisiae* devā 2 g uz kg sausnes, MOS devā 2 g uz kg sausnes un abu šo piedevu kombinācija tādā pašā devā, un novēroja, ka MOS un sinbiotikas grupas aitām bija plānāks *stratum corneum* spureklī, salīdzinot ar kontroles grupu, $p<0.01$. Kopējais spurekļa epitēlija biezums bija mazāks tām aitām, kuras saņēma MOS, salīdzinot ar grupu, kura saņēma *S.cerevisiae* barības piedevu, $p<0.03$, bet šīs piedevas neietekmēja spurekļa kārpiņu platumu (Diaz et al., 2018).

6.tabula/ Table 6

Pētījumā iekļauto barības piedevu izbarošanas ietekme uz spurekļa kārpiņu un epitēlija dažādu histoloģisko parametru lielumu 13–14 nedēļas veciem teļiem/ Effect of feeding of feed additives on the various histological parameters of rumen papillae and epithelium in 13 – 14-week-old calves

Parauga iegūšanas vieta/ Place of sampling	Parametrs (µm)/ Parameter (µm)	Pētījuma grupa/ Group of the study						p- vērtība K-W tests/ p-value K-W test
		CoG		PreG		SynG		
		Me	Q1-Q3	Me	Q1-Q3	Me	Q1-Q3	
Spureklis saccus dorsalis/ Rumen saccus dorsalis	Kārpiņu garums/ The length of papillae	1016 ^{ac}	765-1692	899 ^b	668-1098	1033 ^c	764-1525	0.004
	Kārpiņu platums/ The width of papillae	282 ^a	246-341	344 ^{bc}	312-431	371 ^c	310-475	<0.001
	Spurekļa epitēlija biezums/ The thickness of ruminal epithelium	77 ^a	66-86	122 ^b	101-171	153 ^c	123-176	<0.001
	<i>stratum corneum</i> biezums/ The thickness of <i>stratum corneum</i>	9 ^a	7-12	17 ^b	14-22	33 ^c	24-38	<0.001

6.tabulas turpinājums/ Continuation of table 6

Parauga iegūšanas vieta/ Place of sampling	Parametrs (µm)/ Parameter (µm)	Pētījuma grupa/ Group of the study						P- vērtība K-W tests/ p-value K-W test
		CoG		PreG		SynG		
		Me	Q1- Q3	Me	Q1- Q3	Me	Q1- Q3	
Spureklis saccus ventralis/ Rumen saccus ventralis	Kārpiņu garums/ The length of papillae	1113 ^{ab}	850-1578	1359 ^b	831-2036	1647 ^c	130-2203	<0.001
	Kārpiņu platums/ The width of papillae	334 ^a	275-395	346 ^a	270-413	322 ^a	287-377	0.861
	Spurekļa epitēlija biezums/ The thickness of ruminal epithelium	97 ^a	72-127	129 ^{bc}	99-177	120 ^c	102-164	<0.001
	stratum corneum biezums/ The thickness of stratum corneum	9 ^a	7-12	25 ^{bc}	15-32	29 ^c	24-36	<0.001

^{a-c} Vidējie vienā rindā bez kopīgiem burtiem ir būtiski atšķirīgi/ ^{a-c} Means within a row without common superscripts are significantly different

Promocijas darba pētījumā tika novērots, ka glumenieka gļotāda kardiālo dziedzeru zonā bija būtiski biežāka SynG Me=610, IQR 585 – 642 µm un PreG grupu teļiem Me=571, IQR 544 – 591 µm, nekā CoG grupas teļiem Me=510, IQR 472 – 558 µm, p<0.001, kā arī savstarpēji salīdzinot pētījuma grupas, tika novērots, ka SynG grupas teļiem gļotādas biezums šajā zonā bija būtiski lielāks nekā PreG grupas teļiem, p<0.001.

Gļotādas biezums fundālo dziedzeru zonā SynG grupas teļiem Me=673, IQR 632 – 752 µm bija būtiski lielāks nekā CoG grupas teļiem Me=581, IQR 515 – 657 µm un PreG grupas teļiem Me=620, IQR 575 – 660 µm, p<0.001.

Glumenieka gļotādas biezums pilorisko dziedzeru zonā PreG grupas teļiem Me=912, IQR 852 – 1100 µm bija būtiski lielāks nekā CoG grupas teļiem Me=834, IQR 787 – 896 µm un SynG grupas teļiem Me=854, IQR 792 – 900 µm, p<0.001 (7.tabula). Tātad, gan topinambūra koncentrāts, gan arī šī barības piedeva kombinācijā ar *S.cerevisiae* rauga celmu 1026, veicināja glumenieka sienas biezuma palielināšanos un palīdz pasargāt glumenieka sienīņu no kuņģa skābes negatīvās ietekmes.

7.tabula/ Table 7

Barības piedevu izbarošanas ietekme uz glumenieka dziedzeru zonu gļotādas biezumu 13 – 14 nedēļas veciem teļiem/ Effect of feeding feed additives on mucosal thickness of abomasal gland zones in 13 – 14 week old calves

Glumenieka dziedzeru zona / The glandular zone of abomasum	Gļotādas biezums vidēji grupā (µm)/ The mean mucosal thickness in the group (µm)						p- vērtība K-W tests/ p-value K-W test
	CoG		PreG		SynG		
	Me	Q1-Q3	Me	Q1-Q3	Me	Q1-Q3	
Glumenieks kardiālo dziedzeru zona/ <i>Abomasum cardiac gland zone</i>	510 ^a	472-558	571 ^b	544-591	610 ^c	585-642	<0.001
Glumenieks fundālo dziedzeru zona/ <i>Abomasum fundic gland zone</i>	581 ^a	515-657	620 ^{ab}	575-660	673 ^c	632-752	<0.001
Glumenieks pilorisko dziedzeru zona/ <i>Abomasum pyloric gland zone</i>	834 ^a	787-896	912 ^b	852-1100	854 ^{ac}	792-900	<0.001

^{a-c} Vidējie vienā līnijā bez kopīgiem burtiem ir būtiski atšķirīgi/^{a-c} Means within a row without common superscripts are significantly different

Ir pieejams neliels daudzums informācijas par rauga *S.cerevisiae* ietekmi uz gremošanas procesiem zarnās un zarnu attīstību atgremotājiem. Iespējams tādēļ, ka tiek uzskatīts, ka rauga kultūras pamatā savu darbību veic spureklī. Pētījumā ar aitām Durand-Chaucheyras ar līdzautoriem (1998) novēroja, ka rauga šūnas paliek dzīvas arī zarnās, kas liek domāt, ka rauga ietekme varētu izpausties arī citās gremošanas kanāla daļās, ne tikai spureklī.

Promocijas darba pētījumā tika novērotas būtiskas atšķirības starp sinbiotikas un kontroles grupu teļiem tādos parametros kā visas zarnu sienīņas biezums divpadsmitpirkstu, tukšās, gūžas un lokzarnas vidusdaļā un gļotādas biezumā (bārkstiņu garums un kriptu dziļums) tukšās zarnas vidusdaļā un kriptu dziļumā lokzarnā. Visi šie parametri bija būtiski lielāki teļiem no sinbiotikas grupas. Par

rauga darbību zarnās liecina arī citi pētījumi, piemēram, Xiao un viņa kolēģu (2016) veiktajā pētījumā, kurā teļiem 52 dienas izbaroja *S.cerevisiae* fermentācijas produktus devās 0.5% un 1% no sauses. Pētnieki šiem teļiem novēroja garākas bārkstīņas divpadsmitpirkstu, tukšajā un gūžas zarnā, kā arī mazāku kriptu dziļumu tukšajā zarnā (8.tabula).

8.tabula/ Table 8

Barības piedevu 56 dienu ilgās izbarošanas ietekme uz zarnu atsevišķu histoloģisko parametru attīstību 13 – 14 nedēļas veciem teļiem/ Effect of 56-day feeding of feed additives on the development of certain intestinal histological parameters in 13- to 14-week-old calves

Parauga iegūšanas vieta/ Place of sampling	Parametrs (µm)/ Parameter (µm)	Pētījuma grupa/ Group of the study						p-vērtība K-W tests/ p-value K-W test
		CoG		PreG		SynG		
		Me	Q1-Q3	Me	Q1-Q3	Me	Q1-Q3	
Divpadsmitpirkstu zarnas vidus/ middle part of duodenum	Glotādas biežums (bārkstīņas un kriptas)/ The thickness of mucosa (villi+crypts)	917	799-1066	929	819-1093	952	874-1048	0.628
	Visas sienas biežums/ The thickness of the whole wall	1595 ^a	1513-1665	1981 ^{bc}	1800-2029	2042 ^c	1922-2125	<0.001
Tukšās zarnas vidus/ The middle part of jejunum	Glotādas biežums (bārkstīņas un kriptas)/ The thickness of mucosa (villi and crypts)	1647 ^a	1157-2320	2234 ^{bc}	1740-2455	2346 ^c	1815-2635	<0.001
	Visas sienas biežums/ The thickness of the whole wall	2412 ^a	1931-2858	3154 ^{bc}	2967-3550	3197 ^c	2935-3579	<0.001

8.tabulas turpinājums/ Continuation of table 8

Parauga iegūšanas vieta/ <i>Place of sampling</i>	Parametrs (µm)/ <i>Parameter (µm)</i>	Pētījuma grupa/ <i>Group of the study</i>						p-vertība K-W tests/ <i>p-value K-W test</i>
		CoG		PreG		SynG		
		Me	Q1-Q3	Me	Q1-Q3	Me	Q1-Q3	
Tukšās zarnas beigas/ <i>The end part of jejunum</i>	Gļotādas biezums (bārkstīpas un kriptas)/ <i>The thickness of mucosa (villi+crypts)</i>	1216	114-1414	1193	107-1363	1211	110-1326	0.641
	Visas sienas biezums/ <i>The thickness of the whole wall</i>	1907	175-4199	2162	192-2728	2580	225-3111	0.165
Gūžas zarnas vidus/ <i>The middle part of ileum</i>	Gļotādas biezums (bārkstīpas un kriptas)/ <i>The thickness of mucosa (villi and crypts)</i>	1632 ^a	155-1777	2983 ^{bc}	241-3581	2889 ^c	174-3259	<0.001
	Visas sienas biezums/ <i>The thickness of the whole wall</i>	969 ^{ac}	895-1023	1601 ^b	140-1855	1073 ^c	953-1217	<0.001
Lokazarnas vidus/ <i>The middle part of colon</i>	Kriptu dziļums/ <i>The crypt depth</i>	612 ^{ab}	566-671	659 ^b	618-721	764 ^c	729-799	<0.001
	Visas sienas biezums/ <i>The thickness of the whole wall</i>	1371 ^{ab}	123-1481	1325 ^b	128-1423	1758 ^c	166-1935	<0.001

^{a-c} Vidējie vienā līnijā bez kopīgiem burtiem ir būtiski atšķirīgi/^{a-c} Means within a row without common superscripts are significantly different

Līdzīgi rezultāti tika novēroti pētījumā ar sivēniem. Autori ziņoja, ka tiem sivēniem, kuriem 21 dienu izbaroja *S.cerevisiae* fermentācijas produktus devā 5 g kg⁻¹, tukšās zarnas bārkstiņu garums bija lielāks nekā kontroles grupas dzīvniekiem (Shen et al., 2009). Pētījumā ar broileriem, kurā 42 dienas izbaroja *S.cerevisiae* fermentācijas produktus devās 2.5 g, 5 g un 7.5 g kg⁻¹, tika novērots, ka pētījuma grupu broileriem bija garākas divpadsmitpirkstu zarnas bārkstiņas, bet kriptu dziļums divpadsmitpirkstu, tukšajā un gūžas zarnā bija vismazākais tiem broileriem, kuriem izbaroja 2.5 g probiotiku, salīdzinot ar kontroles grupu un abām pārējām probiotikas devu grupām, bet vislielākais kriptu dziļums tika novērots grupai, kurai izbaroja 7.5 g *S.cerevisiae* rauga kultūras piedevu (Gao et al., 2008).

Promocijas darba pētījumā iegūti rezultāti, ka divpadsmitpirkstu, tukšās un gūžas zarna vidusdaļas visas zarnas sienīgas biežums (bārkstiņu garums un kriptu dziļums), kā arī gļotādas biežums tukšās un gūžas zarnas vidusdaļā bija būtiski lielāks prebiotikas grupā, nekā kontroles grupā. Ir publicēti vairāku pētījumu rezultāti par prebiotikas inulīna ietekmi uz zarnu morfoloģiskajām izmaiņām. Pētījumā, kurā izmantoja inulīnu, tika novērota līdzīga ietekme uz zarnām kā mūsu promocijas darba pētījumā. Pētījums tika veikts ar broileriem, kuriem 5 nedēļas izbaroja 1% inulīnu un tika novērots, ka šī piedeva būtiski palielina tukšās zarnas bārkstiņu garumu, kā arī inulīna grupai novēroja dziļākas kriptas (Rehman et al., 2007). Šo pozitīvo prebiotiku ietekmi uz tievās un resnās zarnas gļotādas augšanu un attīstību varētu izskaidrot ar poliamīnu sintēzi no prebiotikām, kas ir būtiski nepieciešams zarnu attīstībai (Dzelzenne et al., 2000) vai ar inulīna fermentāciju, kas nodrošina īso ķēžu taukskābju producēšanu. Šīs skābes var veicināt šūnu proliferāciju tievajā un resnajā zarnā un rezultātā palielinās bārkstiņu garums un kriptu dziļums (Samal, Behura, 2015). Tomēr pretēji rezultāti novēroti vairākos citos pētījumos. Masanetz ar kolēģiem (2010) ziņoja, ka 20 nedēļu garā eksperimentā ar teļiem, kuriem izbaroja 2% prebiotiku inulīnu, tukšās un gūžas zarnas bārkstiņu garums bija mazāks, nekā kontroles grupas teļiem. Šie rezultāti sakrīt ar tiem, ko ziņojis Pierce ar kolēģiem (2005). Autori novēroja līdzīgu bārkstiņu garuma samazināšanos pēc inulīna 28 dienu ilgās pievienošanas pie sivēnu barības devā 15 g kg⁻¹.

Zarnu morfoloģiskā attīstība būtībā parāda visa dzīvnieka gremošanas kanāla veselības stāvokli. Barības vielu uzsūkšanas apjoms samazinās līdz ar zarnu bārkstiņu garuma samazināšanos (Anonymous, 1999). Jaunās epitēlija šūnas tiek producētas zarnu gļotādas kriptās un migrē pa zarnu bārkstiņu līdz tās apikālajam galam (Schat, Myers, 1991), tādēļ kriptas tiek uzskatītas par bārkstiņu “fabriku”. Dziļākas kriptas var norādīt uz ātrāku šūnu nomaiņu, lai notiktu veiksmīga bārkstiņu atjaunošana. Tas ir saimniecorganisma zarnu atbildes mehānisms, kas mēģina kompensēt fizioloģisko bārkstiņu nomaiņu un patoloģisko bārkstiņu atrofiju, kas rodas no patogēnu un to toksīnu radītajiem iekaisumiem. Garākas bārkstiņas norāda uz vairāk nobriedušu epitēliju un uzlabotām uzsūkšanas spējām palielinātās bārkstiņu uzsūkšanas virsmas dēļ. Garākas bārkstiņas

palielina arī to apikālajā galā sekretēto enzīmu aktivitāti, kā rezultātā uzlabojas barības vielu sagremojamība (Anonymous, 1999; Newbold et al., 1996).

2.6. Topinambūra koncentrāta ar tā sastāvā esošo prebiotiku inulīnu un *S.cerevisiae* rauga celma 1026 izbarošanas ietekme uz metanogēnajiem mikroorganismiem un spureklī producētā CH₄ un CO₂ daudzumu teļiem

Metanogēnēze ir fizioloģisks process, kura rezultātā tiek producēts metāns galvenokārt no ogļhidrātu hidrolīzes (Kristensen et al., 2011; Johnson, Johnson, 1995). Enterālo CH₄ producē metanogēnie mikroorganismi, kas pieder pie domēna *Archaea*, tipa *Euryarchaeota* (Balch et al., 1979). Atgremotājiem metanogēnēze pamatā norit spureklī, mazākā mērā resnajā zarnā (Muñoz et al., 2012).

Kopumā spureklī novēro plašu mikroorganismu daudzveidību, kuru pamatā veido dažādi prokarioti, eikarioti un vairākas metanogēnu sugas (Kumar et al., 2009; Guo et al., 2005). Biežāk sastopamā metanogēnu ģints liellopu spureklī ir *Methanobrevibacter* (Henderson et al., 2015; Leahy et al., 2013). Wright ar kolēģiem (2007) liellopiem kā galvenās metanogēnu sugas spureklī identificēja *Methanobrevibacter ruminantium*, *Methanobrevibacter thaueri*, *Methanobrevibacter smithii* un *Methanosphaera stadtmanae*. Šī pētījuma rezultāti bija līdzīgi Whitford un viņa kolēģu (2001) izpētītajam, tomēr pētnieki novēroja, ka *M.ruminantium* bija visbiežāk sastopamā metanogēnu suga, kurai sekoja *M.stadtmanae*.

Metanogēni producē CH₄ anaerobos apstākļos (Guo et al., 2005). Piemēram, *M.smithii* producē CH₄ no CO₂, H₂ un formiāta, bet *M.stadtmanae* CH₄ producē tikai pārveidojot metanolu kopā ar H₂ (Carberry et al., 2014). Govju spureklī kā noteicošie CH₄ producētāji tiek minēti atsevišķi *Methanobrevibacter* ģints metanogēni (*M.smithii*, *Methanobrevibacter gottschalkii*, *Methanobrevibacter millerae* un *M.thaueri*) (Danielsson et al., 2014).

Promocijas darba pētījumā novērots, ka kopējo prokariotu (t.i., baktēriju un metanogēnu) un kopējo metanogēnu sastopamības biežums teļu spurekļa šķidrumā būtiski atšķīrās starp grupām. Bet kopējo prokariotu un kopējo metanogēnu sastopamības biežums fekālijās, kā arī atsevišķu metanogēnu sugu *M.stadtmanae*, *M.ruminantium* un *M.smithii* sastopamības biežums teļu spurekļa šķidrumā būtiski neatšķīrās starp grupām, p>0.05.

Novērots, ka SynG grupas teļiem, kuriem kopā ar inulīnu saturošo topinambūra koncentrātu izbaroja arī raugu *S.cerevisiae*, kopējo prokariotu (baktērijas un metanogēni) daudzums spureklī bija būtiski mazāks, salīdzinot ar PreG teļiem, p=0.004, kā arī tas bija zemāks nekā CoG teļiem (9.tabula).

Prebiotikas un sinbiotikas izbarošanas ietekme uz analizēto praimeru sekvenču daudzumu 13 – 14 nedēļu vecu teļu spurekļa šķidrums un fekāliju paraugos/ Effect of prebiotic and synbiotic feeding on the amount of primer sequences analysed in rumen fluid and faecal samples from 13 – 14 week old calves

Praimeru sekvenču/ Primer sequence	Vidējais PCR ciklu daudzums grupā, (sekvenču daudzums), (n=15)/ Mean number of PCR cycles per group, (number of sequences), (n=15)					
	Spurekļa šķidrums, $\bar{x}\pm SD$ / Rumen fluid, $\bar{x}\pm SD$			Fekālijas (grupas kopparaugs)/ Faeces (group sample)		
	Grupās/Groups			Grupās/Groups		
	CoG	PreG	SynG	CoG	PreG	SynG
Kopējie prokarioti (baktērijas un metanogēni)/ Total prokaryotes (bacteria and methanogens)	10.5±0.84 ^{ab}	9.68±1.00 ^a	12.3±1.41 ^b	33.9	34.9	13.3
Kopējie metanogēni/ Total methanogens	31.5±1.75 ^{ab}	32.77±1.47 ^a	27.8±2.16 ^b	23.5	24.5	26.6
<i>Methanospaera stadmanae</i>	17.5±1.86	11.98±4.09	18.1±0.82	8.8	8.1	–
<i>Methanobrevibacter ruminantium</i>	18.3±5.41	24.96±4.65	22.7±0.71	17.0	13.4	19.4
<i>Methanobrevibacter smithii</i>	13.4±4.35	14.12±7.24	17.8±5.82	10.5	19.4	12.7

^{a-b} Vidējie vienā līnijā bez kopīgiem burtiem ir būtiski atšķirīgi/^{a-b} Means within a row without common superscripts are significantly different

Raugs *S.cerevisiae* teļiem ietekmē gremošanas kanāla mikrobiomu, piemēram, veicinot pienskābi utilizējošo baktēriju augšanu un aktivitāti spureklī (Jouany, 2001; Girard et al., 1993), kā arī ietekmē tā morfoloģisko attīstību (palielina kārpiņu garumu un platumu spureklī) (Brewer et al., 2014; Lesmeister et al., 2004), kā arī palielina kārpiņu skaitu uz vienu spurekļa laukuma vienību (Gäbel et al., 1991), bet divpadsmitpirkstu (*duodenum*), tukšajā (*jejunum*) un gūžas (*ileum*) zarnā palielina bārkstiņu garumu un samazina kriptu dziļumu visā tievajā zarnā (Xiao et al., 2016).

Ir publicēti vairāki pētījumi dažādām dzīvnieku sugām par barības piedevu ietekmi uz kopējo baktēriju un metanogēnu daudzumu gremošanas kanālā. Vairāki no tiem ir pretēji promocijas darba pētījumā iegūtajiem rezultātiem. SynG teļu grupas spurekļa šķidrums paraugos tika novērots būtiski lielāks

kopējo metanogēnu daudzums, salīdzinot ar prebiotikas grupu, $p=0.003$, kā arī tas bija lielāks nekā CoG telļiem. Šie rezultāti ir līdzīgi tiem, ko novērojis Ding ar kolēģiem (2014). Viņi novēroja, ka *S.cerevisiae* var palielināt spureklī kopējo baktēriju, sēņu un viensūņu daudzumu. Dawson ar līdzautoriem (1990) ziņoja, ka Džērsijas šķirnes liellopiem, kuriem izbaroja probiotiku *S.cerevisiae* (2.04×10^9 KVV g^{-1}) devā 1 g uz 1 kg barības 10 dienas, pieauga celulolītisko baktēriju skaits spureklī. Līdzīgi rezultāti novēroti arī Kumar un līdzautoru (1997) 6 nedēļu garajā pētījumā ar bifeļu telļiem, kuriem izbaroja 5 g *S.cerevisiae* celmu 1026. Interesantus rezultātus ieguvuši Agarwal ar kolēģiem (2002). Pētnieki veica eksperimentu ar jaundzimušiem telļiem, kuriem 24 nedēļas izbaroja *S.cerevisiae* NCDC-49, 10^6 KVV mL^{-1} , un secināja, ka probiotika neietekmēja spurekļa mikrobiālo populāciju. Ogunade ar līdzautoriem (2019) novēroja, ka raugs *S.cerevisiae* devā $15g d^{-1}$ palielināja CH_4 produkciju liellopiem 25 dienu garā eksperimentā, jo šo liellopu spureklī palielinājās *M.ruminantium* daudzums, kas tiek uzskatīta par vienu no galvenajām metānu producējošajām metanogēno mikroorganismu sugām liellopiem (Whitford et al., 2001). Citi autori ziņoja par pretējiem rezultātiem. Galindo ar līdzautoriem (2010) novēroja samazinātu metanogēnu daudzumu 24 h garā *in vitro* eksperimentā, kad tika pievienots *S.cerevisiae* raugs pie Bermuda zāles (*Cynodon nlemfuensis*), kas tika izmantota kā fermentācijas substrāts.

Promocijas darbā pētītās atsevišķās metanogēnu sugas būtiski neatšķīrās starp grupām, tomēr divas no tām – *M.stadmanae* un *M.smithii* bija sastopamas mazākā daudzumā SynG grupas telļu spurekļa šķidrumā nekā PreG un CoG grupas telļu spurekļa šķidrumā. Iespējams, ka palielināts kopējo metanogēnu daudzums SynG grupas telļiem varētu būt citu metanogēnu sugu dēļ, kas netika pētītas šī promocijas darba izstrādes ietvaros.

Fekāliju koproarugos kopējo prokariotu (t.i., baktēriju un metanogēnu), kopējo metanogēnu un atsevišķu metanogēnu sugu *M.stadmanae*, *M.ruminantium* un *M.smithii* sastopamības biežums starp grupām būtiski neatšķīrās, $p>0.05$.

Promocijas darba izstrādes laikā netika iegūti pārlicinoši rezultāti, ka izmantotais topinambūra koncentrāts ar tā sastāvā esošo prebiotiku inulīnu un šī koncentrāta kombinācija ar raugu *S.cerevisiae* ietekmē *Methanosphaera stadmanae*, *Methanobrevibacter ruminantium* un *Methanobrevibacter smithii* sugu sastopamības biežumu telļu spurekļa šķidrumā un fekālijās.

Metāna produkciju spureklī un resnajā zarnā viennozīmīgi ietekmē metanogēnie mikroorganismi un to daudzums. Šī gāze tiek minēta kā galvenā dzīvnieku gremošanas kanālā saražotā gāze, kas pastiprina siltumnīcas efekta negatīvo ietekmi uz vispasaules ekosistēmām. Kopējā antropogēnā CH_4 emisija no lauksaimniecības nozares sastāda aptuveni 47 – 56% (Shibata, Terada, 2010; Smith et al., 2007), 50 – 60% (Ellis et al., 2007) un tās galvenokārt nāk no lopkopības sektora. Daudzi pētnieki veikuši eksperimentus ar dažādu barības piedevu izmantošanu enterālā CH_4 produkcijas un emisijas samazināšanai. Ir ļoti

maz pieejamu pētījumu rezultātu par prebiotikas inulīna ietekmi uz CH₄ produkciju atgremotājiem. Šīs disertācijas pētījuma ietvaros tika pētīta 12 g topinambūra koncentrāta (inulīna saturs 6 g), kā arī sinbiotikas (*S.cerevisiae* rauga celms 1026 devā 5 g un topinambūra koncentrāts devā 12 g) ietekme uz CH₄ un CO₂ produkciju teļu spureklī.

Pētījumā konstatēts, ka teļu spureklī producētā CH₄ daudzums PreG grupai Me=802.09, IQR 708.65 – 1076.77 mg m⁻³ pētījuma beigās bija augstāks nekā CoG Me=792.06, IQR 755.06 – 873.59 mg m⁻³, tomēr šī atšķirība nebija būtiska, p>0.05 (10.tabula).

10.tabula/ Table 10

Prebiotikas un sinbiotikas izēdināšanas ietekme uz CH₄ daudzumu teļu spurekļa gāzē/ Effect of prebiotic and synbiotic on amount of CH₄ in calves's rumen gas

Testētā gāze/ Tested gas	Eksperimenta diena/ Day of the study	Producētais vidējais gāzes daudzums grupā (n=15; mg m ⁻³)/The mean amount of gas produced in the group (n=15; mg m ⁻³)						P-vērtība K-W tests/ p-value K-W test
		CoG		PreG		SynG		
		Me	Q1-Q3	Me	Q1-Q3	Me	Q1-Q3	
CH ₄	1.	811.50 ^a	107.87-870.45	773.87 ^b	721.82-1114.40	790.18 ^{ac}	442.75-1032.87	<0.001
	28.	1052.94 ^a	983.33-1111.89	847.25 ^{ab}	812.13-879.86	659.11 ^c	565.04-1015.32	<0.001
	56.	792.06 ^a	755.06-873.59	802.09 ^{ab}	708.65-1076.77	675.41 ^c	653.46-700.50	<0.001

^{a-c} Vērtības vienā līnijā bez neviena kopīga burta ir būtiski atšķirīgas/ ^{a-c} Values in the same line without any common letter are significantly different

Bet aprēķinot producētā CH₄ daudzumu uz 1 kg ķermeņa masas, tika novērots, ka pētījuma beigās tas bija zemāks PreG grupas teļiem Me=5.49, IQR 4.97 – 9.15 mg m⁻³ nekā CoG grupas teļiem Me=7.10, IQR 6.35 – 9.19 mg m⁻³. Lai arī PreG šis rezultāts bija mazāks nekā kontroles grupā, tomēr šī atšķirība nebija būtiska, p>0.05.

Kopējie rezultāti par topinambūra koncentrātu ar tā saturā esošo prebiotiku inulīnu un producētā CH₄ daudzumu bija pretēji citu autoru novērotajam, ka prebiotika inulīns var samazināt CH₄ produkciju atgremotājiem (Roosal, 2015; Charalampopoulos, Rastall, 2009; Zhou et al., 2004). Hindrichsen ar līdzautoriem (2004) veica *in vitro* pētījumu, izmantojot mākslīgo spurekli (RUSITEC), un secināja, ka 10 dienu garā eksperimentā topinambūra saknes piedevai, kas satur prebiotiku inulīnu, bija pozitīva ietekme uz CH₄

samazināšanu. Citi pētnieki salīdzinājuši inulīna un cietes ietekmi uz CH₄ produkciju, un pētnieku iegūtie rezultāti bija ļoti pretrunīgi. Czerkawski un Breckenridge (1969) savā *in vitro* pētījumā, kurā izmantoja 1.5 g inulīnu, novēroja, ka pirmās stundas laikā tika producēti 4.2 mL CH₄, kamēr ciete producēja tikai 0.6 mL šo gāzi. Tomēr, Poulsen ar līdzautoriem (2012) nekonstatēja nekādu būtisku atšķirību *in vitro* producētā CH₄ apjomā starp inulīnu, kviešu un kukurūzas cieti pēc 48 stundām. Savukārt Zhao ar kolēģiem (2014) *in vitro* eksperimentā novēroja, ka CH₄ produkcija bija zemāka inulīnam, salīdzinot ar cieti.

Daudz efektīvāk CH₄ produkcijas samazināšanai atgremotājiem var izmantot citas pētnieku izmantotās prebiotikas. Piemēram, GOS piedevu pievienošana pie barības efektīvi samazina CH₄ produkciju slaucamām govīm pat par 11% (Charalampopoulos, Rastall, 2009). Arī Mwenya ar līdzautoriem (2004b) pētījumā ar Holšteinas šķirnes govīm novēroja CH₄ samazinājumu par 11% GOS pētījuma grupai, salīdzinot ar kontroles grupu. Tomēr jāpiemin, ka šie abi pētījumi par GOS veikti ar pieaugušām slaucamām govīm, tādēļ rezultāti varētu atšķirties, ja pētījums tiktu veikts ar teļiem. Zheng ar līdzautoriem (2019) *in vitro* pētījumā novēroja, ka MOS devā 5 – 6% rezultējās ar viszemāko producētā CH₄ un CO₂ apjomu.

Runājot par spureklī producētā CO₂ daudzumu, pētījuma 1. dienā tika novērots, ka CO₂ koncentrācija spureklī PreG teļiem Me=3939.60, IQR 3688.75 – 4815.07 mg m⁻³ bija būtiski augstāka nekā CoG teļiem Me=3258.54, IQR 2864.08 – 3506.88 mg m⁻³, p<0.001, pētījuma 28. dienā CO₂ koncentrācija teļu spureklī bija būtiski zemāka PreG teļiem Me=3908.24, IQR 3634.82 – 4288.28, nekā CoG grupas teļiem Me=4618.15, IQR 4378.59 – 4756.74, p<0.001, bet pētījuma beigās CO₂ bija būtiski augstāks PreG grupas teļiem Me=4727.27, IQR 4503.39 – 4978.12 mg m⁻³ nekā CoG grupas teļiem Me=4251.28, IQR 4045.58 – 4426.25 mg m⁻³, p<0.001.

Līdzīgi kā CH₄ daudzums, rēķinot uz 1 kg dzīvmasas, arī CO₂ daudzums uz 1 kg dzīvmasas pētījuma beigās bija zemāks PreG grupas teļiem Me=33.09, IQR 30.54 – 43.54 mg m⁻³, salīdzinot ar CoG teļiem Me=36.72, IQR 34.63 – 37.07 mg m⁻³, tomēr atšķirība nebija būtiska, p>0.05.

Mums neizdevās atrast pētījumus par prebiotiku inulīnu un tā ietekmi uz CO₂ produkciju spureklī, bet Zheng ar līdzautoriem (2019) savā *in vitro* pētījumā, kurā izmantoja prebiotiku MOS noskaidroja, ka MOS 2% kg⁻¹ barības devā, visvairāk ietekmēja CO₂ produkciju – tā bija viszemākā. Bet pētnieku rezultāti bija pretrunīgi, jo šī pati piedeva devā 2.5% – 4.5% veicināja vislielāko CO₂ produkciju, bet, izbarojot MOS devā 5.0% – 6.0%, novēroja CO₂ produkcijas samazinājumu.

Oglekļa dioksīds ir viena no būtiskākajām gāzēm, kas izraisa siltumnīcas efektu, bet lauksaimniecības dzīvnieki netiek uzskatīti par šīs gāzes būtiskiem emitētājiem, jo dzīvnieku producētais CO₂ ir daļa no oglekļa cikla. Augi asimilē CO₂ aptuveni tādā pašā daudzumā, kā dzīvnieki izelpo un liela daļa no augiem

uzņemtā oglekļa spureklī tiek pārveidots par CH₄, kā arī tas tiek uzsūkts dzīvnieku audos un izdalīts ar pienu (Chianese et al., 2009a; IPCC 2001). Iespējams tādēļ arī pētnieki savos eksperimentos nav noteikuši atgremotāju spureklī producētā un no dzīvniekiem emitētā CO₂ daudzumu. Šī promocijas darba pētījumā tika novērots, ka PreG grupas teļiem pētījuma beigās gan CH₄, gan CO₂ bija augstāks, nekā CoG grupas teļiem. Lielāku producētā CH₄ daudzumu varētu izskaidrot ar to, ka metanogēnie mikroorganismi CH₄ produkcijai izmanto CO₂ un H₂ (Van Zijderveld et al., 2011), un, jo vairāk ir izejmateriāla, jo vairāk gāzes tiek producētas. Savukārt PreG grupas teļu spureklī augstāks CO₂ daudzums varētu būt saistīts ar lielāku uzņemtās augu barības daudzumu, kurā esošais saistītais ogleklis spureklī tiek pārvērsts atpakaļ par CO₂ (IPCC 2001).

SynG grupas teļiem papildus pie barības izbaroja 12 g topinambūra koncentrātu, kas satur 6 g prebiotiku inulīnu un 5 g *S.cerevisiae* rauga celmu 1026. Par prebiotiku inulīnu un tā ietekmi uz CH₄ produkciju ir maz pētījumu un iegūtie rezultāti ir neviennozīmīgi. Daļa pat parāda, ka šī prebiotika tieši veicina CH₄ produkciju. Savukārt par probiotikām un to ietekmi uz CH₄ ir publicēti daudzu pētnieku rezultāti un to liela daļa parāda, ka probiotikas samazina šīs gāzes produkciju spureklī.

Promocijas darba ietvaros tika noskaidrots, ka SynG grupas teļiem CH₄ daudzums spureklī pētījuma 28. dienā bija būtiski zemāks Me=659.11, IQR 565.04 – 1015.32 mg m⁻³ nekā CoG grupas teļiem Me=1052.94, IQR 983.33 – 1111.89 mg m⁻³ un PreG teļiem Me=847.25, IQR 812.13 – 879.86 mg m⁻³, p<0.001. Arī 56. dienā SynG grupas teļiem CH₄ daudzums spureklī bija būtiski zemāks Me=675.41, IQR 653.46 – 700.50 mg m⁻³ nekā PreG grupas teļiem Me=802.09, IQR 708.65 – 1076.77 mg m⁻³ un CoG grupas teļiem Me=792.06, IQR 755.06 – 873.59 mg m⁻³, p<0.001. Arī producētā CH₄ daudzums uz 1 kg teļu dzīvmasas SynG grupas teļiem pētījuma 28. un 56. dienā bija mazāks nekā PreG grupas un CoG grupas teļiem, tomēr šīs atšķirības nebija būtiskas, p>0.05. Pētījuma rezultāti parāda, ka topinambūra koncentrāts devā 12 g (inulīna saturs 6 g) būtiski nesamazina CH₄ un CO₂ produkciju teļu spureklī. Šie rezultāti liek domāt, ka topinambūra koncentrāts ar tā sastāvā esošo prebiotiku inulīnu viens pats nespēj ietekmēt šo gāzu daudzumu spureklī, bet šis koncentrāts kombinācijā ar *S.cerevisiae* rauga celmu 1026 spēj samazināt spureklī producēto CH₄ un CO₂ daudzumu.

Pētījuma SynG teļu grupai novērotie rezultāti par CH₄ daudzumu spureklī izbarojot sinbiotiku, kuras sastāvā bija raugs *S.cerevisiae*, ir līdzīgi ar daudz citu pētnieku iegūtajiem rezultātiem. Piemēram, Chung ar līdzautoriem (2011) secināja, ka raugu kultūras, kas pievienotas pie barības, uzlabo gan laktējošu, gan augošu dzīvnieku produktivitāti. Raugi spēj spureklī mainīt fermentācijas procesus, tie veicina acetogēno baktēriju augšanu un vairošanos un šīs baktērijas savukārt konkurē ar metanogēniem mikroorganismiem un izmanto CO₂ un H₂, kas nepieciešams arī metanogēnu augšanai, tādējādi samazinot CH₄ produkciju

(Haque, 2018; Mwenya et al., 2004b; Chaucheyras et al., 1995). Tas tika apstiprināts arī 5 dienu garā *in vitro* eksperimentā (Chaucheyras et al., 1995). Arī citos *in vitro* pētījumos sasniegti līdzīgi rezultāti. Hernandez ar līdzautoriem (2017) ziņoja, ka raugs *S.cerevisiae* devā 2 g un 4 g 70 h garā *in vitro* pētījumā, kurā izmantoja 60 dienu vecu Holšteinas šķirnes teļu spurekļa saturu, samazināja CH₄ produkciju, salīdzinot ar kontroles grupu. Arī Newbold un Rode (2006) ziņojuši par 58% CH₄ produkcijas samazināšanos, pielietojot *S.cerevisiae* barības piedevu *in vitro* pētījumā.

Ir arī pētījumu rezultāti, kuros netika novērots CH₄ samazinājums. Piemēram, Oh ar līdzautoriem (2019) pētījumā izmantoja *S.cerevisiae* devā 28 g d⁻¹ uz govī, 18 Holšteinas šķirnes govīm trīs 28 dienu garos pētījuma periodos un secināja, ka šī piedeva neietekmēja ne CH₄, ne arī CO₂ produkcijas apjomus.

Tomēr jāpiemin, ka ir arī zinātniskas publikācijas par rauga *S.cerevisiae* ietekmi uz palielinātu CH₄ veidošanos spureklī. Tas tika novērots Ogunade un līdzautoru (2019) veiktajā 25 dienu garajā eksperimentā, kura laikā liellopiem tika papildus izbarots raugs *S.cerevisiae* devā 15 g d⁻¹. Pētnieki šo producētā CH₄ pieaugumu izskaidro ar palielinātu metanogēnu *M.ruminantium* vairošanos spureklī.

Producētais CO₂ daudzums teļu spureklī pētījuma 1.dienā SynG grupas teļiem Me=2701.65, IQR 2419.45 – 3042.81 mg m⁻³ bija būtiski zemāks nekā CoG teļiem Me=3258.54, IQR 2864.08 – 3506.88 mg m⁻³, p<0.001, arī pētījuma 28.dienā tas bija būtiski zemāks Me=4263.82, IQR 3553.29 – 4599.96, nekā CoG grupas teļiem Me=4618.15, IQR 4378.59 – 4756.74, p<0.001 un pētījuma beigās SynG grupas teļiem arī tika konstatēts būtiski zemāks CO₂ daudzums spureklī Me=3266.07, IQR 1358.98 – 4584.91 mg m⁻³ nekā CoG grupas teļiem Me=4251.28, IQR 4045.58 – 4426.25 mg m⁻³, p<0.001 un šīs gāzes koncentrācija SynG grupas teļiem bija arī būtiski zemāka nekā PreG grupas teļiem Me=4727.27, IQR 4503.39 – 4978.12 mg m⁻³, p<0.001. Tātad mūsu pētījuma rezultāti liecina, ka, pie spēkbarības izbarojot *S.cerevisiae* kopā ar topinambūra koncentrātu (inulīna saturs 50%), var panākt CO₂ produkcijas samazināšanos. Šie rezultāti ir pretēji jau iepriekš pieminētajā Hernandez un viņa kolēģu (2017) *in vitro* pētījumā par raugu *S.cerevisiae* izmantošanu devās 2 g un 4 g, autori konstatēja, ka šī rauga piedeva būtiski palielina CO₂ produkciju. Savukārt rēķinot producētā CO₂ daudzumu uz 1 kg dzīvmasas, novērots, ka SynG grupas teļiem šis rezultāts ir visaugstākais Me=38.47, IQR 9.61 – 62.95 mg m⁻³, ja salīdzina ar CoG – Me=36.72, IQR 34.63 – 37.07 mg m⁻³ un PreG grupu teļiem Me=33.09, IQR 30.54 – 43.54 mg m⁻³, p>0.05. Jāatzīmē, ka mums neizdevās atrast nevienu zinātnisko publikāciju par *S.cerevisiae* rauga un tā kombinācijas ar prebiotikām (tai skaitā inulīnu) ietekmi uz CO₂ produkciju teļu spureklī.

SECINĀJUMI

1. Topinambūra koncentrāta (12 g), kas satur prebiotiku inulīnu (6 g), un tā kombinācijas ar rauga *S.cerevisiae* celmu 1026 (5 g) izbarošana teļiem pārejas periodā no piena uz tilpumaino barību fekāliju konsistenci, kā arī fizioloģiskos pamatrādītājus, hematoloģiskos un bioķīmiskos asins rādītājus saglabāja vecumam atbilstošajās normu robežās.
2. Topinambūra koncentrāta un tā kombinācijas ar *S.cerevisiae* 56 dienu ilga izbarošana, neskatoties uz papildu izdevumiem, ir ekonomiski izdevīga, jo nodrošināja attiecīgi par 17% un 16.5% lielāku dzīvmasas pieaugumu, salīdzinot ar kontroles grupu. Tomēr sinbiotikas izbarošanas izmaksas bija lielākas, kas prognozējamus ienākumus samazināja.
3. Teļiem 13 – 14 nedēļu vecumā greļina imūnreaktīvās šūnas sastopamas ne tikai glumenieka fundālo un pilorisko dziedzeru zonā, bet arī divpadsmitpirkstu un tukšās zarnas vidusdaļās, turklāt barības piedevu (topinambūra koncentrāta vai tā sinbiotikas ar raugu) izbarošana šo šūnu skaitu glumenieka fundālo dziedzeru zonā būtiski samazināja ($p < 0.001$), salīdzinot ar kontroles grupu, kas netieši norāda uz labāku barības sagremošanu un sāta sajūtu.
4. Topinambūra koncentrāta un tā kombinācijas ar raugu izbarošana, salīdzinot ar kontroles grupu, neietekmēja kuņģa kopējo un relatīvo masu, bet būtiski ($p < 0.001$) palielināja spurekļa *saccus dorsalis* kārpīņu platumu, *saccus dorsalis*, *ventralis* sieniņas epitēlija, t.sk., epitēlija pārragotās kārtas (*stratum corneum*) biezumu un glumenieka visu gļotādas zonu biezumu, kā arī divpadsmitpirkstu un tukšās zarnas sieniņu biezumu, tukšās zarnas un gūžas zarnas gļotādas biezumu, nodrošinot lielāku uzsūkšanās virsmas laukumu.
5. Sinbiotikas izbarošana būtiski ($p < 0.001$) palielināja divpadsmitpirkstu, tukšās un lokzarnas sieniņas biezumu un lokzarnas kriptu dziļumu, salīdzinot ar prebiotikas grupas teļiem. Tātad rauga *S.cerevisiae* pievienošana topinambūra koncentrātam veicināja šo zarnu sieniņu mikrostruktūru attīstību.

6. Neskatoties uz to, ka kopējo prokariotu un metanogēnu daudzums 13 – 14 nedēļu vecu teļu spurekļa šķidrumā starp pētījuma grupām un kontroles grupu būtiski neatšķīrās, tomēr teļu grupai, kurai izbaroja topinambūra koncentrātu kombinācijā ar *S.cerevisiae*, spureklī konstatēts būtiski mazāks ($p < 0.001$) CH_4 un CO_2 daudzums nekā tikai topinambūra koncentrātu saņēmušajiem un kontroles grupas teļiem. Sinbiotikas sastāvā esošais raugs spēj spureklī mainīt fermentācijas procesus, veicinot acetogēno baktēriju augšanu un vairošanos, kuras konkurē ar metanogēniem par CO_2 un H_2 izmantošanu, tādējādi samazinot spureklī gan brīvi pieejamā CO_2 daudzumu, gan CH_4 produkciju.
7. Topinambūra koncentrāta un tā sinbiotikas ar *S.cerevisiae* celma 1026 raugu izbarošana teļiem pārejas periodā no piena uz tilpumaino barību uzlabo teļu dzīvības pieaugumu un gremošanas kanāla attīstību, salīdzinot ar kontroles grupu. Tomēr, savstarpēji salīdzinot pētījuma grupu teļus, konstatējām, ka rauga pievienošana topinambūra koncentrātam būtiski neuzlaboja dzīvības pieaugumu, bet būtiski ($p < 0.001$) samazināja CO_2 un CH_4 produkciju spureklī.

IETEIKUMI PRAKSEI

1. Topinambūra koncentrāta un tā kombinācijas ar *S.cerevisiae* izbarošana teļiem pārejas periodā no piena uz tilpumaino barību ir ieteicama, jo veicina gremošanas kanāla attīstību un funkcionalitāti, kā arī stabilizē vispārējo veselības stāvokli.
2. No ekonomiskā viedokļa izdevīgāk ir izbarot topinambūra koncentrātu, jo tā pievienošana spēkbarībai (12 g uz 1 teļu dienā) teļiem no 4 – 14 nedēļu vecumam palielina dzīvības pieaugumu par 17%, kas var dot papildus ienākumus aptuveni 22 EUR apmērā par vienu teļu.
3. Lai gan topinambūra koncentrāta izbarošana teļiem dod par 0.5% lielāku dzīvības pieaugumu, tomēr no siltumnīcas efektu izraisīto gāzu emisijas samazināšanas viedokļa labāk ir izbarot sinbiotiku, kuras sastāvā ietilpst 12 g topinambūra koncentrāts un 5 g rauga *S.cerevisiae* celms 1026, jo tā būtiski ($p < 0.001$) samazina CH_4 un CO_2 produkciju spureklī.

INTRODUCTION

Research topicality. The transition period from milk feeding to solid feeding in calves is associated with various physiological and anatomical changes in the digestive canal. As it undergoes rapid microbial and structural changes, this period causes additional stress and may contribute to the development of various infectious diseases that may adversely affect the growth and development of calves (Meale et al., 2017).

Microbial colonisation of the rumen of newborn ruminants is particularly important during the physiological development of the rumen (Fonty et al., 1988). Bacteria are the most common of the microorganisms in the rumen, followed by protozoa, methanogens and fungi. The rapid increase in the diversity of the microbial population before the end of the milk feeding period promotes faster functional development of the rumen and improves productivity. A high rumen microbiome diversity is required for normal rumen physiological development and solid feed processing (Li et al., 2012). Microbial fermentation processes produce various gases in the rumen as well as in the large intestine, including carbon dioxide (CO₂) and methane (CH₄) (Öztürk, 2007). The CH₄ produced by rumen methanogenesis affects animal productivity (GHGMP, 2005), resulting in energy losses of up to 15% (Hegarty, 2002; Giger-Reverdin et al., 1998). Methane is also one of the main gases that contributes to increased global temperatures (Hansen et al., 2007). Greenhouse gas emissions from the agricultural sector, especially for cattle, are mainly derived from belching and intestinal gases (Muñoz et al., 2012; Murray et al., 1999).

The gases and volatile fatty acids produced in the rumen and intestines affect the pH of the environment. The pH of the internal environment of the rumen and the concentrations of volatile fatty acids in ruminants are important indicators of fermentation activity, reflecting the functions of the rumen (Feng et al., 2020) and affecting food intake, microbial metabolism and nutrient degradation (Wang, 2012) as well as the anatomical development of the rumen (Thompson et al., 2006). The hormone ghrelin also participates in the growth and development of calves. It not only promotes the release of growth hormone from the pituitary gland but is also involved in appetite regulation (Solomis and Korbonits, 2014; Kojima et al., 1999).

Nowadays, with the rapid development of dairy farming, there is a growing need for calves that are healthier, have better growth rates and are more productive. This is often achieved through the preventive use of antibiotics. However, the use of antibiotics in animals to prevent disease and increase productivity has been banned in the European Union on January 1, 2006.

Possible alternatives with such properties are prebiotics, probiotics and a combination of both – synbiotics. The most significant effect of these additives is on the gastrointestinal microflora, where the growth and multiplication of beneficial microorganisms are promoted. This, in turn, has a positive effect on

the whole organism: animals show a better increase in live weight, lower amounts of pathogenic microorganisms in the digestive tract (Martinez et al., 2014; Gibson, Roberfroid, 1995) and a better structural and functional development of the rumen and intestines (Samal, Behura, 2015; Brewer et al., 2014; Ghosh, Mehla, 2012; Heinrichs et al., 2009; Lesmeister et al., 2004); in addition, these feed additives can reduce the methane production in the rumen (Zhou et al., 2004).

At the beginning of this study, we wanted to find out the effect of Jerusalem artichoke concentrate, with a prebiotic inulin content of 48.5 – 50.1%, and its synbiotic with yeast (*Saccharomyces cerevisiae* (*S.cerevisiae*) strain 1026) on the health status of the calves, the anatomical, histological and functional development of the digestive tract, as well as the growth of calves and methanogenesis in the rumen and large intestine during a period of physiological significance, becoming fully functional ruminants.

Theses to be defended

1. Feeding Jerusalem artichoke concentrate (inulin content 48.5 – 50.1%) and its combination with the yeast *S.cerevisiae* (strain 1026) improves the health of calves, increases the live weight of calves and reduces the number of ghrelin-immunoreactive cells in the digestive tract.
2. Feeding Jerusalem artichoke concentrate (inulin content 48.5 – 50.1%) and its combination with *S.cerevisiae* promotes the morphofunctional development of the digestive tract.
3. Feeding Jerusalem artichoke concentrate (inulin content 48.5 – 50.1%) and its combination with *S.cerevisiae* reduces the number of methanogenic microorganisms in the digestive tract of calves and the production of CO₂ and CH₄ in the rumen.
4. The addition of yeast to Jerusalem artichoke concentrate, creating a new synbiotic, reduces the production of CO₂ and CH₄ in the calf's rumen, promotes morphofunctional development, improves live weight gain and increases economic benefits.

The aim of the doctoral thesis was to determine the effects of feeding Jerusalem artichoke concentrate and its synbiotic with yeast (*Saccharomyces cerevisiae* strain 1026) on the health status and growth of calves, the morphofunctional development of the digestive tract, as well as methanogenesis in the rumen and large intestine during the transition from milk to solid feed.

Objectives

1. To study how the feeding of Jerusalem artichoke concentrate and synbiotic (Jerusalem artichoke concentrate and yeast *Saccharomyces cerevisiae*) can affect the health status, weight gain and economic benefits, as well as hunger and satiety in calves from 4 to 14 weeks of age.

2. To determine the effect of feeding the feed additives included in the 56-day study on the morphofunctional development of different parts of the digestive tract (rumen, abomasum, small and large intestine) during the transition from milk to solid feeding.
3. To evaluate the effect of Jerusalem artichoke concentrate and synbiotic feeding on the total number of prokaryotes, including methanogenic microorganisms in the rumen and large intestine of 13 – 14-week-old calves.
4. To determine the effects of feeding the feed additives on the amounts of methane (CH₄) and carbon dioxide (CO₂) in the rumen of 4 – 14-week-old calves.

Scientific novelty of the research

1. Original data were obtained on the effect of feeding of synbiotic (12 g Jerusalem artichoke concentrate in combination with 5 g of *S.cerevisiae* strain 1026 per day) on the growth of 4 – 14-week-old calves, including the morphological and physiological development of the digestive tract.
2. Original data were obtained on the number of ghrelin-immunoreactive cells in the duodenum and jejunum of calves at 13 to 14 weeks of age that received standard feed and calves that were additionally fed 12 g of Jerusalem artichoke concentrate (inulin content 6 g) per day.
3. Original data were obtained on the number of ghrelin-immunoreactive cells in different parts of the digestive tract (abomasum *pars pylorica* and *pars fundalis*, duodenum and jejunum) in calves aged 13 – 14 weeks, supplemented with 12 g of Jerusalem artichoke concentrate and synbiotic consisting of 5 g of Jerusalem artichoke concentrate and *S.cerevisiae* strain 1026 per day.
4. For the first time in Latvia, original data on the effect of feeding Jerusalem artichoke concentrate (12 g per day; contains 6 g of the prebiotic inulin) and its synbiotic with *S.cerevisiae* strain 1026 (5 g per day) on prokaryotes, including methanogenic microorganisms, and the amounts of CH₄ and CO₂ produced in the rumen of 4 – 14-week-old calves, are reported.

The personal contributions are as follows: I performed an assessment of the animal health status, measuring the heart rate, respiratory rate, body temperature, evaluating the consistency of the faecal matter and analysing the haematological and biochemical parameters of the blood samples obtained. I also measured the animals, obtained rumen fluid and gas samples, measured the pH of the contents of different parts of the digestive canal, determined the mass of the various compartments of the multi-chambered stomach, obtained the necessary samples for histological analysis of the digestive canal structures (fixation, cutting, insertion in histology sample cassettes), conducted the microscopic examination of histological samples and analysed, presented and published the obtained results.

1. MATERIAL AND METHODS

1.1. Study time, object, characteristics

This doctoral thesis was developed with the support of the project National Research Programme AGROBIORES “Agricultural Resources for Sustainable Production of High-Quality and Healthy Food in Latvia”, Project No. 3 “Genetic Research of Economically Important Characteristics of the Local Origin Dairy Cows and Pigs for Qualitative Food Production and Development and Testing of Natural Origin Feed Materials. (LIVESTOCK)” (2014 – 2018) (VPP 2014/VPP2014-2017, sub-project VPP29.3). The study methodology was evaluated at the meeting of the Council for Ethical Treatment of Animals, Latvia University of Life Sciences and Technologies No.DzLĒP/2017/2-1.

The study was carried out from December to the end of February year 2017/2018 in the Saldus municipality, Jaunlutriņi parish, farm “Ratenieki”, and lasted 56 days. The overall scheme of the study was established on the basis of previous studies (Król, 2011; Hassan et al., 2016). Throughout the experimental period, the health status of the calves was assessed by both the individuals involved in the study and the farm veterinarian. Long-term diarrhoea, respiratory diseases or any other diseases were not observed in calves. The examination of the calves and sampling were performed under the supervision of the farm veterinarian. The results of the study were used to assess the overall health status of the whole herd, including calves, and to improve growth rates.

The study included 15 clinically healthy, randomly selected Holstein Friesian and red Holstein crossbreed calves (*Bos taurus*) of different sexes, with an average age of 32±4 days (the youngest calves were at least 28 days or 4 weeks old) and an average live weight of 72.1±11.34 kg.

Calves of appropriate age were selected in the study groups without significant differences in animal weight among individuals, with good health status assessed following clinical investigation. Two male and three female calves were included in each group of calves.

Calves of each study group were kept together in a room with the following dimensions: length 5.3 m, width 4.5 m, height 2.6 m, window size 1.2 × 1.2 m, door size 1.95 × 1.0 m. The room was large enough to allow the animals to lie down, move freely and face each other. The floor was a concrete floor covered with a small amount of straw. The holding consisted of two feeding tables, one for hay and the other for milk replacer, prestarter and barley flour, as well as one water drinking bowl.

After birth, within 2 h, all calves received colostrum, and for the following 5 days, the calves received whole milk (3.5 L 2 × day) and later milk replacer, at a dose appropriate to the age and live weight of calves recommended by the manufacturer. At 4 – 6 weeks of age, calves received 5 L of milk replacer daily and prestarter (approximately 0.5 kg per calf per day). At 8 weeks of age, calves

received approximately 1.5 kg of barley flour and 6 L of milk replacer per day. The calves had free access to water and hay all the time.

Overall, there were three study groups. Five calves were in the control group (CoG) and received the standard diet. Each of the five calves in the prebiotic group (PreG) was supplemented with 12 g of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*) concentrate per day, containing 6 g of prebiotic inulin. Five calves from the synbiotic group (SynG) in addition received an experimental synbiotic consisting of two different products: 12 g of Jerusalem artichoke concentrate containing 6 g prebiotic inulin and 5 g probiotic *S.cerevisiae* culture *Yea-Sacc*® 1026 (Alltech Inc., France), containing at least 1×10^9 colony-forming units (CFU) g^{-1} of *S.cerevisiae* strain 1026. The yeast feed additive used in the study has been registered for use in the countries of the European Union (Commission Implementing Regulation No 1109/2014), whereas the synbiotic used in this study is not commercially available and was combined specifically for this study. The Jerusalem artichoke concentrate and synbiotic were added to the concentrate once per day during the morning feeding.

The dose of Jerusalem artichoke concentrate fed to calves was selected on the basis of the dose indicated in other studies (Arne, Ilgaza, 2016; Król, 2011). It should be noted that Jerusalem artichoke only has an inulin content of approximately 10%, but with specific technologies, the inulin content can be increased to 48.5 – 50.1% of dry matter (Fleming, Groot, 1979). Jerusalem artichoke concentrate was produced by the company “Herbe”, according to the technology developed by the University of Latvia Institute of Microbiology and Biotechnology. The dose of probiotic *S.cerevisiae* strain 1026 was selected on the basis of a previous study published in 2016 (Hassan et al., 2016).

1.2. Calf health assessment

On days 1, 28 and 56, the heart rate ($\text{x min}^{-1} \pm \text{SD}$), respiratory rate ($\text{x min}^{-1} \pm \text{SD}$), and body temperature ($^{\circ}\text{C} \pm \text{SD}$) were measured. The heart rate was determined by performing an auscultation of the heart on the left side of the chest, in the intercostal space of the 4th rib, 2 – 3 cm above the level of the elbow. The respiratory rate was determined by auscultation in the middle of the right or left side of the chest wall. Cardiac and pulmonary auscultation was performed with a *Littmann Cardiology IV* (3M, USA) stethoscope. Body temperature was determined in the rectum, using an electronic thermometer *DIGI-VET* (Kruuse, Denmark).

On the assessment days, the consistency of the faeces was assessed using a scale from 0 to 3, with a score of 0 for firm, species-specific faeces, a score of 1 for soft faeces and a score of 3 for watery faeces (Larson et al., 1977). Faecal consistency was assessed by three veterinarians. On the other days of the study,

farm staff also monitored faecal consistency to detect diarrhoea in calves; no diarrhoea episodes were observed.

Also on days 1, 28 and 56, blood samples were taken from calves by puncture of the jugular vein (*vena jugularis*), using a 20-G needle (30 mm length). For **haematological** analysis, blood was collected in *S-Monovette EDTA 2.7 mL* (*SARSTEDT AG & Co. KG*, Germany) vacutainer tubes. Blood samples were analysed for total white blood cell count (WBC, 10^9 L^{-1}), red blood cell count (RBC, 10^{12} L^{-1}), haematocrit (HCT, %), haemoglobin (HGB, g dL^{-1}) and platelet count (PLT, 10^9 L^{-1}), using an *Exigo EOS* (*Boule Medical AB*, Sweden) automated veterinary haematology analyser. Blood for the **biochemical** analysis was obtained using *S-Monovette* serum vacutainers 2.7 mL with blood coagulation activator (*SARSTEDT AG & Co. KG*, Germany). Gamma glutamyltransferase (GGT, U L^{-1}), aspartate aminotransferase (ASAT, U L^{-1}), urea (UREA, mmol L^{-1}), creatinine (CREA, mmol L^{-1}), total protein (TP, g L^{-1}), albumin, g L^{-1} , globulins, g L^{-1} and glucose mmol L^{-1} were determined. Blood samples were analysed using a *Mindray BS-200E* (*Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co., Ltd.*, China) blood biochemistry analyser. Blood glucose was determined immediately after blood sampling using an *ACCU-CHEK instant* glucometer (*Roche*, Germany). The examination of blood samples was performed in the laboratory of the Veterinary Clinic of Latvia University of Life Sciences and Technologies.

1.3. Determination of live weight of calves

On days 1, 28 and 56, the live weight of calves was determined applying a scientifically recognised method for the determination of indirect live weight (Heinrichs, Hargrove, 1987), using the measuring tape *Animeter* (*Albert Kerbl GmbH*, Germany). Live weight can be determined by measuring the chest circumference just behind the elbows and reading the result on the kg scale on the tape measure. This method, based on bovine standard growth curves, is widely used to determine live weight on farms (Heinrichs, Hargrove, 1987).

1.4. Sampling of rumen gases and determination of methane and carbon dioxide

Methane (CH_4) and carbon dioxide (CO_2) in the rumen were determined on days 1, 28 and 56 of the study in the morning, 2 h after feeding. To obtain calf rumen gas samples by the rumenocentesis method, the calf was fixed in an upright position by pressing its right side against the wall or lying down on the right side.

A rumenocentesis area was prepared on the left side behind the rib cage below the lateral growths of the lumbar vertebrae by cutting the hair and disinfecting the skin with 70% alcohol solution. The needle (14 G, outer diameter 2.1 mm, length 60 mm) was inserted into the abdominal cavity at an angle of 45° to the rumen wall in an orientation towards the right foreleg, approximately 4 to 6 cm deep. Rumen gases were obtained with a 20 mL disposable syringe. Immediately after obtaining the sample, the tip of the needle was sealed with a flexible, airtight, inert material (similar to silicone) to prevent gas escaping from the syringe. After puncture, the puncture site was disinfected with 70% alcohol solution (Atkinson, 2017).

Rumen gases (CH₄ and CO₂) were measured using a *Picarro G2508* mobile gas spectrophotometer (*Picarro*, USA). The technical parameters of the device are described in more detail in the manufacturer's technical documentation (*Picarro G2508 Analyzer Datasheet*), and the application possibilities are described in Fleck et al. (2013). We performed the gas analysis on the farm in cooperation with the scientists of Latvia University of Life Sciences and Technologies Forest and Water Resources Research Laboratory immediately after obtaining the samples.

The gas measurements were performed using an opaque chamber with a capacity of 1 L, which was connected to a measuring device and an external zero-leakage vacuum pump using a 9-meter-long Teflon tube (1/16 inch inside diameter, 1/8 inch outside diameter). Measurements were performed for 180 s, with an average interval of 1 s, and a 10 mL amount of rumen gas was analysed (Grinfelde et al., 2018).

1.5. Collection of rumen fluid and faecal samples

On the morning of day 56, 2 h after feeding, samples of calf rumen fluid were also taken. If, due to the low degree of rumen filling, rumen fluid could not be obtained after the methodology described in Paragraph 1.4., the direction of the injection needle was changed (ventrally), and at the same time, with the fist, a back pressure was applied to the right rumen wall. No additional puncture was performed in the rumen to obtain rumen fluid, but only the syringe was replaced after obtaining the rumen gas sample. The rumen fluid was obtained with a 20 mL disposable syringe according to the method of Atkinson (2017).

After obtaining the sample, the rumen fluid was filled into glass tubes. Five drops of mineral oil were added to the rumen fluid sample, and the tube was tightly closed with a rubber stopper to ensure a maximum anaerobic environment. After puncture, the puncture site was re-disinfected with 70% alcohol solution. After delivery to the laboratory (within 3 h), the rumen fluid samples were frozen at -80 °C.

On day 56, faecal samples were taken manually from the rectum and placed in polyethylene bags. After delivery to the laboratory, the samples were frozen at -80 °C until further microbiological examination.

1.6. Determination of total prokaryotes, methanogens and individual methanogenic species in rumen fluid and faecal samples

The incidence of total methanogens, individual methanogenic species (*Methanosphaera stadtmanae*, *Methanobrevibacter ruminantium*, *Methanobrevibacter smithii*) and total prokaryotes was determined in individual rumen fluid samples (n=15) as well as in the pooled faecal samples of all five calves in each group (n=3). The determination of the relevant methanogens in the samples was selected based on the results of a study by other authors, who had identified these methanogens as dominant in the rumen (Nicholson et al., 2007; Wright et al., 2007; Whitford et al., 2001).

The DNA from calf rumen and faeces was isolated using the *QIAamp® DNA Stool Mini Kit* (Qiagen Ltd., UK). It was prepared using 200 mg of frozen sample and tested according to the manufacturer's instructions (*QIAamp Fast DNA Stool Mini Handbook*) (Yu, Morrison, 2004).

The DNA quantity and purity were checked using a *NanoDrop-1000* spectrophotometer (*Thermo Fisher Scientific Inc.*, USA) (McCartney et al., 2013). The obtained DNA samples were stored at -20 °C until further analysis.

Methanogens and prokaryotes were determined using specific primer sets. The sequences of the methanogenic and total prokaryotic primers were as follows:

- 1) total methanogens (rrs): Met630F: 5'-GGATTAGATACCCSGGTAGT-3'; Met803R: 5'-GTTGARTCCAATTAACCGCA-3'
- 2) total prokaryotes (rrs, references gēns): V3-F: 5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3'; V3-R: 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'
- 3) *Methanosphaera stadtmanae* (rrs): Stad-F: 5'-CTTAACTATAAGAATTGCTGG-3'; Stad-R: 5'-TTCGTTACTCACCGTCAAGAT-3'
- 4) *Methanobrevibacter ruminantium* (rrs): Rum16S 740F: 5'-TCCCAGGGTAGAGGTGAAA-3'; Rum16S 862R: 5'-CGTCAGAATCGTTCCAGTCA-3'; Rum16S FAM: 5'-CCGTCAGGTTTCGTTCCAGTTAG-3'
- 5) *Methanobrevibacter smithii* (rrs): Smit.16S-740F: 5'-CCGGGTATCTAATCCGGTTC-3'; Smit.16S862R: 5'-TCCCAGGGTAGAGGTGAAA-3'; Smit.16S FAM: 5'-CGTCAGAATCGTTCCAGTCA-3'

Polymerase chain reactions were performed using the *QuantiNova® Probe PCR Kit* (*Qiagen Ltd.*, UK) and the *QuantiNova® SYBR® Green PCR Kit* (*Qiagen Ltd.*, UK) following the manufacturer's instructions (*QuantiNova Probe PCR Handbook*; *QuantiNova® SYBR® Green PCR Handbook*). The DNA amplification was performed in a real-time PCR device *RotorGene Q* (*Qiagen, Ltd.*, UK) with initial denaturation at 95 °C for 2 min, followed by 40 denaturation cycles (95 °C for 5 s) and primer hybridisation at 60°C for 10 s (for total methanogens (rrs, mcrA), total prokaryotes and *M.stadtmanae*) and 60°C for 5 s (for *M.ruminantium* and *M.smithii*) (McCartney et al., 2013).

The numbers of methanogens and total prokaryotes were estimated as the C_t value (the cycle at which PCR amplification has reached the exponential phase). The lower the C_t value, the greater the number of searched sequences in the sample. The numbers of total methanogens, prokaryotes or specific methanogens in the tested sample could be evaluated based on the C_t value. The examinations were performed at Latvia University of Life Sciences and Technologies, Research Laboratory of Biotechnology, Division of Molecular Biology and Microbiology.

1.7. Evaluation of the economic benefits of feed additives

An evaluation of the economic benefits of the feed additives used in this study (Jerusalem artichoke concentrate and its combination with *S.cerevisiae* strain 1026) after 56 days of feeding was performed based on the calculation methods described in a similar study by Dar et al. (2017). We determined the following indicators.

1. Amount of feed additive fed to one calf throughout the study (Formula 2.1.)

$$a \times b = c, \quad (2.1.)$$

where a – the amount of feed additive per calf fed per day (g),

b – the number of feeding days,

c – the amount of feed additive fed to one calf throughout the study (g)

2. Cost of feed additive per calf throughout the study (Formula 2.2.)

$$e \times b = g, \quad (2.2.)$$

where e – the daily cost of the feed additive per calf (EUR),

b – the number of feeding days,

g – the cost of feed additive per calf during the study (EUR)

3. Cost of feed additive per kg of live weight (Formula 2.3.)

$$\frac{g}{f} = d, \quad (2.3.)$$

where g – the cost of feed additive per calf during the study (EUR),
 f – the mean live weight of the calves after 56 days of feeding the specific additive (kg),
 d – the cost of feed additive per kg of live weight (1 kg EUR⁻¹)

4. Estimated income from the sale of 1 calf to wholesalers (Formula 2.4.)

$$j \times f = i, \quad (2.4.)$$

where j – the average purchase price of kg live weight of calf (EUR) (*information obtained in September 2021*),
 f – the mean live weight of the calves after 56 days of feeding the specific additive (kg),
 i – the predictable income from the sale of one calf (EUR)

5. Economic benefit of selling one calf and taking into account the cost of the fed feed additive (Formula 2.5.)

$$i - g = x, \quad (2.5.)$$

where i – the expected income from the sale of one calf (EUR),
 g – the cost of feed additive per calf during the study (EUR),
 x – the economic benefit of selling one calf and taking into account the cost of the fed feed additive (EUR)

1.8. Determination of the pH of the internal environment in different parts of the digestive canal (*post-mortem*)

After slaughter of the animals for commercial purposes on day 56 (calves aged 88±4 days or at least 12 weeks), the acid-base balance (pH) of the internal environment was determined in different parts of the digestive canal:

- 1) in the mouth under the root of the tongue,
- 2) in the cranial sac of the rumen (*atrium ruminis*),
- 3) in the ventral sac of the rumen (*rumen saccus ventralis*),
- 4) near the pyloric sphincter in the abomasum (*abomasum pars pylorica*),
- 5) in the middle of the abomasum,
- 6) in the middle of the jejunum,

7) in the middle of the colon

A portable pH meter *ProfiLine pH 3110* (Xylem Inc., Germany) was used to determine the pH with a range of -2.000 to +19.999 (± 0.005 pH). The pH meter used was calibrated with industrially available standard solutions (pH 4.01 and pH 7.00) (Xylem Inc., Germany) at 20 °C.

1.9. Determination of multi-chambered stomach mass

The masses of the individual parts of the stomach (total empty stomach mass, abomasum mass, forestomaches mass) were determined using a digital hand scale (*Rapala*, China) with an error of ± 10 g.

The relative weights of the total stomach, forestomaches and abomasum to live weight were also calculated (Formula 2.6.), and the percentage of abomasum and forestomaches relative weight to the total stomach mass was calculated (Formula 2.7.).

$$\frac{A}{B} \times 100 = C\%, \quad (2.6.)$$

where A – the total mass of the stomach, abomasum or forestomaches (kg),

B – the live weight of calves (kg),

C – the relative weight of the relevant part of the stomach (%) (Jonova et al., 2021)

$$\frac{D}{E} \times 100 = F\%, \quad (2.7.)$$

where D – the mass of the abomasum or forestomaches (kg),

E – the total stomach mass (kg),

F – the percentage of the relevant part of the stomach in relation to the total weight of the stomach (Górka et al., 2011)

1.10. Obtaining and examining histological specimens of different parts of the digestive canal

Tissue samples for histological examination were obtained from the dorsal sac (*rumen saccus dorsalis*) and the ventral sac (*rumen saccus ventralis*) of the rumen, the abomasum (*pars cardiaca*, *pars fundalis*, *pars pylorica*), the duodenum, the middle part of the jejunum, the end part of the jejunum and the middle part of the ileum as well as the middle part of the colon.

A 4×4 cm tissue sample was obtained with scissors and rinsed with 0.9% NaCl solution to remove gastric and intestinal contents. The samples were then rinsed in 10% formalin solution to fix the mucosa and ensure that the formalin evenly enters the entire lumen of the intestinal samples taken. Subsequently, the samples were placed in tightly closed plastic containers with 10% buffered neutral formalin (tissue to formalin ratio 1:10). Samples were stored at room temperature for 2 days, and subsequently, the tissue was cut and placed in histological sample cassettes. The tissue processor *Leica ASP200 S* (*Leica Biosystems Nussloch GmbH*, Germany) was used for dehydration, preparation and incorporation of tissue histological specimens into paraffin blocks, according to a standardised tissue histological preparation method (Kiernan, 2008; Carson, 1997).

A total of 90 samples from different parts of the digestive canal were fixed and embedded in paraffin blocks. After incorporating the samples into the paraffin blocks, the preparations were cut with the microtome into 5 µm thin sections and applied to slides, which were placed in a thermostat 60 °C for 30 min to dry and secure to the slide.

The haematoxylin-eosin staining method (H&E) was used for the histological staining of tissue samples (Carson, 1997). To deparaffinise the samples (deparaffinisation), they were placed in xylene twice for 5 min. An alcohol series (99%, 96%, 70%, and 50%) was used to rehydrate the samples, with 2 min in each concentration. Tissue staining was then performed with haematoxylin. The slides were left in the stain for 3 min, rinsed with distilled water and stained with eosin for 3 – 5 min. After staining, the samples were dehydrated in an alcohol series (70%, 96% and 99%; 1 min at each concentration) and clarified by placing in xylene (twice for 5 min). After dehydration and clarification, the samples were covered with xylene-soluble histological glue and coverslips.

The length, width (µm) and thickness of the entire epithelium and *stratum corneum* (µm) were measured in histological specimens of the dorsal sac (*rumen saccus dorsalis*) and the ventral sac (*rumen saccus ventralis*).

Papilla length was measured from the apical end of the papilla epithelium to the lamina muscularis mucosae. If the papilla had a curved shape, connected lines were used to measure its length. The width of the papilla was measured in its middle part up to the apical ends of the epithelial cells perpendicular to the length of the papilla. In each sample, measurements were taken in five different fields of view for all the papillae present.

In each sample, the thickness (µm) of the entire epithelium of the rumen papillae and the *stratum corneum* was measured in five different fields of view, and three measurements were performed in each field of view.

In the *pars cardiaca*, *pars fundalis* and *pars pylorica* of the abomasum, mucosal thickness (µm) was measured in five fields of view, with three measurements each.

Mucosal thickness (villi length and crypt depth) and the thickness of the entire intestinal wall (μm) were measured in the middle of the duodenum and the jejunum as well as at the end of the jejunum and the middle of the ileum. Three to five measurements were taken in each sample, in five fields of view.

In the middle part of the colon, the depth of the crypts from the apical end of the crypt epithelium to the lamina muscularis mucosae and the thickness of the entire intestinal wall (μm) were measured. Three to five measurements were performed in each sample, in five fields of view.

A total of 200 sections of histological specimens from different parts of the digestive canal were evaluated. All measurements were performed using a multifunction light microscope *Leica DM 750* (*Leica Microsystems*, Germany). Photographing, processing and measurement of the obtained histological examinations were performed using a *Leica ICC50 HD* camera (*Leica Microsystems*, Germany) and the *Leica Application Suite* software (*Leica Microsystems*, Germany). The examinations were performed at Latvia University of Life Sciences and Technologies, Faculty of Veterinary Medicine, Laboratory of Comparative Pathology of the Preclinical Institute.

1.11. Use of immunohistochemical staining to determine the number of ghrelin-IR cells in the abomasum and the small intestine histological specimens

Tissue immunohistochemical staining was used to detect ghrelin-immunoreactive cells. The number of ghrelin-immunoreactive cells was determined in sections of abomasal and small intestinal tissues. Labelling of immunoreactive cells was performed using the streptavidin-biotin complex (*Dako REAL™ EnVision™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse, Agilent Technologies*, USA). The examined tissue samples were applied to silane-coated slides (*HistoBond®+, Paul Marienfeld GmbH & Co. KG*, Germany) and then dried for 12 hours in a thermostat at 37°C. The samples were then deparaffinised with xylene and rehydrated in a series of ethanol with decreasing concentrations. After rehydration, the samples were placed in 65°C buffer with pH 9.0 (*Target Retrieval solution, pH 9, Dako, Agilent Technologies*, USA) and treated twice with a break to 70 °C in the a microwave 450W for 5 min to release epitopes to bind the antigen to the antibody. The samples were then cooled to 22 °C (room temperature) and amplified for 5 min with endogenous peroxidase blocking reagent (*Dako Endogenous enzyme block, Agilent Technologies*, USA) to block endogenous peroxidase. Rat and mouse polyclonal antibodies (*H-031-31, Phoenix Pharma. Inc.*, USA) at a dilution of 1:500 were used as primary antibodies. To detect immunoreactive cell and primary antibody responses, the antigen-antibody complex was labelled by applying a secondary antibody for 30 min and then stained by applying the

DAB+ complex for 5 min (*Dako REAL™ EnVision™ Detection System, Agilent Technologies, USA*). Tissues were stained with haematoxylin to provide contrast to the sample and to avoid artifacts. The stained samples were incubated in a humid chamber at room temperature and rinsed with phosphate buffer (*Wash Buffer, pH 7.4, Dako, Agilent Technologies, USA*).

Histological sections of the pyloric part of a dog's stomach were used as a positive control for ghrelin antibodies. The same samples were used as negative controls; however, they were treated with an antibody diluent instead of the primary antibody (they did not show an immune response to ghrelin).

The quantitative composition of immunoreactive cells was evaluated in each sample in 10 fields of vision by determining the mucosal area of 1 mm² and the number of positive cells in it.

Samples were examined at 400x magnification with an *EVOS M5000 (Invitrogen™, USA)* microscope. The examinations were performed at Latvia University of Life Sciences and Technologies, Faculty of Veterinary Medicine, Laboratory of Comparative Pathology of the Preclinical Institute

1.12. Statistical data analysis

Data distribution was determined using the Shapiro-Vilk test and by visual evaluation of the box-plot, histograms and normal Q-Q plot graphs. The assumption of homogeneity of the dispersions was tested by the Levene's test. To determine whether there were statistically significant differences among the three and/or more independent groups, a one-way ANOVA was performed with the Tukey post-hoc test (if data were normally distributed, homogeneous and did not contain outliers) (*heart rate, respiratory rate, temperature, haematology, blood biochemistry, analysis of changes in calf live weight, number of methanogenic microorganisms, gastrointestinal pH and mass of multi-chambered stomach compartments*). Otherwise, the Kruskal-Wallis H test with pairwise comparisons using Dunn's procedure (1964) with a Bonferroni adjustment was performed (*analysis of faecal consistency, methane and carbon dioxide concentrations, gastrointestinal histological specimen parameters and analysis of ghrelin-immunoreactive cell counts*). Post-hoc comparisons are made when three or more groups need to be compared. To do this, specific indices are used to adjust for the p-value. The choice of indices depends on the number of groups, data distribution, study design balance and data variance. For example, for a small number of groups (up to five pairs) with the same variance and normal data distribution, the Tukey test is used, whereas Bonferroni correction is used when the number of groups is high or the data are not normally distributed. The Mann-Whitney U test, the independent sample T-test, or the Welch's test were used to determine whether there was a statistically significant difference between the two groups. The linearity of the relationship and the direction between the

two variables were estimated using the Spearman rank or the Pearson correlation test.

The software package *SPSS Statistics Version 22 (IBM Corporation, Chicago, Illinois)* was used for data analysis. All statistical analyses were performed at a significance level of $\alpha=0.05$, and data are presented as mean \pm standard deviation if they belong to the interval or ratio scale, were normally distributed, do not contain significant outliers or the median and interquartile range if data belong to the ordinal scale and are no normally distributed and/or contain significant outliers. *Microsoft Excel 2016 (Microsoft Corporation, USA)* was used to create the charts.

2. RESULTS AND DISCUSSION

2.1. Effects of feeding Jerusalem artichoke concentrate and its synbiotic with *S.cerevisiae* on haematological and biochemical blood parameters

Blood tests can provide important information about the health of individual calves and the herd as a whole. However, it should be kept in mind that calves, especially newborns, as well as calves in the transition period from milk to solid feed, are not fully comparable to adult cows as they are not yet considered complete ruminants. Differences are also observed in blood tests, which are affected not only by the age of the calf but also by various other factors such as the type of feed ingested and the different feed additives (Dillane et al., 2018; Mohri et al., 2007). The type of feed and the feeding regime are of particular importance at about 5 weeks of age, when calves begin to eat more solid feed (hay, starter) (Reece, 1980).

In this study, the haematological parameters (white blood cell count, red blood cell count, haematocrit, haemoglobin level and platelet count) were determined at all blood sampling times in calves of the PreG (prebiotic group), SynG (synbiotic group) and CoG (control group) groups. There were no significant differences among groups, $p>0.05$.

Erythrocyte count increased steadily with age, and haematocrit and haemoglobin concentrations tended to increase with age in both the calf-supplemented and the control group. Similar observations have been noted in a study of 65 Holstein Friesian calves from birth to 24 weeks of age (Ježek et al., 2011). In calves, the erythrocyte count increased after 5 weeks of age; similar dynamics were observed for haemoglobin and haematocrit. The rates increased until the 2nd week of calf life, then decreased to 6 weeks of age and subsequently increased with age. Lower erythrocyte count, and lower haemoglobin and haematocrit levels could be explained by a decrease in erythrocyte production

after birth; also, the lifespan of intrauterine erythrocytes circulating in the body is shorter (Harvey, 1997). In turn, after 5 – 6 weeks of life, the number of erythrocytes, as well as the haemoglobin and haematocrit levels increased, which most likely because of the consumption of more solid feed (starter, hay), which contains more iron than milk (Reece, 1980).

As already mentioned, not only the age of the calves but also the feed additives can affect the results of the blood tests. In this study, Jerusalem artichoke concentrate (48.5 – 50.1% inulin) and its combination with the yeast *Saccharomyces cerevisiae* (strain 1026) were not found to significantly affect erythrocyte count, haemoglobin level and the haematocrit. A study with calves from birth to 6 months of age fed an additional 10 g of *S.cerevisiae* (*Yea-Sacc 1026*) per calf per day reported similar results. Yeast feeding did not significantly affect erythrocyte count and haemoglobin level (Mikolaychik et al., 2020). In another study with Holstein calves from 1 to 56 days of life fed prebiotic inulin at a doses of 3 g and 6 g per calf per day, this feed additive did not affect the erythrocyte count in calves of the study groups compared to those of the control group; similar observations were made for the haematocrit level. In contrast to the present study, on day 56, the level of haemoglobin in the red blood cells was significantly higher in the group of calves supplemented with 3 g of inulin per day, $p \leq 0.05$, than in the other groups (Król, 2011).

The literature suggests that white blood cell count is higher in calves than in adults and is more variable than other haematological parameters (Kraft, 1999). In the present study, the number of leukocytes in all groups of calves and also during the entire experiment was similar; it also did not change significantly depending on the age of the calves. Similar results on leukocyte count were obtained in the aforementioned study by Mikolaychik and colleagues (2020) with calves from birth to 6 months of age fed an additional 10 g of *S.cerevisiae* (*Yea-Sacc 1026*) per calf per day; this feed supplement did not affect the number of white blood cells in the blood. In contrast, Król (2011), in a study with Holstein calves from 1 to 56 days of life supplemented with 3 and 6 g of inulin per calf per day, noted that calves that received 6 g of inulin had a significantly higher white blood cell count compared to the other groups at day 56 of the study, $p < 0.05$. However, this study did not determine whether the feed additives directly affected leukocyte counts or whether they were affected by other factors, such as the general health of the calves or stress.

In the present study, the platelet count in all groups of calves on days 1, 28 and 56 was not significantly different, $p > 0.05$. Other authors have shown that the platelet count in calves increased during the first 3 months of life (Mohri et al., 2007; Brun-Hansen et al., 2006), but no such trend was observed here. Although the platelet count increased in all groups of calves and was higher in 8 – 9-week-old calves than in 4 – 5-week-old ones, the platelet count in 12 – 14-week-old calves was reduced and was even lower than at 4 – 5 weeks of age; however, this difference was not significant. Thus, the highest platelet count

in all groups was observed at 8 – 9 weeks, with the highest levels in the group of calves that received 12 g of Jerusalem artichoke concentrate containing 6 g of prebiotic inulin and 5 g of *S.cerevisiae* strain 1026. In a study with Holstein calves from 1 to 56 days of life supplemented with 3 and 6 g of inulin per calf per day, the lowest platelet count was observed at 2 to 4 days of age and at 56 days of age (8 weeks) in calves receiving inulin at 3 g per day, but the highest platelet count at 2 – 4 days of age and at 56 days of age was observed in calves receiving inulin at a dose of 6 g per calf per day. However, the differences between the groups were not significant (Król, 2011).

Total protein (TP), albumin and globulins are important biochemical parameters in the blood serum and can provide crucial information on the general health of an animal. In this study, the serum TP level increased with increasing age in all groups, but the lowest serum TP level on day 56 of the study was $59.4 \pm 2.63 \text{ g L}^{-1}$ in SynG calves, which was significantly lower than that in PreG calves $65.4 \pm 3.34 \text{ g L}^{-1}$, $p=0.017$. The total serum protein level of the control calves was $62.3 \pm 2.63 \text{ g L}^{-1}$ and did not differ significantly from that of the SynG and PreG calves. Similar results have been observed for yeast in a 12-week study in 75-day-old buffalo calves fed *S.cerevisiae* at 30 and 60 g per calf per day. At the end of the study, the serum TP level in these calves was not significantly different but still lower than that in the control calves (Abdalla et al., 2013). Contrary results were observed in a study in which sheep were fed *S.cerevisiae*. In sheep fed yeast, the serum TP level was higher than that in sheep of the control group (El-Ashry et al., 2003). Similar observations have been reported by Hossain and colleagues (2012) for calves fed *S.cerevisiae* at doses of 5 and 10 g. Also in this study, the serum TP level was higher in yeast-fed calves than in control calves, and it was significantly higher in calves fed 10 g of *S.cerevisiae* per day than in control calves, $p<0.05$. A study by Hassan et al. (2016), in which Holstein Friesian crossbred calves were additionally fed 2.5 and 5 g of *S.cerevisiae* per calf per day from birth to 90 days of age (*Yea-sacc 1026*), these calves also showed significantly higher serum TP levels than control calves, $p=0.004$. The authors explained these findings with the better absorption of protein from the digestive tract.

In the present study, the serum TP level was only marginally higher in the group receiving Jerusalem artichoke concentrate containing 48.5 – 50.1% prebiotic inulin than in the control calves. In contrast, Tóth and colleagues (2020), feeding prebiotic inulin at a dose of 18.7 g per calf per day, observed that on day 60 of the study, the serum TP level was significantly lower in the inulin-treated calves than in the control calves, $p<0.05$. This decreased in TP might have been caused by increased fermentation in the small intestine and the consequent increased inflow of nitrogen into the large intestine as a result of microbial processes (Verdonk et al., 1998).

Regarding albumin, its serum level was similar in all groups and did not differ significantly with increasing age of the calves, $p>0.05$. Similarly, in the above-

mentioned study by Hossain and colleagues (2012), using calves fed *S.cerevisiae* at doses of 5 and 10 g, no significant difference in albumin levels was observed between the groups of calves fed yeast and the control group. Similar results were obtained by Tóth and colleagues (2020) in a study with calves fed the prebiotic inulin at a dose of 18.7 g per calf per day. The researchers observed that inulin had no effect on serum albumin.

In the present study, the serum globulin levels in calves of the PreG and SynG groups increased with age, whereas in the CoG group, the globulin level decreased in the middle of the study but increased at the end of the study, as in the other groups. On day 56 of the study, the highest serum globulin levels were found in PreG calves $29.4 \pm 4.45 \text{ g L}^{-1}$, followed by CoG calves $28.7 \pm 1.70 \text{ g L}^{-1}$ and SynG calves $23.9 \pm 2.66 \text{ g L}^{-1}$; PreG calves had significantly higher serum globulin level than SynG calves, $p=0.042$. Similar results were obtained in a 12-week study in 75-day-old buffalo calves fed *S.cerevisiae* at 30 and 60 g per calf per day. Serum globulin level in these calves at the end of the study was lower than that in control calves, although this difference was not significant (Abdalla et al., 2013). The opposite results were obtained in a study by Hossain and colleagues (2012) with calves fed 5 and 10 g of *S.cerevisiae*; the serum globulin level was higher in yeast-fed calves than in control calves. Also in a study with 24 Holstein Friesian crossbred calves from birth to 90 days of age which were fed an additional 2.5 and 5 g of *S.cerevisiae* per calf per day (*Yea-sacc 1026*), significantly higher serum globulin levels were observed, $p=0.004$ (Hassan et al., 2016).

Based on the results for total serum protein, albumin and globulin levels, it cannot be unequivocally stated that feeding Jerusalem artichoke concentrate with its prebiotic inulin and *S.cerevisiae* strain 1026 can significantly affect the serum levels of these parameters.

In the framework of this study, the blood glucose levels in 4 – 14-week-old calves varied but did not differ significantly depending on the age of the calves; however, differences in blood glucose levels were observed depending on the feed supplement. Blood glucose levels were highest in the SynG group on days 1 and 28 of the study, but they did not significantly differ among all groups, $p>0.05$. In contrast, on day 56 of the study, the mean blood glucose level of CoG calves was significantly lower $5.3 \pm 0.38 \text{ mmol L}^{-1}$ than that in the group of calves that received Jerusalem artichoke concentrate in addition to their diet and in the group of calves that received this concentrate in combination with *S.cerevisiae* strain 1026 ($6.6 \pm 0.48 \text{ mmol L}^{-1}$, $p=0.001$ and $6.5 \pm 0.40 \text{ mmol L}^{-1}$, $p=0.002$, respectively). The higher blood glucose level in calves supplemented with *S.cerevisiae* could be explained by the fact that yeast improves nutrient digestion and increases the production of propionic acid in the rumen, which is further used to produce glucose during hepatic gluconeogenesis (Hassan et al., 2016). The results obtained here are similar to those observed by Hossain and colleagues (2012), who also noted that *S.cerevisiae* supplementation (5 and 10 g)

significantly increased ($p < 0.05$) the serum glucose level of growing calves. Similar observations have been made about the effect of this yeast on the blood glucose level in dairy cows (Szucs et al., 2013). In a study with 24 Holstein Friesian crossbred calves from birth to 90 days of age fed 2.5 and 5 g of *S.cerevisiae* strain 1026 per calf per day, significantly higher blood glucose levels were observed compared to the control group (Hassan et al., 2016). In contrast, Dobicki and colleagues (2005), in calves from birth to day 120 that received 1 – 4% of *S.cerevisiae* with milk and concentrate, showed significantly lower blood glucose levels ($p \leq 0.05$) for this group than for the control group.

Studies on the effects of the prebiotic inulin on blood glucose are contradictory. In several studies using the prebiotic inulin, feeding inulin did not affect the blood glucose level. For example, in a study with calves from birth to day 63, which received 18.7 g of inulin per calf per day in their diet, no significant differences in blood glucose levels were observed compared to control calves (Tóth et al., 2020). Contrary results were obtained in a study with Holstein calves fed an additional inulin dose of 3 and 6 g per calf per day from birth to day 56 of life. These calves had higher blood glucose levels at the end of the study than those in the control group, but this difference was not significant, $p > 0.05$ (Król, 2011). This could be explained by a higher amount of energy absorbed and the higher energy use in the tissues. In calves, higher blood glucose levels are closely associated with better weight gain (Król, 2011), which was also observed in the present study.

Regarding urea (UREA) and creatinine (CREA), the levels of these blood serum biochemistry parameters may be altered with renal impairment (Hammond, 1998). Several studies have shown that serum UREA levels vary with calf age and may be affected by the feed (Knowles et al., 2000; Abdalla et al., 2013). At the start of our study, the mean age of the calves was 32 ± 4 days, and at the end of the study, the age was 88 ± 4 days; the mean serum UREA levels of CoG and SynG calves increased over time and reached 4.5 ± 0.91 mmol L⁻¹, and 3.4 ± 0.47 mmol L⁻¹, respectively. In contrast, calves in the PreG group had even lower serum UREA levels at the end of the study than at the beginning of the study (3.2 ± 0.61 mmol L⁻¹ and 3.8 ± 0.54 mmol L⁻¹, respectively). Knowles and colleagues (2000), in an 83-day study with 14 calves, noticed a sharp decrease in UREA levels after birth until day 10, but after day 40, the blood UREA level gradually increased and reached the lower limit of the UREA reference range of adult cows at the end of the study. The serum UREA level at the end of the study in calves which received feed additives was lower than in CoG calves and it did not reach the lower limit normal reference range of adult cows (3.57 mmol L⁻¹) (Radostits et al., 2006). Similar results were obtained in a 12-week study with 75-day-old buffalo calves fed *S.cerevisiae* at 30 and 60 g per calf per day; the serum UREA level in these calves during the study was lower than that in the control calves (Abdalla et al., 2013). In another study with Holstein calves from 1 to 56 days of life supplemented with the prebiotic inulin

at 3 and 6 g per day per calf, the serum UREA level was significantly higher in the control group than in calves fed inulin, $p < 0.01$ and $p < 0.05$, respectively (Król, 2011). The UREA level in the blood decreases with increasing energy intake from food, most likely because of the more efficient use of the nitrogen contained in UREA in the rumen (Hammond, 1998) and the increase in protein synthesis in the rumen by microorganisms (Blowey et al., 1973). In another study in calves from birth to day 63, the serum UREA level was not reduced in the calf group that received 18.7 g of inulin per calf per day but was similar to the level detected in the control group (Tóth et al., 2020).

In the present study, the serum CREA level varied throughout the experimental period; only in the SynG calf group, the CREA level gradually increased with age. At day 56, the serum CREA level of $79.8 \pm 4.24 \text{ mmol L}^{-1}$ in CoG calves was significantly higher than those in PreG and SynG calves ($68.9 \pm 2.85 \text{ mmol L}^{-1}$, $p = 0.001$ and $70.1 \pm 3.58 \text{ mmol L}^{-1}$, $p = 0.003$, respectively). When comparing the mean serum CREA levels of PreG and SynG calves, a significant difference was found, $p = 0.001$. Similar results were obtained in a 12-week study in 75-day-old buffalo calves fed *S.cerevisiae* at 30 and 60 g per calf per day. The serum creatinine levels in these calves also varied over time, although the differences between the experimental and the control groups were not significant (Abdalla et al., 2013). As CREA is a product of the breakdown of creatine and creatine phosphate in the muscle (Yu, 2019), the serum concentrations of this indicator increase only under severe renal impairment (Kraft and Durr, 1999a). Thus, it can be concluded that the Jerusalem artichoke concentrate added to the diet and its combination with *S.cerevisiae* strain 1026 did not affect the metabolic processes in the muscles.

Both GGT (gamma-glutamyltransferase) and AST (aspartate aminotransferase) were evaluated to assess possible liver issues; the levels of both blood serum biochemical parameters did not differ significantly among all calf groups, $p > 0.05$. El-Ashry and colleagues (2001) and El-Shaer (2003) also found no significant effect on serum AST in studies with buffalo calves and sheep receiving yeast. Similarly, in another study with Holstein calves fed inulin at 3 and 6 g per day per calf from 1 to 56 days of life, the blood levels of ASAT did not differ significantly between calves in the inulin group and calves in the control group (Król, 2011).

The level of GGT in the blood serum determined within the framework of this study decreased with age, both in the groups of calves fed the feed supplements and in the control group; at 13 – 14 weeks, this indicator was already within the norms of adult cows. In contrast, the serum levels of ASAT were still lower than those in adult cows, although several studies have shown that ASAT in calves reaches the level of that in adult cows at approximately 8 – 10 weeks of life (Mohri et al., 2007). Thus, neither Jerusalem artichoke concentrate nor its combination with *S.cerevisiae* strain 1026 affects the serum levels of AST and GGT in calves.

2.2. Effects of feed additives on changes in calf live weight

Prebiotics can have a positive effect on ruminant productivity by enhancing the daily weight gain of calves during milk feeding and solid feeding periods and by improving the usability of feed during the solid feeding period (Heinrichs et al., 2009). The results of this study show that Jerusalem artichoke concentrate with its prebiotic inulin (48.5 – 50.1% of the total composition), which was added to calf feed once a day, promotes a faster increase in calf live weight.

The increase in live weight was higher in groups of calves fed 12 g Jerusalem artichoke concentrate (contains prebiotic inulin (6 g)) and 12 g Jerusalem artichoke concentrate (inulin content 6 g) in combination with 5 g *Saccharomyces cerevisiae* (strain 1026) than in calves in the control group. The mean live weight gain of the PreG group calves throughout the study was 65.8±6.57 kg, which was also significantly higher than that of the CoG group calves – 36.8±7.98 kg, $p=0.002$. Also, the increase in live weight of 62.6±13.75 kg for SynG calves was significantly higher than that for CoG calves, $p=0.004$ (Table 1).

Expressed as percentage, at the end of the study, the live weight had increased by 48.7% for the PreG group, by 48.2% for the SynG group and by 31.7% for the CoG group. Thus, live weight gain was 17% higher for PreG calves than for CoG calves but 16.5% higher for SynG calves than for CoG calves. These results are similar to those published by other researchers who used the prebiotic inulin in their studies and also observed significantly better increases in calf live weight (Verdonk, Van Leeuwen, 2004; Webb et al., 1992). Another study, using the same Jerusalem artichoke concentrate with an inulin content of 48.5 – 50.1% at doses 6, 12 and 24 g, also showed better weight gain in the prebiotic groups, especially in the group that received 24 g of Jerusalem artichoke concentrate containing 12 g of the prebiotic inulin per day (Ilgaza et al., 2016). Król (2011) observed good results in his 56-day study with 36 Holstein dairy calves. He fed calves with 3 and 6 g of inulin per day and found that calves receiving 6 g of inulin had a significantly higher live weight at the end of the study than calves receiving 3 g of inulin and calves from the control group, $p<0.01$.

Prebiotics have a positive effect on the gastrointestinal microbiome by promoting the growth and multiplication of the beneficial intestinal microflora and inhibiting the proliferation and adhesion of pathogenic microorganisms to the intestinal mucosa, which may also be a possible explanation for the better growth in calves (Król, 2011). However, it should be noted that in rumen of adult ruminants, intense enzymatic processes occur, and inulin may be completely fermented and may not reach further parts of the digestive tract (Van Leeuwen, Verdonk, 2004). In the rumen, prebiotics are mainly fermented by various bacteria that use them as an energy source (Samanta et al., 2013; Öztürk, 2008). Thus, in the rumen of adult ruminants, prebiotics may be fully fermented, and their effects may be lost. However, in calves fed mainly milk or milk replacer,

the rumen has not yet developed, and such calves can be considered monogastric animals for some time (Van Leeuwen, Verdonk, 2004). The rumination process in calves begins at about 6 to 8 weeks of age, and the rumen makes up about 70% of all stomach compartments. However, calves can be considered complete ruminants from the age of 12 weeks, when their rumen has developed to a level that can digest solid feed (Govil et al., 2017). Thus, it can be concluded that the effects of prebiotics, including inulin, are best seen in calves before they become complete ruminants. The calves included in our study were in the transition age from relatively monogastric to fully ruminant (mean age 4 to 5 weeks at the beginning of the study and 13 to 14 weeks at the end of the study), and it can therefore be assumed that the prebiotic inulin contained in Jerusalem artichoke was not fully fermented in the rumen but also reached further parts of the digestive canal.

In the present study, one group of calves was also fed synbiotic (12 g Jerusalem artichoke concentrate containing 6 g of the prebiotic inulin in combination with 5 g of *S.cerevisiae* strain 1026), which significantly improved the live weight gain of the calves over 56 days. At the end of the study, the increase in live weight of calves fed synbiotic was 62.6 ± 13.75 kg, which was significantly higher compared to the increase in live weight of CoG group calves 36.8 ± 7.98 kg, $p=0.004$. Previous studies have also shown that not only prebiotics or probiotics but also the combination of the two additives – synbiotics, can improve the growth performance of animals. For example, Lesmeister and co-authors (2004) observed that calves fed 2% *S.cerevisiae* over 42 day study had a 15.6% increase in live weight gain than calves in the control group. However, Roodposhti and Dabiri (2012) observed that the average daily weight gain of calves increased significantly when 1 g of probiotic containing seven bacterial strains and two yeast strains, with 2×10^9 CFU g^{-1} , and 4 g of prebiotic containing polysaccharides from the cell wall of *S.cerevisiae* were added to the feed for 8 weeks. Other authors reported that probiotics can be used successfully as growth promoters. For example, Di Francia and co-authors (2008) observed that the 12-week-long addition of *S.cerevisiae* yeast culture products to a diet of 10-day-old calves at a dosage of 26 g dry matter improved the mean daily weight gain compared to the control group. Similarly, in a study by Nehru and colleagues (2017), with 2-week-old Holstein crossbred calves fed the probiotic *S.cerevisiae* strain 1026 at 2 g (1×10^{10} CFU) for 16 weeks, there was a significant improvement in daily live weight gain (560.27 ± 8.56 g) compared to control calves (512.28 ± 6.52 g). Similar results were obtained in another study in which the yeast *S.cerevisiae*, at a dosage of 2.5 and 5 g, was added to the diet of 24 newborn Holstein calves for 90 days (Hassan et al., 2016). Another study, in which 7 – 10-day-old buffalo calves were fed Jerusalem artichoke meal at dosages of 8, 16 and 24 g per day over a period of 120 days, albeit with a much lower inulin content (15 – 20%), also showed increased weight gain in all groups of experimental calves compared to control calves (Khare et al., 2018). However,

other studies that have shown the opposite results. For example, Tóth and co-authors (2020), in their 60-day study with Holstein calves fed mannan oligosaccharides (MOS) at 18.7 g per day and inulin at 18.7 g per day, showed no positive effects on calf weight and daily weight gain compared to calves of the control group.

In the framework of our study, we wanted to find out whether the addition of 5 g of *S.cerevisiae* strain 1026 to 12 g of Jerusalem artichoke concentrate (inulin content 6 g) improved the weight gain of calves compared to the group of calves that only received 12 g of Jerusalem artichoke concentrate. Total weight gain and daily weight gain, although not significant, were higher in calves fed only Jerusalem artichoke concentrate containing the prebiotic inulin (total weight gain during the study of 65.8±6.57 kg and daily weight gain of 1.17±0.11 kg, respectively), but in combination with *S.cerevisiae* strain 1026, the growth rates of calves were not as high: 62.6±13.75 kg and 1.11±0.24 kg, although they were still significantly higher than those of control calves: 36.8±7.98 kg, 0.65±0.14 kg, $p=0.004$. This could be explained by the ability of the yeast to ferment the carbohydrate inulin. Lim and colleagues (2011) found that *S.cerevisiae* strain KCCM50549 can efficiently ferment inulin-containing carbohydrates in Jerusalem artichoke. Another strain of *S.cerevisiae* (NCYC625) can also ferment inulin, albeit to a lesser extent. Analysing the results obtained in the study, it can be assumed that it was the partial fermentation of inulin that caused the slightly lower growth rates in calves of the SynG group compared to those of the PreG group.

The economic benefit of selling one calf and considering the cost of the feed additive fed to calves, but excluding other costs related to the rearing of the calves (feed costs, veterinary expenses, salaries of farm workers and other expenses) was EUR 196.08 in the PreG group and EUR 186.60 in the SynG group, which was EUR 21.78 and EUR 12.30 more than for each calf in the control group, respectively.

2.3. Number of ghrelin-immunoreactive cells in the digestive tract of 13 – 14-week-old calves depending on the feed additives

Ghrelin is a hormone that plays an important role in the regulation of various physiological processes. It affects the growth and development of the body by promoting the release of growth hormone from the pituitary gland (Masuda et al., 2000; Date et al., 2000a) and plays an important role in regulating hunger and satiety (Coll et al., 2007; Stanley et al., 2005).

In ruminants, ghrelin is mainly produced in the endocrine cells of the abomasal mucosa (Hayashida et al., 2001). In the stomach, more ghrelin-

containing cells are found in the area of the fundic glands (Figure 1) and, albeit to a lesser extent, in the area of the pyloric glands.

Ghrelin-producing cells are also found in the intestines but are less abundant than in the abomasum and gradually decrease from the duodenum to the colon (Date et al. 2000a) (Figure 2).

In our study, the number of ghrelin-immunoreactive (IR) cells in the abomasum fundic gland area was higher in both control calves and calves that received feed additives in addition to feed than in the pyloric gland area; the number of these cells was markedly lower in the duodenum and in the middle part of the jejunum (Table 2).

In a study of 16 2-month-old sheep fed the same diet but with different feeding regimens (group 1 – *ad libitum*, group 2 – *ad libitum* and intravenous ghrelin injection (1 g kg^{-1}), group 3 – fed once daily, group 4 – fed twice a day), that lasted for 1 month, the number of ghrelin-IR cells in the cardiac, fundic and pyloric gland areas of the abomasum did not differ significantly among the different groups (Özfiliz et al., 2011). In our study, all groups of calves received the same standard diet and feeding regime, only the added feed additives differed. Thus, it can be assumed that it was the feed additives that affected the number of ghrelin IR cells. The numbers of ghrelin-IR cells in the abomasum, duodenum and jejunum were higher in control calves and lower in calf groups fed with Jerusalem artichoke concentrate or this concentrate in combination with *S.cerevisiae* strain 1026. For example, the number of ghrelin-IR cells in control calves in the area of the fundic glands of the abomasum was Me=12, IQR 10 – 14, PreG Me=6, IQR 4 – 9, but SynG Me=5, IQR 5 – 8 (Table 2). A higher number of ghrelin-IR cells in the gastrointestinal canal indicates a more pronounced ghrelin secretion. As ghrelin is produced in response to hunger and decreases after a meal when the animal has a feeling of satiety (Nakazato et al., 2001; Wren et al., 2000), it can be assumed that calves of the control group experienced greater hunger than calves who received feed additives. Various studies have shown that different feed additives can improve nutrient digestibility, and therefore, the same dose of feed keeps the animals feeling full and improves the usability of the food they have ingested. For example, Sullivan and Martin (1999) reported that the addition of *S.cerevisiae* to cow feed improved cellulose digestibility, whereas Samanta and colleagues (2012) found that the addition of the prebiotic fructooligosaccharides (FOS) to feed significantly improved the digestibility of organic matter and dry matter in the rumen.

There is limited information about the changes in the intake of ghrelin-IR cells due to food intake. However, in a study in rats, the number of ghrelin-IR cells in the stomach increased significantly after 7 days of fasting, but the number of active cells decreased to normal levels after eating (Sönmez, Ozan, 2007). Thus, elevated blood glucose levels inhibit ghrelin secretion after eating (Date et al., 2002b). However, in our study, no correlation was found between the number

of ghrelin-IR cells in different parts of the digestive canal and blood glucose levels, $r=0.080$ $n=9$ $p=0.839$.

A lower live weight could also indicate more pronounced hunger and poorer feed digestibility or lower feed intake over time. Although the live weight of calves in the control group was 115.3 ± 21.73 kg and was lower than that of calves supplemented with feed additives (PreG 130.0 ± 17.32 kg and SynG 119.0 ± 7.93 kg), no correlation was found between the number of ghrelin-IR cells in different parts of the digestive canal and the live weight of calves on day 56 of the study, $r=0.025$, $p=0.948$.

2.4. Changes in the internal pH of calves in different parts of the digestive canal depending on the feed additives (post-mortem)

Intensive microbial processes take place in the forestomachs, which result in the fermentation of various nutrients and the production of many different organic acids. Some of them may accumulate and lower the pH of the rumen content if the buffer capacity of the rumen fails to neutralise their effects. A low pH of the internal rumen environment over a long period can adversely affect food intake, the growth and activity of microorganisms in the rumen and the degradation of nutrients, resulting in acidosis, inflammation, laminitis, diarrhoea. Therefore, pH regulation of the internal environment of the rumen is the most important factor in maintaining optimal rumen functions (Chaucheyras-Durand et al., 2012).

In our study in calves, the pH of the internal environment (content) in different parts of the digestive canal was determined within 10 min after slaughter; Jerusalem artichoke concentrate (contains prebiotic inulin) and Jerusalem artichoke concentrate in combination with the yeast *S.cerevisiae* affected the pH in different parts of the digestive canal.

The pH of the internal environment in the area of the *atrium ruminis* was 7.5 ± 0.85 pH units for PreG group calves and 7.1 ± 0.12 pH units for CoG group calves. The pH in the rumen ventral sac was 7.5 ± 0.60 pH units for PreG group calves and 7.1 ± 0.10 pH units for CoG group calves. The values were similar for the groups; although the calves in the PreG group had a higher pH in the rumen, this difference was not statistically significant, $p>0.05$. Similar studies have shown that prebiotic inulin affects the pH of the rumen content by increasing it. For example, Król and co-authors (2011) carried out a 56-day study of 108 Holstein calves fed inulin at doses of 3 and 6 g per calf with a milk replacer and found a lower rumen pH in the control group, $p<0.05$, compared to the inulin group calves, especially in the group of calves receiving inulin 6 g day^{-1} . The same authors also studied the effect of MOS on the pH of the rumen content. They fed a prebiotic MOS at a dose of 4 g d^{-1} per calf and observed a significant

increase in rumen pH compared to control calves. Similar results were obtained with 3 and 6 g of this prebiotic. Contrary results were observed in an *in vitro* study using inulin from Jerusalem artichoke powder, which did not significantly affect the pH of the rumen content (Öztürk, 2008). Another *in vitro* study showed similar results and concluded that the prebiotic inulin did not significantly affect the pH of the rumen content (Umucalilar et al., 2010).

If the Jerusalem artichoke concentrate with the high level of inulin maintained the pH of the internal environment of the rumen at a high level, then the results of the study on synbiotic showed the opposite pattern. The pH of the internal environment in the rumen of the *atrium ruminis* for CoG group calves was close to neutral, with 7.1 ± 0.12 pH units, and significantly higher than that for SynG group calves, for which the rumen content reaction in this area was markedly acidic with 4.7 ± 0.15 pH units, $p=0.003$. A similar situation was observed in the rumen ventral sac. The SynG group calves showed a pH of 4.8 ± 0.30 pH units, which was significantly lower than that in the CoG group calves with pH 7.1 ± 0.10 pH units, $p < 0.001$. The rumen pH values of the PreG group calves were also significantly higher than those of the SynG group calves, $p \leq 0.001$ (Table 3).

Surprisingly, in the SynG group, the rumen pH values were markedly low because the calves may have been starved for too long before being slaughtered, which had resulted in an increased amount of volatile fatty acids in the rumen. Alternatively, the calves have been denied access to water for a long time, which reduced the amount of saliva. Saliva has buffering properties and can reduce the level of acid in the rumen. In the SynG group calves, the pH in the oral cavity was 7.6 ± 0.21 , significantly lower than in the PreG group calves with 8.6 ± 0.35 , $p=0.008$.

Decreased pH values of the rumen content in cows supplemented with *S.cerevisiae* have been reported by other researchers. For example, in a 60-day study with 36 Holstein cows fed *S.cerevisiae* (strain 47) at doses of 2, 4, 6, 8 and 10 g d⁻¹ per animal, the authors concluded that all animals in the experimental groups had a rumen content pH significantly ($p < 0.01$) lower than that of the control group (for example, the pH of the group fed 6 g of yeast was 6.11 ± 0.01 , but the pH of the control group was 6.3 ± 0.10 ; however, these differences were not statistically significant, $p > 0.05$ (Doležal et al., 2005).

Although in the above study, the authors obtained convincing results that yeast reduces the pH of the rumen content, in several studies, *S.cerevisiae* increased the pH of the internal environment of the rumen. In a study with Holstein cows fed 3 g of live yeast for 3 weeks (*BIOSAF Sc 47*), the authors observed that the rumen content had a significantly higher pH in cows fed yeast than in control cows, $p < 0.001$. In cows that received the yeast, the pH was 5.9 – 6.7 (mean 6.26), but in control cows, it ranged from 5.90 to 6.60 (mean 6.16) (Křížová et al., 2011). In another study with 20 calves fed 5 g of *S.cerevisiae* strain 1026 for 3 months, the authors observed that the pH of the rumen content was significantly higher in the probiotic group with 6.53 ± 0.06 pH

units than in the control calves with 6.1 ± 0.15 pH units, $p < 0.05$ (Eladawi et al. al., 2020).

In an *in vitro* study by Chaucheyras and colleagues (1996), *S.cerevisiae* was able to suppress *Streptococcus bovis* bacteria, which use sugars for their growth, because yeast cells had a higher ability to bind to sugars. This reduced the amount of freely available fermentable substrates required for bacterial growth, thereby reducing the amount of lactate produced and stabilising the pH of the rumen environment. Other authors have reported similar conclusions (Bach et al., 2007). Chaucheyras and colleagues (1996) observed that *S.cerevisiae* also stimulates the growth of cellulolytic bacteria, which also helps maintain a higher rumen pH.

In our study, the pH in the middle part of the colon was significantly higher in both PreG calves 6.5 ± 0.38 and CoG calves 6.0 ± 0.12 than in SynG calves 5.3 ± 0.15 ($p=0.044$ and $p=0.002$, respectively). We also observed that the pH of the calves of the prebiotic group was slightly higher than that of the calves of the control group in both the middle part of the jejunum and the middle part of the colon, although this difference was not significant, $p > 0.05$ (Table 4).

We could not find any previous studies on the effects of prebiotics, probiotics and synbiotics on ruminant intestinal pH. However, such studies have been performed on other animal species. Tzortzis and co-authors (2005) reported that the prebiotic inulin at a dose of 40 g kg^{-1} added to pig feed in a 33 – 35-day experiment significantly increased the number *Bifidobacterium*, increased acetic acid levels and decreased intestinal pH compared to the controls. These results were consistent with those reported by Juskiewicz and colleagues (2006), who observed a decrease in intestinal pH in turkeys fed 2% FOS for 8 weeks. Uyeno and colleagues (2015) claim that probiotics in cattle reduce the growth of pathogens in the intestine, reduce the pH of the contents and improve the immunity of the intestinal mucosa.

2.5. Effect of feeding Jerusalem artichoke concentrate and its combination with the yeast on the development of certain parts of the digestive canal of calves at 13 – 14 weeks of age

The transition period from milk feeding to solid feeding in calves is associated with various physiological and morphological changes in the digestive canal, which undergoes rapid microbial and structural changes (Meale et al., 2017). Different feed additives can affect the development of different rumen and intestinal structures in ruminants.

In the framework of this study, neither Jerusalem artichoke concentrate (contains prebiotic inulin) nor Jerusalem artichoke concentrate in combination with the yeast *S.cerevisiae* (strain 1026) had a significant effect on total stomach mass, forestomach and abomasum mass, $p > 0.05$. The highest total stomach mass

was 4.4±0.4 kg in PreG calves, followed by 3.6±0.22 kg in SynG calves and 3.9±0.53 kg in CoG calves. The forestomach mass (reticulum, rumen and omasum) was also highest in the PreG group calves with 3.7±0.3 kg, slightly lower in the CoG group calves with 3.2±0.39 kg and lowest in the SynG group calves with 2.9±0.38 kg. In turn, the weight of abomasum in CoG group and PreG group calves was 0.6±0.14 kg and 0.6±0.1 kg, respectively, whereas in SynG group calves, it was 0.7±0.16 kg.

The relative weights of the whole stomach, forestomaches and abomasum in relation to the body weight of calves did not differ significantly among the groups, $p>0.05$ (Table 5). Similar conclusions were reached by Xiao and colleagues (2016), who, in their study with calves receiving 0.5% and 1% *S.cerevisiae* fermentation products of dry matter for 52 days, found that this additive did not significantly affect rumen, reticulum, omasum and abomasum mass.

The percentage of the abomasum calculated from the total stomach volume in PreG group calves was 14.6%, whereas in SynG group calves, it was 19.8% and in CoG group calves 16.2%. However, the percentage of forestomach volume to the total stomach volume in the PreG group calves was 85.4%, whereas in the SynG group calves, it was 80.2% and in the CoG group calves 83.8%. However, the differences among groups were not statistically significant, $p>0.05$. The results obtained here are very similar to those observed in another study in 12 – 16-week-old calves. In calves of this age, the forestomaches account for 85% of the total stomach volume and the abomasum for 15% (Diao et al., 2017). It can be concluded that the feed additives used in our study did not significantly affect the development of normal anatomical multi-chambered stomach compartments in calves.

The effects of *S.cerevisiae* on structural and functional rumen development are still subject of debate. In our study, both synbiotic and prebiotic had a positive effect on the development of rumen papillae. Calves of the prebiotic group had better results regarding the papillae width of the rumen *saccus dorsalis* Me=344, IQR 312 – 431 μm , compared to the calves of the control group Me=282, IQR 246 – 341 μm , $p<0.001$, but in the area of the rumen *saccus ventralis*, longer and wider papillae were observed in calves of the prebiotic group compared to calves in the control group, although this difference was not statistically significant, $p>0.05$ (Table 6).

The width of the papillae of SynG calves in the rumen *saccus dorsalis* Me=371, IQR 310 – 475 μm was significantly larger than in the calves of the control group Me=282, IQR 246 – 341 μm , $p<0.001$ and the papillae length in the rumen *saccus ventralis* Me=1647, IQR 1304 – 2203 μm was significantly higher than that in control calves Me=1113, IQR 850 – 1578 μm , $p<0.001$. These results are similar to those obtained in a 5-week experiment using fermentation products of *S.cerevisiae* at a dose of 1 g per calf per day and 3.5 g per calf per day where the papillae in the calf rumen were longer and wider (Brewer et al.,

2014). These observations are consistent with the results reported by Xiao and colleagues (2016) for a 52-day-long experiment using *S.cerevisiae* fermentation products at doses of 0.5% and 1%. In addition, for those calves fed *S.cerevisiae*, the authors also observed a decrease in crypt depth in the jejunum.

The SynG calves of the present study showed significantly longer papillae both in the rumen *saccus dorsalis* and the rumen *saccus ventralis* compared to those in the group that received only Jerusalem artichoke concentrate. This suggests that the addition of *S.cerevisiae* (strain 1026) to Jerusalem artichoke concentrate could potentially accelerate the development of rumen papillae. This is in contrast to what was reported by Magalhães and colleagues (2008) for a 70-day experiment where calves were fed a yeast culture (2% of dry matter) and no significant change in rumen development was observed. Similar results were observed by Kaldmae and colleagues (2008), who found no significant differences in the length and width of the rumen papillae and the thickness of the rumen wall in calves at 1 and 2 months of age when *S.cerevisiae* was fed at dose 2% of the dry matter for 2 months.

In a 42-day study, a 2% yeast culture only slightly improved rumen development in calves (Lesmeister, 2004). In this study, the authors observed that calves in the probiotic group had longer and wider rumen papillae, but these changes were not significant.

In our study, the thickness of the *stratum corneum* of the rumen *saccus dorsalis* and *saccus ventralis* was significantly lower in the control group calves (in both areas Me=9, IQR 7 – 12 μm) compared to SynG (Me=17, IQR 14 – 22 μm and Me=25, IQR 15 – 32 μm , respectively) and PreG group calves (Me=33, IQR 24 – 38 μm and Me=29, IQR 24 – 36 μm respectively), $p<0.001$ (Table 6). The cytoplasm of the cells of this rumen mucosal layer contains large amounts of keratin, which acts as a physical barrier and reduces the transport of volatile fatty acids to the deeper layers of the epithelium (Hinders, Owen, 1965). In addition, the total thickness of the ruminal epithelium was significantly smaller in CoG group calves than in SynG and PreG group calves, $p<0.001$. Contrary results about the *stratum corneum* and the total thickness of the ruminal epithelium were obtained in a study in sheep. In this study, yeast *S.cerevisiae* at a dose of 2 g per kg dry matter, MOS at a dose of 2 g per kg dry matter and a combination of both at the same dose were added to the diet for 42 days, and sheep in the MOS and synbiotic groups showed a thinner *stratum corneum* in the rumen compared to those in the control group, $p<0.01$. The total thickness of the ruminal epithelium was lower in sheep receiving MOS compared to the group receiving *S.cerevisiae* feed supplement, $p<0.03$, but these supplements did not affect the width of the rumen papillae (Diaz et al., 2018).

In our study, the mucous membrane of the abomasum in the area of cardiac glands was significantly thicker in SynG Me=610, IQR 585 – 642 μm and PreG group calves Me=571, IQR 544 - 591 μm than in CoG group calves Me=510, IQR 472 - 558 μm , $p <0.001$. In addition, the mucosal thickness of SynG group

calves in this zone was significantly greater than that of PreG group calves, $p < 0.001$.

Mucosal thickness in the fundic gland area was significantly higher in calves of the SynG group $Me=673$, IQR 632 – 752 μm than in calves of the CoG group $Me=581$, IQR 515 – 657 μm and the PreG group $Me=620$, IQR 575 – 660 μm , $p < 0.001$.

The thickness of the mucous membrane in the area of the pyloric glands was significantly higher for PreG group calves $Me=912$, IQR 852 – 1100 μm than for CoG group calves $Me=834$, IQR 787 - 896 μm and SynG group calves $Me=854$, IQR 792 – 900 μm , $p < 0.001$ (Table 7). Thus, both Jerusalem artichoke concentrate and this feed additive in combination with *S.cerevisiae* strain 1026 contributed to the increase in abomasal wall thickness and helped to protect the abomasal wall from the adverse effects of gastric acid.

Little information is available on the effects of *S.cerevisiae* on digestive processes in intestines and intestinal development in ruminants, most likely because yeast cultures are thought to operate primarily in the rumen. In a study with sheep, Durand-Chaucheyras and co-authors (1998) observed that yeast cells remained alive in the intestines, suggesting that the effects of yeast may also be seen in other parts of the digestive canal than just the rumen.

In our study, significant differences were observed between the synbiotic and control group calves in parameters such as the thickness of the entire intestinal wall in the middle of the duodenum, jejunum, ileum and in the middle of the colon as well as the thickness of the mucosa (villi and crypt depth) in the middle of the ileum and the crypt depth in the colon. All values of these parameters were significantly higher in calves from the synbiotic group. Other studies have provided evidence of yeast activity in the intestines, such as a study by Xiao and colleagues (2016), in which calves were fed *S.cerevisiae* fermentation products at doses of 0.5% and 1% of dry matter for 52 days. The researchers observed longer villi in the duodenum, jejunum and ileum, as well as a smaller crypt depth in the jejunum (Table 8).

Similar results were observed in a study in piglets, where the authors reported that piglets fed *S.cerevisiae* fermentation products at a dose of 5 g kg^{-1} for 21 days had longer villi in the jejunum than control animals (Shen et al., 2009). In a study with broilers, in which the fermentation products of *S.cerevisiae* were fed at 2.5, 5 and 7.5 g kg^{-1} for 42 days, broilers receiving the yeast had longer duodenal villi; however, the lowest crypt depth in the duodenum, jejunum and ileum was observed in broilers fed 2.5 g of probiotic compared to the control group and the other two probiotic dose groups, but the greatest crypt depth was observed in the group fed 7.5 g of *S.cerevisiae* yeast culture supplement (Gao et al., 2008).

In the present study, the thickness of the entire intestinal wall (villi length and depth of crypt) in the middle part of the duodenum, jejunum and ileum, as well as the mucosal thickness in the middle of the jejunum and ileum, was

significantly greater in the prebiotic group than in the control group. In a study using inulin, a similar effect on the intestines was observed as in our study. The study was performed with broilers fed 1% inulin for 5 weeks and showed a significant increase in the length of the villi in the jejunum, as well as deeper crypts in the inulin group (Rehman et al., 2007). This positive effect of prebiotics on the growth and development of the small and large intestinal mucosa could be explained by the synthesis of polyamines from prebiotics essential for intestinal development (Dzelzenne et al., 2000) or by inulin fermentation, which facilitates short-chain fatty acid production. These acids can promote cell proliferation in the small and large intestine and result in increased villi length and crypt depth (Samal, Behura, 2015). However, the opposite results have been observed in several other studies. For example, Masanetz and colleagues (2010) reported that in a 20-week experiment in calves fed 2% prebiotic inulin, the length of villi in the jejunum and ileum was shorter than in control calves. These results are in line with those reported by Pierce and colleagues (2005), who observed a similar reduction in villi length after 28 days of inulin addition to piglets at a dose of 15 g kg⁻¹.

The morphological development of the intestines essentially indicates the health state of the entire digestive canal of the animal. Nutrient absorption decreases with decreasing intestinal villi length (Anonymous, 1999). New epithelial cells are produced in the crypt of the intestinal mucosa and migrate through the intestinal villi to the apical end (Schat and Myers, 1991), and the crypts are therefore considered the "factory" of the villi. Deeper crypts may indicate faster cell replacement for successful villi regeneration. It is the host's intestinal response mechanism that seeks to compensate for the physiological replacement of villi and the atrophy of pathological villi resulting from inflammation caused by pathogens and their toxins. Longer villi indicate more mature epithelium and improved absorption due to the increased absorption surface area. Longer villi also increase the activity of enzymes secreted at their apical end, resulting in improved nutrient digestibility (Anonymous, 1999; Newbold et al., 1996).

2.6. Effect of feeding Jerusalem artichoke concentrate (containing prebiotic inulin) and its combination with *S.cerevisiae* strain 1026 on methanogens and the amounts of CH₄ and CO₂ produced in the rumen of calves

Methanogenesis is a physiological process that produces methane primarily from the hydrolysis of carbohydrates (Kristensen et al., 2011; Johnson, Johnson, 1995). Enteral CH₄ is produced by methanogenic microorganisms belonging to the *Archaea* domain, phylum *Euryarchaeota* (Balch et al., 1979). In ruminants,

methanogenesis occurs primarily in the rumen, to a lesser extent in the large intestine (Muñoz et al., 2012).

In general, a wide variety of microorganisms can be found in the rumen, with a variety of prokaryotes, eukaryotes and several species of methanogens (Kumar et al., 2009; Guo et al., 2005). The most common genus of methanogens in cattle rumen is *Methanobrevibacter* (Henderson et al., 2015; Leahy et al., 2013). Wright and colleagues (2007) identified *Methanobrevibacter ruminantium*, *Methanobrevibacter thaueri*, *Methanobrevibacter smithii* and *Methanosphaera stadtmanae* as the main methanogenic species in the rumen of cattle. The results of this study were similar to those of Whitford and colleagues (2001), but the researchers observed that *M.ruminantium* was the most common methanogenic species, followed by *M.stadtmanae*.

Methanogens produce CH₄ under anaerobic conditions (Guo et al., 2005). For example, *M.smithii* produces CH₄ from CO₂, H₂, and formate, whereas *M.stadtmanae* produces CH₄ only by converting methanol with H₂ (Carberry et al., 2014). Certain methanogens of the genus *Methanobrevibacter* (*M.smithii*, *Methanobrevibacter gottschalkii*, *Methanobrevibacter millerae* and *M.thaueri*) are mentioned as the main producers of CH₄ in the cow rumen (Danielsson et al., 2014).

In our study, the occurrence of total prokaryotes (i.e., bacteria and methanogens) and total methanogens in calf rumen fluid differed significantly among groups. However, the occurrence of total prokaryotes and total methanogens in faeces, as well as of the individual methanogenic species *M.stadtmanae*, *M.ruminantium* and *M.smithii* in calf rumen fluid did not differ significantly between groups, $p>0.05$.

The total prokaryotes (bacteria and methanogens) in the rumen of the SynG group calves, which were fed with inulin-containing Jerusalem artichoke concentrate, were significantly less abundant compared to those of the PreG calves, $p=0.004$, and those of the CoG calves (Table 9).

The yeast *S.cerevisiae* affects the microbiome of the digestive canal in calves, for example by promoting the growth and activity of lactic acid-using bacteria in the rumen (Jouany, 2001; Girard et al., 1993), and impacts the morphological development of the digestive canal (increasing the length and width of the papillae in the rumen) (Brewer et al. al., 2014; Lesmeister et al., 2004). It also increases the number of papillae per unit area of the rumen (Gäbel et al., 1991), but in the duodenum, jejunum and ileum, it increases villi length and reduces crypt depth throughout the small intestine (Xiao et al., 2016).

Several studies have been published on the effects of feed additives on the total numbers of bacteria and methanogens in the digestive canal in different animal species. In the rumen fluid samples of the SynG calf group, a significantly higher number of total methanogens was observed compared to the prebiotic group, $p=0.003$, and the number was higher than that in the CoG calves. These results are similar to those observed by Ding and colleagues (2014), who reported

that *S.cerevisiae* may increase the total numbers of bacteria, fungi and protozoa in the rumen. Dawson and co-authors (1990) reported an increase in the number of cellulolytic bacteria in the rumen in Jersey cattle fed the probiotic *S.cerevisiae* (2.04×10^9 CFU g⁻¹) at a dose of 1 g per kg of feed for 10 days. Similar results were observed in a 6-week study by Kumar et al. (1997) with buffalo calves fed 5 g of *S.cerevisiae* strain 1026. Agarwal and colleagues (2002) performed an experiment on newborn calves fed *S.cerevisiae* NCDC-49, 10^6 CFU mL⁻¹, for 24 weeks and concluded that the probiotic did not affect the microbial population of the rumen. Ogunade and co-authors (2019) observed that *S.cerevisiae* at a dose of 15 g d⁻¹ increased the production of CH₄ in cattle in a 25-day experiment due to an increase in the number of *M.ruminantium* in the rumen of these cattle, which is one of the major methane-producing species in cattle (Whitford et al., 2001). Other authors reported opposite results. For example, Galindo and co-authors (2010) observed a reduced number of methanogens in a 24-h *in vitro* experiment when *S.cerevisiae* was added to Bermuda grass (*Cynodon nlemfuensis*), which was used as a fermentation substrate.

The individual methanogen species determined in our study did not differ significantly among the groups. However, two of them – *M.stadtmanae* and *M.smithii* – were found in smaller numbers in the rumen fluid of calves of the SynG group than in the rumen fluid of calves of the PreG and CoG groups. It is possible that the increased number of total methanogens in calves of the SynG group could be due to other methanogenic species that were not determined in the development of this study.

In the pooled faecal samples, the occurrence of total prokaryotes (i.e., bacteria and methanogens), total methanogens and the methanogenic species *M.stadtmanae*, *M.ruminantium* and *M.smithii* did not differ significantly among the groups, $p > 0.05$.

Based on the results, there is no evidence that Jerusalem artichoke concentrate and the combination of this concentrate with the yeast *S.cerevisiae* affect the occurrence of *Methanosphaera stadtmanae*, *Methanobrevibacter ruminantium* and *Methanobrevibacter smithii* in the calf's rumen and faeces.

Methane production in the rumen and large intestine is clearly affected by methanogenic microorganisms and their numbers. Methane is the main gas produced in the digestive canal of animals, intensifying the greenhouse effect. The total anthropogenic CH₄ emissions from the agricultural sector account for about 47 – 56% (Shibata, Terada, 2010; Smith et al., 2007), 50 – 60% (Ellis et al., 2007) and are mainly derived from the livestock sector. Many researchers have experimented with the use of various feed additives to reduce the production and emission of enteral CH₄. However, there are few studies on the effects of the prebiotic inulin on CH₄ production in ruminants. The effect of 12 g Jerusalem artichoke concentrate (inulin content 6 g) as well as the effects of synbiotic (*S.cerevisiae* strain 1026 at dose 5 g and Jerusalem artichoke concentrate at a

dose of 12 g) on the production of CH₄ and CO₂ in the rumen of calves were studied.

The amount of CH₄ produced in the calf rumen in the PreG group Me=802.09, IQR 708.65 – 1076.77 mg m⁻³ at the end of the study was higher than in CoG Me=792.06, IQR 755.06 – 873.59 mg m⁻³, although this difference was not statistically significant, p>0.05 (Table 10).

However, regarding the amount of CH₄ produced per 1 kg body weight, at the end of the study, it was lower in PreG group calves Me=5.49, IQR 4.97 – 9.15 mg m⁻³ than in CoG group calves Me=7.10, IQR 6.35 – 9.19 mg m⁻³. Although in PreG this value was lower than in the control group, this difference was not statistically significant, p>0.05.

The overall results for Jerusalem artichoke concentrate and the amount of CH₄ produced were contrary to the observation of other authors that the prebiotic inulin may reduce CH₄ production in ruminants (Roonaal, 2015; Charalampopoulos, Rastall, 2009; Zhou et al., 2004). Hindrichsen and co-authors (2004) conducted an *in vitro* study using artificial rumen (RUSITEC) in a 10-day experiment; Jerusalem artichoke root supplement containing the prebiotic inulin had a positive effect on CH₄ reduction. Other researchers have compared the effects of inulin and starch on CH₄ production, with mixed results. For example, Czerkawski and Breckenridge (1969), in an *in vitro* study using 1.5 g of inulin, observed that 4.2 mL of CH₄ was produced in the first hour, whereas starch produced only 0.6 mL of CH₄. However, Poulsen and co-authors (2012) found no significant difference in *in vitro* CH₄ production among inulin, wheat and corn starch after 48 h. In contrast, Zhao and colleagues (2014) observed that the *in vitro* production of CH₄ was lower for inulin compared to starch.

Other prebiotics can be used more effectively to reduce CH₄ production in ruminants. For example, the addition of galacto-oligosaccharides (GOS) to feed effectively reduces CH₄ production in dairy cows by as much as 11% (Charalampopoulos, Rastall, 2009). Mwenya and co-authors (2004b) also observed a 11% reduction in CH₄ in the GOS group compared to the control group in Holstein cows. However, it should be noted that these two studies on GOS were performed in adult dairy cows, and therefore, the results could be different in studies on calves. In an *in vitro* study, Zheng and co-authors (2019) observed that MOS at the dose 5 – 6% resulted in the lowest production of CH₄ and CO₂.

Regarding the amount of CO₂ produced in the rumen, on day 1 of the study, the CO₂ concentration in the rumen for PreG calves Me=3939.60, IQR 3688.75 – 4815.07 mg m⁻³ was significantly higher than for CoG calves Me=3258.54, IQR 2864.08 – 3506.88 mg m⁻³, p<0.001. On day 28 of the study, the CO₂ concentration in the rumen of calves was significantly lower for PreG calves Me=3908.24, IQR 3634.82 – 4288.28 than for CoG group calves Me=4618.15, IQR 4378.59 – 4756.74, p<0.001. However, at the end of the study, the CO₂ level was significantly higher for PreG group calves Me=4727.27,

IQR 4503.39 – 4978.12 mg m⁻³ than for CoG group calves Me=4251.28, IQR 4045.58 – 4426.25 mg m⁻³, p<0.001.

Similar to the amount of CH₄ per kg of live weight, the amount of CO₂ per kg of live weight at the end of the study was lower in PreG calves Me=33.09, IQR 30.54 – 43.54 mg m⁻³ compared to CoG calves Me=36.72, IQR 34.63 – 37.07 mg m⁻³, although this difference was not significant, p>0.05.

We found no studies on the prebiotic inulin and its effect on CO₂ production in the rumen, but Zheng and co-authors (2019), in their *in vitro* study using the prebiotic MOS, found that MOS at 2% kg⁻¹ feed most significantly reduced CO₂ production. However, the results of their study were contradictory as the same additive at the dose of 2.5% – 4.5% contributed to the highest CO₂ production, whereas feeding MOS at the dose of 5.0% – 6.0% showed a decrease in CO₂ production.

Carbon dioxide is one of the most important greenhouse gases, but livestock are not considered to be significant emitters of this gas because the CO₂ produced by animals is part of the carbon cycle. Plants assimilate approximately the same amount of CO₂ as animals exhale, and much of the carbon ingested by plants in the rumen is converted to CH₄, which is absorbed into animal tissues and excreted in milk (Chianese et al., 2009a; IPCC 2001). This explains why the amount of CO₂ produced in rumen is generally not determined. In our study, both CH₄ and CO₂ levels were higher in the PreG group calves than in the CoG group calves at the end of the study. The higher amount of CH₄ produced could be explained by the fact that methanogenic microorganisms use CO₂ and H₂ for CH₄ production (Van Zijderveld et al., 2011), and the higher the amounts of these substances, the more gas is produced. In contrast, a higher amount of CO₂ in the rumen of calves in the PreG group could be associated with a higher intake of plant feed, in which the bound carbon in the rumen is converted back to CO₂ (IPCC 2001).

The SynG group calves were fed 12 g of Jerusalem artichoke concentrate, containing 6 g of the prebiotic inulin, and 5 g of *S.cerevisiae* strain 1026. There are few studies on the prebiotic inulin and its effect on CH₄ production, and the results are controversial. Some even show that this prebiotic promotes CH₄ production. However, in a large number of studies, probiotics reduced the production of these gases in the rumen.

Within the framework of this study, the amount of CH₄ in the rumen of SynG group calves on the day 28 of the study was significantly lower Me=659.11, IQR 565.04 – 1015.32 mg m⁻³ than that in the CoG group calves Me=1052.94, IQR 983.33 – 1111.89 mg m⁻³ and PreG calves Me=847.25, IQR 812.13 – 879.86 mg m⁻³, p<0.001. On day 56, the amount of CH₄ in the rumen was significantly lower in SynG calves Me=675.41, IQR 653.46 – 700.50 mg m⁻³ than in PreG calves Me=802.09, IQR 708.65 – 1076.77 mg m⁻³ and CoG calves Me=792.06, IQR 755.06 – 873.59 mg m⁻³, p<0.001. The amount of CH₄ produced per kg of live weight of calves in the SynG group on days 28 and 56 of

the study was also lower than those in the PreG group and CoG group calves, although, these differences were not significant, $p > 0.05$. Based on the results, Jerusalem artichoke concentrate at a dose of 12 g (inulin content 6 g) does not significantly reduce CH₄ and CO₂ production in the calf rumen. This suggests that Jerusalem artichoke concentrate alone cannot affect the amounts of these gases in the rumen, whereas in combination with *S.cerevisiae* strain 1026, it can reduce the amounts of CH₄ and CO₂ produced in the rumen.

The results observed in the calves of SynG group regarding the amount of CH₄ in the rumen are similar to those obtained in previous studies. For example, Chung and co-authors (2011) concluded that yeast cultures added to feed improve the productivity of both lactating and growing animals. Yeasts can alter fermentation processes in the rumen and promote the growth and multiplication of acetogenic bacteria, which in turn compete with methanogenic microorganisms and use CO₂ and H₂, which are also required for methanogenic growth, thus reducing CH₄ production (Haque, 2018; Mwenya et al., 2004b; Chaucheyras et al., 1995). This was also confirmed in a 5-day long *in vitro* experiment (Chaucheyras et al., 1995), and similar results were obtained in other *in vitro* studies. Hernandez and co-authors (2017) reported that *S.cerevisiae* at a dose of 2 and 4 g in a 70-h *in vitro* study using the rumen content of 60-day-old Holstein calves reduced CH₄ production compared to controls. Newbold and Rode (2006) also reported a 58% reduction in CH₄ production with *S.cerevisiae* in an *in vitro* study.

There are also studies in which no reduction in CH₄ was observed. For example, Oh and co-authors (2019) used *S.cerevisiae* at a dose of 28 g d⁻¹ per cow in 18 Holstein cows in three 28-day study periods and concluded that this additive did not affect CH₄ nor CO₂ production.

However, it should be noted that in some studies, *S.cerevisiae* increased the CH₄ production in the rumen. This was observed in a 25-day long experiment performed by Ogunade and co-authors (2019), during which cattle were additionally fed *S.cerevisiae* at a dose of 15 g d⁻¹. The authors explained this increase in CH₄ production by an increase in the number of the methanogens *M.ruminantium* in the rumen.

The amount of CO₂ produced in the rumen of calves on day 1 of the study was significantly lower in SynG group calves Me=2701.65, IQR 2419.45 – 3042.81 mg m⁻³ than in CoG calves Me=3258.54, IQR 2864.08 – 3506.88 mg m⁻³, $p < 0.001$; on day 28, it was also significantly lower Me=4263.82, IQR 3553.29 – 4599.96 than in CoG group calves Me=4618.15, IQR 4378.59 – 4756.74, $p < 0.001$ and at the end of the study also SynG group calves had significantly lower CO₂ values in the rumen Me=3266.07, IQR 1358.98 – 4584.91 mg m⁻³ than CoG group calves Me=4251.28, IQR 4045.58 – 4426.25 mg m⁻³, $p < 0.001$, and the concentration of this gas was also significantly lower in SynG group calves than in PreG group calves Me=4727.27, IQR 4503.39 – 4978.12 mg m⁻³, $p < 0.001$. Thus, the results

of our study show that feeding *S.cerevisiae* together with Jerusalem artichoke concentrate (inulin content 50%) in concentrates can reduce CO₂ production. These results are in contrast to the previously mentioned *in vitro* study by Hernandez and his colleagues (2017) on the use of *S.cerevisiae* at doses of 2 and 4 g; the authors found that this yeast supplement significantly increases CO₂ production. On the other hand, regarding the amount of CO₂ produced per 1 kg of live weight, for SynG group calves, this value was highest Me=38.47, IQR 9.61 – 62.95 mg m⁻³ compared to CoG – Me=36.72, IQR 34.63 – 37.07 mg m⁻³ and PreG group calves Me=33.09, IQR 30.54 – 43.54 mg m⁻³, p>0.05. It should be noted that we found no scientific publications on the effects of *S.cerevisiae* and its combination with prebiotics (including inulin) on CO₂ production in the calf rumen.

CONCLUSIONS

1. Feeding of Jerusalem artichoke concentrate (12 g) containing the prebiotic inulin (6 g) and its combination with yeast *S.cerevisiae* strain 1026 (5 g) during the transition from milk to solid feeding in calves maintained faecal consistency as well as basic physiological, haematological and biochemical blood parameters within the age-appropriate range.
2. Feeding Jerusalem artichoke concentrate and its combination with *S.cerevisiae* for 56 days, despite the additional costs, is economically advantageous as it provided a 17% and 16.5% increase in live weight compared to the control group. However, the cost of feeding the synbiotic was higher, which reduced the expected income.
3. In calves at 13 to 14 weeks of age, ghrelin-immunoreactive cells are found not only in the area of the fundic and pyloric glands of the abomasum but also in the middle of the duodenum and jejunum. Feeding feed additives (Jerusalem artichoke concentrate or its synbiotic with yeast) significantly reduced the number of these cells in the area of the fundic glands in the abomasum (p <0.001), compared to the control group, which indirectly indicates better digestion and satiety.

4. Feeding Jerusalem artichoke concentrate and its combination with yeast did not affect the total and relative weight of the stomach compared to the control group, but significantly ($p < 0.001$) increased the width of the papillae in the rumen *saccus dorsalis*, the thickness of the epithelium including the *stratum corneum* in the rumen *saccus dorsalis*, *ventralis* and the thickness of all mucosal gland areas of the abomasum, as well as the thickness of the walls of the duodenum and jejunum, the thickness of the mucosa of the jejunum and the ileum, providing a larger absorption surface area.
5. Synbiotic feeding significantly ($p < 0.001$) increased the thickness of the intestinal wall of the duodenum, jejunum and colon and the depth of crypts of the colon compared to calves of the prebiotic group. Thus, the addition of the yeast *S.cerevisiae* to Jerusalem artichoke concentrate promoted the development of these intestinal wall microstructures.
6. Despite the fact that the numbers of total prokaryotes and methanogens in the rumen fluid of 13 – 14-week-old calves did not differ significantly between the experimental and the control groups, the group of calves fed Jerusalem artichoke concentrate in combination with *S.cerevisiae* had significantly lower rumen ($p < 0.001$) CH₄ and CO₂ levels than calves receiving Jerusalem artichoke concentrate and control calves. The yeast in the synbiotic can alter the fermentation processes in the rumen, promoting the growth and multiplication of acetogenic bacteria that compete with methanogens for the use of CO₂ and H₂, thus reducing both the amount of CO₂ freely available in the rumen and the production of CH₄.
7. Feeding of Jerusalem artichoke concentrate and its synbiotic with *S.cerevisiae* strain 1026 to calves during the transition from milk to solid feed improved the weight gain of the calves and the development of the digestive canal compared to the control group. However, the addition of yeast to Jerusalem artichoke concentrate did not significantly improve weight gain but significantly ($p < 0.001$) reduced the CO₂ and CH₄ production in the rumen.

RECOMMENDATIONS FOR PRACTICE

1. Feeding Jerusalem artichoke concentrate alone and in combination with *S.cerevisiae* to calves during the transition from milk to solid feed is recommended as it promotes the development and functionality of the digestive canal and stabilises health.

2. From an economic point of view, it is more beneficial to feed Jerusalem artichoke concentrate because its addition to concentrates (12 g per 1 calf per day) for calves from 4 to 14 weeks of age increases the live weight gain by 17%, which can provide additional income of about 22 EUR per calf.
3. Although feeding Jerusalem artichoke concentrate to calves results in a 0.5% increase in live weight, in terms of reducing greenhouse gas emissions, it is better to feed a synbiotic containing 12 g of Jerusalem artichoke concentrate and 5 g of *S.cerevisiae* strain 1026 as it significantly ($p<0.001$) reduces the production of CH₄ and CO₂ in the rumen.