

**LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS
VETERINARIJOS AKADEMIJA**

Veterinarijos fakultetas

Ieva Kasradze

**Amžiaus įtaka veršelių didžiojo prieskrandžio turinio
fermentacinių procesų aktyvumui
The influence of age on the activity of fermentation processes
in rumen contents of calves**

Veterinarinės medicinos vientisųjų studijų
MAGISTRO BAIGIAMASIS DARBAS

Darbo vadovas: prof. dr. Rasa Želvytė

Kaunas, 2024

DARBAS ATLIKTAS ANATOMIJOS IR FIZIOLOGIJOS KATEDROJE

PATVIRTINIMAS APIE ATLIKTO DARBO SAVARANKIŠKUMĄ

Patvirtinu, kad įteikiamas magistro baigiamasis darbas „Amžiaus įtaka veršelių didžiojo prieskrandžio turinio fermentacinių procesų aktyvumui“:

1. yra atliktas mano pačios;
2. nebuvo naudotas kitame universitete Lietuvoje ir užsienyje;
3. nenaudojau šaltinių, kurie nėra nurodyti darbe, ir pateikiu visą naudotos literatūros sąrašą.

2024-03-28

(data)

Jeva Kasnadze

(autoriaus vardas, pavardė)



(parašas)

PATVIRTINIMAS APIE DARBO LIETUVIŲ KALBOS TAISYKLINGUMĄ

Patvirtinu, kad darbo lietuvių kalba taisyklinga.

2024-03-28

(data)

Jeva Kasnadze

(autoriaus vardas, pavardė)



(parašas)

IŠVADA DĖL DARBO GYNIMO

Darbas (ne-)atitinka reikalavimus ir yra (nėra) parengtas gynimui

2024-04-29

(aprobacijos padalinyje data)

2024-VAFO1-01-05

(Padalinio protokolo Nr.)

TURINYS

SANTRAUKA	4
SUMMARY	5
SANTRUMPOS	6
ĮVADAS.....	8
1. LITERATŪROS APŽVALGA	10
1.1 Veršelių didžiojo prieskrandžio vystymasis	10
1.1.1 Didžiojo prieskrandžio anatomicinis vystymasis	10
1.1.2 Didžiojo prieskrandžio fermentacinis brendimas	12
1.2 Mikroorganizmų kolonizacija didžiajame prieskrandyje	13
1.2.1 Bakterijų kolonijų augimas didžiajame prieskrandyje	13
1.2.2 Pirmuonių dauginimasis didžiajame prieskrandyje	14
1.3 Veršelių nujunkymas	15
2. TYRIMO METODAI IR MEDŽIAGA	16
2.1 Tyrimo sąlygos ir schema	16
2.2 Bandomieji veršeliai, jų grupės, mityba ir laikymas	16
2.3 Didžiojo prieskrandžio turinio ėmimo ir tyrimo metodika.....	18
2.4 Statistinė duomenų analizė	19
3. TYRIMO REZULTATAI.....	20
3.1 Didžiojo prieskrandžio turinio pirmuonių tyrimo rezultatai	20
3.2 Didžiojo prieskrandžio turinio bakterijų ir jų aktyvumo tyrimo rezultatai	26
3.3 Didžiojo prieskrandžio turinio biocheminių rodiklių tyrimo rezultatai.....	31
3.4 Didžiojo prieskrandžio turinio biocheminių ir mikrobiologinių rodiklių koreliacinė analizė	32
4. TYRIMO REZULTATŲ APTARIMAS	35
IŠVADOS	38
REKOMENDACIJOS	40
PADĖKA	41
LITERATŪROS SĄRAŠAS	42
PRIEDAI	47

AMŽIAUS ĮTAKA VERŠELIŲ DIDŽIOJO PRIESKRANDŽIO TURINIO FERMENTACINIŲ PROCESŲ AKTYVUMUI

Ieva Kasradze

Magistro baigiamasis darbas

SANTRAUKA

Darbo tikslas – įvertinti amžiaus įtaką veršelių didžiojo prieskrandžio turinio fermentacinių procesų aktyvumui.

Tyrimas truko 8 mėnesius. Jame dalyvavo 30 kliniškai sveikų holšteinizuotų Lietuvos juodmargių veislės veršelių nuo 3 iki 8 mėnesių amžiaus. Jie buvo suskirstyti į tris grupes atsižvelgiant į jų amžių: 3 mėnesių amžiaus veršeliai (I-G), 3,5 mėnesių amžiaus veršeliai (II-G) ir 8 mėnesių amžiaus veršeliai (III-G). Iš visų grupių veršelių zondu paimti didžiojo prieskrandžio turinio mėginiai. Buvo ištirti veršelių didžiojo prieskrandžio turinio biocheminiai ir mikrobiologiniai rodikliai.

Nustatėme, kad 8 mėn. amžiaus veršelių bendras pirmuonių skaičius buvo vidutiniškai 18,6 proc. didesnis nei 3 ir 3,5 mėn. amžiaus. Visų amžiaus grupių veršelių didžiojo prieskrandžio turinyje vyravo *Entodinium* genties pirmuonys. 8 mėn. amžiaus veršelių aerobinių ir fakultatyvinių anaerobinių bakterijų skaičius buvo vidutiniškai 45,1 proc. didesnis nei 3 ir 3,5 mėn. amžiaus. Pieno rūgšties bakterijos ir enterobakterijos nustatytos nuo 3,5 mėn. amžiaus ir tuo metu jų skaičius atitinkamai buvo 46,8 proc. mažesnis ir 10,6 proc. didesnis nei 8 mėn. amžiaus veršelių. Ištyrus veršelių didžiojo prieskrandžio turinio biocheminius rodiklius, nustatėme, kad 8 mėn. amžiaus veršelių bendras azoto kiekis buvo vidutiniškai 2,1 ir amoniako azoto kiekis – 1,7 kartų didesni nei 3 ir 3,5 mėn. amžiaus. Veršelių amžius turėjo įtakos bendram pirmuonių skaičiui – 68,4 proc., pirmuonių genčių *Diplodinium*, *Enoploplastron*, *Entodinium*, *Isotricha* ir *Opisthotrichum* skaičiams – vidutiniškai 52,14 proc., aerobinių ir fakultatyvinių anaerobinių bakterijų skaičiui – 21,6 proc., pieno rūgšties bakterijų skaičiui – 42,3 proc. bei bendram ir amoniako azoto kiekiams – vidutiniškai 47,5 proc. Veršelių didžiojo prieskrandžio turinio mikrobiologinių ir biocheminių rodiklių nustatyta tarpusavio koreliacija buvo nuo stipriai teigiamos iki vidutiniškai neigiamos.

Raktažodžiai: veršeliai, didysis prieskrandis, fermentaciniai procesai, amžius.

THE INFLUENCE OF AGE ON THE ACTIVITY OF FERMENTATION PROCESSES IN RUMEN CONTENTS OF CALVES

Ieva Kasradze

Master's Thesis

SUMMARY

The aim of this study was to evaluate the effect of age on the activity of fermentation processes in rumen contents of calves.

The study lasted 8 months. The participants were 30 clinically healthy holsteinized calves of the Lithuanian Black and White breed aged between 3 and 8 months. They were divided into three groups according to their age: 3-month-old calves (I-G), 3.5-month-old calves (II-G) and 8-month-old calves (III-G). Samples of the contents of rumen were taken by probe from calves in all groups. Biochemical and microbiological parameters of rumen contents of calves were analyzed.

We found that the total number of protozoa in 8-month-old calves was on average 18.6% higher than at 3 and 3.5 months of age. In calves of all ages, protozoa of the genus *Entodinium* dominated the contents of the large rumen. The number of aerobic and facultative anaerobic bacteria was on average 45.1% higher in the 8-month-old calves than in the 3- and 3.5-month-olds. Lactic acid bacteria and Enterobacteriaceae were detected from 3.5 months of age and were 46.8% lower and 10.6% higher than in 8-month-old calves respectively. The biochemical parameters of the large rumen content of the calves showed that the total nitrogen and ammonia nitrogen contents of the calves at 8 months of age were, on average, 2.1 and 1.7 times higher, respectively, than those at 3 and 3.5 months of age. Calf age influenced the total number of protozoa by 68.4%, the numbers of protozoa genera *Diplodinium*, *Enoploplastron*, *Entodinium*, *Isotricha* and *Opisthotrichum* by an average of 52.14%, and the number of aerobic and facultative anaerobic bacteria by 21.6%, for the number of lactic acid bacteria by 42.3% and for total and ammonia nitrogen by 47.5% on average. The correlation between the microbiological and biochemical parameters of rumen content of calves ranged from strongly positive to moderately negative.

Keywords: calves, rumen, fermentation processes, age.

SANTRUMPOS

°C – Celsijaus laipsnis

µm – mikrometras

cm³ – kubinis centimetras

g – gramas

h – valanda

kg – kilogramas

l – litras

log – logaritmas

m. – metai

mėn. – mėnuo

mg – miligramas

MJ – megadžaulis

ml – mililitras

mmol – milimoliai

proc. – procentai

s – sekundė

SM – sausosios medžiagos

LRR – lakiosios riebalų rūgštys

NEM – neazotinės ekstraktinės medžiagos

RBA – redukcinis bakterijų aktyvumas

GluR – gliukozės rūgimo reakcija

PS – pirmuonių skaičius

PS-*Diplodinium* – *Diplodinium* genties pirmuonių skaičius

PS – *Enoploplastron* – *Enoploplastron* genties pirmuonių skaičius

PS-*Entodinium* – *Entodinium* genties pirmuonių skaičius

PS-*Isotricha* – *Isotricha* genties pirmuonių skaičius

PS-*Opisthotrichum* – *Opisthotrichum* genties pirmuonių skaičius

PS-*Ostracodinium* – *Ostracodinium* genties pirmuonių skaičius

NK – bendras azoto kiekis

NH₃-NK – amoniako azoto kiekis

ABS – aerobinių ir fakultatyvinių anaerobinių bakterijų skaičius

EBS – enterobakterijų skaičius
EKS – enterokokų skaičius
PBS – pienarūgščių bakterijų skaičius
MPGS – mielinių ir pelėsinių grybų skaičius
Vid. – aritmetinis vidurkis
 \pm SD – standartinis nuokrypis
Max – didžiausia reikšmė
Min – mažiausia reikšmė
r – koreliacinis koeficientas
p – patikimumo koeficientas

ĮVADAS

Naujagimio veršelio ir subrendusio atrajotojo virškinimo sistemos anatomija bei fiziologija stipriai skiriasi. Ką tik gimusio veršelio virškinamasis traktas laikomas steriliu, tačiau jau po 20 minučių prasideda įvairių mikroorganizmų kolonizacija ir ji intensyvėja su kiekviena gyvenimo diena (1).

Sudėtinga atrajotojų virškinamojo trakto mikrobiota turi įtakos ne tik sklandžiam augalinio pašaro virškinimo procesui, tačiau ir visai imuninei sistemai, maisto medžiagų įsisavinimui bei bendram metabolizmui. Todėl labai svarbu tinkamai suprasti, kas vyksta veršelių didžiajame prieskrandyje mikroorganizmų lygmeniu, tai gali turėti teigiamos įtakos bendrai bręstančio veršelio sveikatos būklei, produkcijai ateityje (2). Anksčiau fiziologinis veršelio virškinamojo trakto vystymasis buvo tiriamas skrodžiant veršelius bei analizuojant virškinamojo trakto ir kraujo metabolitų atsaką. Tačiau įvairių mokslo sričių pažanga lėmė platesnes galimybes ištirti virsmus, vykstančius veršelių virškinamajame trakte jiems bręstant (3).

Šios žinios taip pat reikalingos siekiant užtikrinti sklandų veršelio nujunkymą, daugelyje pieno ūkių veršeliai yra nujunkomi labai jauno amžiaus, siekiant sumažinti išlaidas, susijusias su veršeliams girdomu pienu ir pieno pakaitalais, tačiau netinkami veiksmai šio proceso metu gali turėti neigiamų pasekmių ateityje (4). Nujunkymas yra vienas iš daugiausiai pokyčių reikalaujančių procesų gamtoje, kai ne tik didysis prieskrandis, bet ir visas virškinamasis traktas turi prisitaikyti prie kitos pašaro rūšies skaidymo ir maistinių medžiagų pasisavinimo. Nujunkymo metu veršelio organizmas patiria aukštą streso lygį, didėja infekcijų tikimybė, gali sulėtėti augimas. Šis laikotarpis gali turėti įtakos atrajotojo sveikatingumui ateityje (3).

Vystantis veršelių didžiajam prieskrandžiui ir įvairioms mikroorganizmų rūšims kolonizuojant prieskrandžio turinį, prasideda turinio fermentacija, kurią sąlygoja didžiajame prieskrandyje vykstantys mikrobiologiniai ir biocheminiai procesai. Dauguma mokslininkų tiria suaugusių galvijų didžiojo prieskrandžio fermentacinius procesus ir įvairių veiksnių įtaką šių procesų aktyvumui (5–10). Tačiau duomenų apie veršelių didžiojo prieskrandžio turinio fermentacinių procesų aktyvumo kaitą jiems augant pavyko rasti nedaug (11–13).

Darbo tikslas: Įvertinti amžiaus įtaką veršelių didžiojo prieskrandžio turinio fermentacinių procesų aktyvumui.

Darbo uždaviniai:

1. ištirti mikrobiologinius rodiklius skirtingo amžiaus veršelių didžiojo prieskrandžio turinyje;
2. ištirti biocheminius rodiklius skirtingo amžiaus veršelių didžiojo prieskrandžio turinyje;

3. nustatyti mikrobiologinių ir biocheminių rodiklių priklausomybę nuo veršelių amžiaus;
4. įvertinti veršelių didžiojo prieskrandžio mikrobiologinių ir biocheminių rodiklių tarpusavio priklausomybę.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 Veršelių didžiojo prieskrandžio vystymasis

Veršeliai atvedami su fiziškai ir metaboliškai neišsivysčiusiu didžiuoju prieskrandžiu, todėl iš pradžių jie yra priklausomi nuo pieno, kad patenkintų maistinių medžiagų poreikį, reikalingą augti (14). Lyginant su vienkameriais gyvūnais, atrajotojų prieskrandžiai turi specializuotą struktūrą ir funkciją, todėl atrajotojų ir vienkamerių gyvūnų virškinimas ir virškinimo sistemos fiziologija skiriasi. Veršeliai turi papildomų unikalių sistemų, kurios jų virškinamajame trakte atsiranda vystymosi metu (15). Veršeliui pereinant nuo pieno prie kietojo pašaro, labai svarbu, kad būtų suvartojamas tinkamas kiekis stambiųjų pašarų, kurių reikia, kad atsirastų anaerobinių mikrobu, prasidėtų fermentacijos procesai didžiajame prieskrandyje, padidėtų didžiojo prieskrandžio tūris, diferencijuotųsi ir augtų gleivinės speneliai, vystytųsi rezorbcijos ir medžiagų apykaitos mechanizmai, bręstų seilių aparatas ir atsirastų atrajojimo elgsena (14).

Remiantis atliktais tyrimais, pieninių ir mėsinių veislių veršelių didžiojo prieskrandžio vystymasis yra panašus (16).

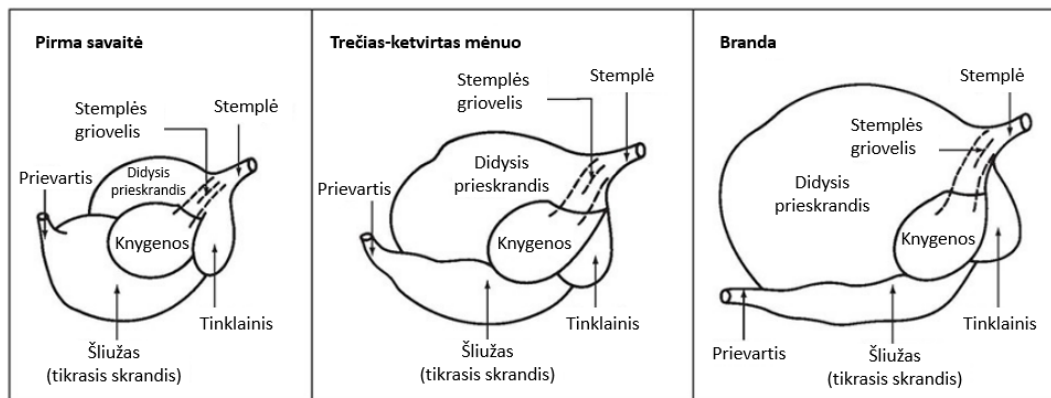
Didžiojo prieskrandžio vystymąsi sudaro trys skirtingi procesai (13):

1. anatominis vystymasis – prieskrandžio svorio didėjimas ir gleivinės spenelių augimas;
2. funkcinis brendimas – didėjantis fermentacijos pajėgumas ir mikrobinių fermentų aktyvumas;
3. mikroorganizmų kolonizacija – bakterijos, grybai ir pirmuonys.

1.1.1 Didžiojo prieskrandžio anatominis vystymasis

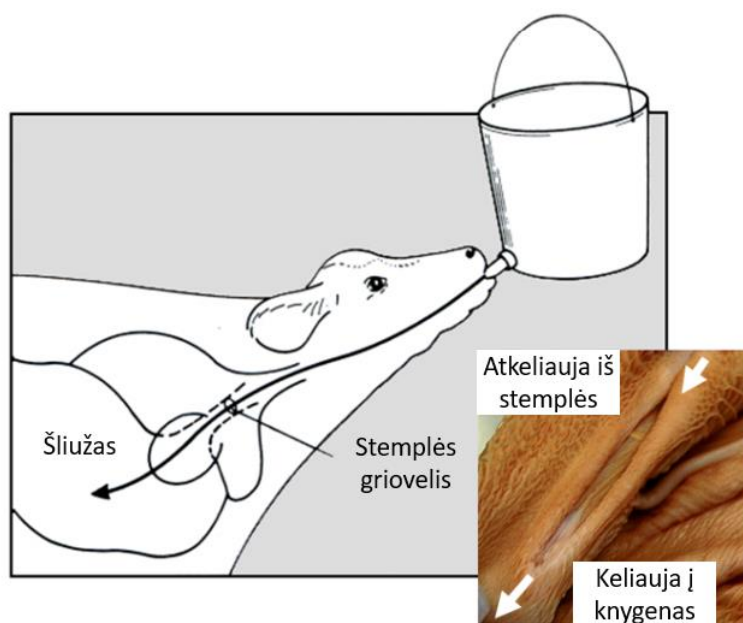
Anatominis prieskrandžio vystymasis – tai procesas, vykstantis trimis etapais: neatrajojimas (0-3 savaitės amžiaus), pereinamasis etapas (3-8 savaitės amžiaus) ir atrajojimas (nuo 8 savaičių amžiaus) (13).

Veršelių virškinimo sistema pradeda vystytis embrioniniu laikotarpiu. Pavyzdžiui, galvijų embrionuose skrandžio kameros matomos 56 dieną. Naujagimio veršelio tinklainis–didysis prieskrandis, knygenos ir šliužas sudaro atitinkamai 38 proc., 13 proc. ir 49 proc. viso skrandžio svorio. Iki aštuonių savaičių amžiaus šios proporcijos pasikeičia ir sudaro atitinkamai 61,23 proc., 13,40 proc. ir 25,37 proc. skrandžio svorio. Galiausiai, 12-16 savaičių amžiaus jos atitinkamai sudaro 67 proc., 18 proc. ir 15 proc. viso skrandžio svorio (15). Veršelio skrandžio kamerų vystymasis vizualiai pateiktas 1 pav.



1 pav. Veršelių skrandžio kamerų vystymasis nuo gimimo iki brandos (17)

Stemplės „pieno“ griovelis yra vienas iš veršelių virškinamojo trakto ypatumų. Dauguma skystų pašarų, pavyzdžiui, krekenos, nenugriebtas pienas ir pieno pakaitalas, dėl refleksinio stemplės griovelio užsidarymo gali apeiti didįjį prieskrandį, tinklainį bei knygenas ir patekti tiesiai į šliužą (2 pav.) (15, 17). Cheminė skystojo pašaro – pieno, sudėtis ir susiformavęs stemplės „pieno“ griovelis riboja fizinį ir funkcinį didžiojo prieskrandžio vystymąsi (13). Naujagimių veršelių šliužas yra vienintelis visiškai išsivysčiusi ir funkcionuojanti skrandžio dalis, be to, jis yra svarbiausias veršelių virškinimo organas jiems tik gimus. Riebalų, angliavandenių ir baltymų virškinimas daugiausia priklauso nuo šliužo ir plonosios žarnos išskiriamų virškinimo fermentų, tai panašu į vienkamerių gyvūnų virškinimo sistemą. Laikui bėgant, didėjant suvartojamų sausųjų pašarų kiekiui, pradeda vystytis didysis prieskrandis, kuris atlieka svarbesnes virškinimo funkcijas atrajotojui suaugus (15).



2 pav. Raumeninė raukšlė, sudaranti stemplės „pieno“ griovelį (17)

Pereinant iš neatrajojimo į atrajojimą, labai svarbu, kad augtų ir vystytųsi didžiojo prieskrandžio rezorbcinis paviršiaus plotas – speneliai, kad būtų galima rezorbuoti ir panaudoti galutinius virškinimo produktus, ypač lakiąsias riebalų rūgštis (LRR) (13). Labai skanūs „startiniai“ pašarai, kuriuose yra lengvai virškinamų angliavandenių, stimuliuoja didžiojo prieskrandžio vystymąsi, įskaitant pakitimus prieskrandžio epitelyje (14). Veršeliams palaipsniui suvartojant vis daugiau kietojo pašaro, per pirmuosius du mėnesius mažėja didžiojo prieskrandžio pH, o LRR koncentracija palaipsniui didėja. LRR buvimas ir įsisavinimas prieskrandyje suteikia cheminį stimulą, reikalingą didžiojo prieskrandžio epitelio ląstelėms daugintis (15). Tačiau skirtingos LRR skirtingai stimuliuoja tokį vystymąsi: labiausiai stimuliuoja butiratas, po jo – propionatas. Nuolatinis lakiųjų riebalų rūgščių poveikis palaiko didžiojo prieskrandžio gleivinės epitelio ir spenelių augimą, dydį ir funkciją (13).

Didžiojo prieskrandžio epitelis atlieka daug svarbių funkcijų ir užima pagrindinį vaidmenį prieskrandžio vystymosi procese, įskaitant maisto medžiagų rezorbciją, transportavimą, trumpos grandinės riebalų rūgščių apykaitą ir apsauginę funkciją. Atrajotojų plokščiojo epitelio ląstelių dauginimasis ir augimas skatina gleivinės spenelių augimą bei didžiojo prieskrandžio sienelės storėjimą. Naujagimių veršelių epitelis yra lygus, be išryškėjusių spenelių (15).

1.1.2 Didžiojo prieskrandžio fermentacinis brendimas

Fermentacijos galutinių produktų veršelių didžiajame prieskrandyje galima rasti jau antrąją gyvenimo savaitę. Buvo nustatyta, kad 8 savaičių amžiaus veršelių, šeriamų koncentruotais pašarais, didžiojo prieskrandžio turinyje LRR koncentracija yra panaši į suaugusiųjų (120 – 160 mmol/l) ir veršelių, šeriamų stambiaisiais pašarais (120 mmol/l). Apibendrinant galima teigti, kad fermentacijos procesai didžiajame prieskrandyje prasideda labai anksti, o LRR koncentracija didėja didėjant kietojo pašaro kiekiui (14).

Didžiojo prieskrandžio pH yra labai svarbus normaliam didžiojo prieskrandžio vystymuisi, fermentacijai ir bendrai veršelių sveikatai. Nustatyta, kad didžiojo prieskrandžio turinio pH priklauso nuo fermentacijos greičio ir LRR rezorbcijos (14).

Sausiesiems pašarams patekus į didįjį prieskrandį, jie veikiami sparčiai besidauginančių mikroorganizmų, susidaro LRR ir laktatai, tai lemia didžiojo prieskrandžio pH mažėjimą. Suaugę atrajotojai dažnai serga medžiagų apykaitos ligomis, kurios kyla dėl prieskrandžio acidozės (pH < 5,6), bet veršelių sveikatingumo būklei toks žemas didžiojo prieskrandžio pH neturi neigiamos įtakos. Tačiau ilgalaikis sumažėjęs didžiojo prieskrandžio pH žemiau nei 5,5 nujunkymo laikotarpiu ir po to, turi įtakos barjerinės funkcijos pažeidimui didžiajame prieskrandyje, nes padidėja gleivinės pralaidumas (18).

1.2 Mikroorganizmų kolonizacija didžiajame prieskrandyje

Veršelių žarnyno mikrobiotos formavimasis yra dinamiškas, laipsniškas perėjimas nuo kolonizacijos prie pilno išitvirtinimo. Veršelių virškinamojo trakto mikroorganizmų populiacijos augimas yra veikiamas įvairių veiksnių – karvės, auginimo aplinkos, šėrimo, naudojamų pašarų papildų (19). Pradinė virškinamojo trakto mikrobinė kolonizacija atlieka esminį vaidmenį endokrininės, imuninės sistemos ir centrinės nervų sistemos brendimui ir daro didelę įtaką jaunų gyvūnų sveikatai ir gerovei (16).

Didžiojo prieskrandžio mikrobiotos susiformavimas yra būtinas fiziologiniam didžiojo prieskrandžio vystymuisi ir gyvūno gebėjimui augalinę masę paversti maistinėmis medžiagomis. Suaugusių atrajotojų didžiajame prieskrandyje aptinkama itin kompleksinė anaerobinių mikroorganizmų ekosistema, kurią sudaro įvairių rūšių bakterijos, pirmuonys ir grybeliai. Tačiau sudėtingos mikroorganizmų ekosistemos formavimasis yra ilgas procesas ir priklauso nuo daugelio veiksnių, įskaitant genetiką, amžių, šėrimą ir laikymo sąlygas. Natūraliomis sąlygomis, kai veršelius žindo karvės, veršeliai įgyja anaerobų žįsdami bei iš kartu laikomų gyvūnų ir aplinkos (pvz. užterštų ganyklų). Nuo karvių atskirtų veršelių anaerobinės didžiojo prieskrandžio ekosistemos formavimasis priklauso nuo naudojamo pašaro tipo, laikymo sąlygų ir veterinarinės higienos (14).

1.2.1 Bakterijų kolonijų augimas didžiajame prieskrandyje

Bakterijos užima maždaug pusę prieskrandyje esančių mikroorganizmų genetinės medžiagos. Didžiausia bakterijų įvairovė yra didžiajame prieskrandyje, knygenose ir šliuže, o mažiausia – tuščiojoje žarnoje (16). Tik gimusio veršelio didžiajame prieskrandyje nėra anaerobinių bakterijų populiacijos (14). Bakterijų populiacija dinamiškai kinta per pirmuosius veršelio gyvenimo metus, įskaitant atjunkymo laikotarpį, kuris yra labai svarbus (20).

Pirmiausia veršelio virškinamajame trakte atsiranda daug aerobų ir fakultatyvinių anaerobų (*Lactobacillus* ir *Bifidobacteria*), kurie deguonį naudoja atskirų molekulių pavidalu, todėl susidaro hipoksinės sąlygos. Vėliau žarnyną palaipsniui kolonizuoja griežti anaerobai (*Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* ir *Actinobacteria*). Skrandyje ir prieskrandžiuose vyrauja *Prevotella* ir *Fibrobacter*, storojoje žarnoje – *Bacteroides*, *Clostridium*, *Alistipes* ir *Ruminococcus*, plonojoje žarnoje – *E. coli* (19).

Atsižvelgiant į atliktų tyrimų rezultatus, ankstyvąjį didžiojo prieskrandžio mikroorganizmų išitvirtinimo procesą galima suskirstyti į tris etapus (21):

1. pradiniame etape iš aerobinės arba fakultatyvinės anaerobinės bakterijų populiacijos pereinama į griežtai anaerobinę. Vyrauja *Proteobacteria* ir *Firmicutes* bakterijų tipai. Šios

bakterijos atkeliauja iš karvių makšties, pieno, seilių bei išorinės aplinkos – *Bacillus* ir *Lactococcus* gentys;

2. pereinamuoju etapu, palaipsniui didėjant pieno suvartojimui, *Proteobacteria* kaip dominuojantį tipą keičia *Bacteroidetes*. Genčių lygmeniu dominuojančia gentimi tampa *Bacteroides* bakterijos, kurios geba skaidyti kai kuriuos pieno komponentus. Be to, šiuo laikotarpiu jau įsitvirtina ir kai kurios subrendusiame didžiajame prieskrandyje įprastos bakterijos, pavyzdžiui, *Prevotella* ir *Ruminococcus*;
3. stabilizavimosi etape, padidėjus kietojo pašaro suvartojimui, dominuojantys bakterijų tipai yra *Bacteroidetes* ir *Firmicutes*. Rūšies lygmeniu palaipsniui padaugėja kai kurių didžiojo prieskrandžio bakterijų, galinčių skaidyti krakmolą ir ląstelieną, ir išlaiko santykinai stabilų kiekį didžiajame prieskrandyje – tai bakterijos *Prevotella*, *Ruminococcus* ir *Treponema*.

Nors atjunkymo metu veršeliai įgyja dalį suaugusių karvių mikrobiotos, skirtumas tarp jauniklių ir suaugusių individų išlieka ryškus. Tyrimais nustatyta, kad atjunkymo metu didžiojo prieskrandžio mikroorganizmų populiacija gana gausi, tačiau neprilygsta suaugusių atrajotojų didžiajam prieskrandžiui. Taigi, didžiojo prieskrandžio vystymasis intensyviai tęsiasi ir po nujunkymo. Svarbūs pokyčiai įvyksta nuo nujunkymo iki 1 metų amžiaus, kai didėja mikroorganizmų populiacijų įvairovė. Tačiau randama panašių bakterijų šeimų ir genčių tarp 8 savaičių ir 1 metų karvių jauniklių (22).

1.2.2 Pirmuonių dauginimasis didžiajame prieskrandyje

Jauno atrajotojo prieskrandyje dominuoja bakterijos, o pirmuonys sudaro apie 20-50 proc. visos prieskrandžio mikroorganizmų populiacijos (21). Nors anaerobinių pirmuonių yra kur kas mažiau nei bakterijų, tačiau dėl savo didesnio dydžio jie sudaro beveik tokią pačią masę kaip ir bakterijos išsivysčiusiame didžiajame prieskrandyje (14).

Naujagimių veršelių didžiajame prieskrandyje pirmuonių neaptinkama. Pirmuonių kolonizacija didžiajame prieskrandyje įvyksta vėliau nei bakterijų, nes pirmuonys yra jautrus žemesniam didžiojo prieskrandžio pH, kuris būdingas veršeliams iki nujunkymo (16). Žemas didžiojo prieskrandžio pH lemia tai, kad žiuželiniai pirmuonys negali įsitvirtinti didžiajame prieskrandyje (14). Pirmuonių įsitvirtinimui reikalinga gerai struktūrizuota bakterijų populiacija. Bakterijos sudaro tinkamas fizikines ir chemines sąlygas prieskrandyje ir yra azoto šaltinis pirmuoniams vystytis (16). Nustatyta, kad pirmuonys aptinkami veršelių didžiajame prieskrandyje apie 8 gyvenimo savaitę (14), viena pirmųjų aptinkamų pirmuonių genčių – *Entodinium* (16).

Pagrindiniai pirmuonys didžiajame prieskrandyje yra ciliatai (žiuželiniai) ir flagelatai (žvyneliniai pirmuonys). Žvynelinių pirmuonių būna daugiausiai naujagimių veršelių didžiajame prieskrandyje. Veršeliui augant, flagelatų skaičius palaipsniui mažėja, o suaugus didžiajame prieskrandyje dominuoja ciliatai. Pirmuonių kolonizacija prasideda apie 15 veršelio gyvenimo dieną, smulkūs *Entodinia* pirmuonys kolonizuojasi anksčiau nei stambūs *Endomorph* ir *Holotrich* pirmuonys. Tačiau jei naujagimiai atrajotojai po atvedimo greitai atskiriami nuo kitų suaugusių atrajotojų, pirmuonys didžiajame prieskrandyje neįsitvirtina. Taip yra dėl to, kad prieskrandžio pirmuonys iš gyvūno gyvūnui gali būti perduodami tik per seiles (21).

1.3 Veršelių nujunkymas

Per pirmąsias 3 gyvenimo savaites pienas yra pagrindinis veršelio racionas, kuris stemplės „pieno“ grioveliu tiesiogiai patenka į šliužą, nepatekdamas į didįjį prieskrandį. Todėl lyginant su vyresniais veršeliais, pirmosiomis savaitėmis prieskrandis neatlieka labai svarbaus vaidmens maisto medžiagų virškinime bei rezorbcijoje. Laikotarpis prieš atjunkymą yra labai svarbus veršelių virškinamojo trakto ir imuninės sistemos vystymuisi. Sausąjį pašarą kaip pradinį pašarą veršeliai pradeda vartoti maždaug antrą – trečią gyvenimo savaitę (20). Veršelių gerovės reikalavimuose (23) nurodoma, kad kiekvienas vyresnis negu dviejų savaičių amžiaus veršelis kas dieną turi gauti ląstelienos, kurios kiekis nuo 50 g aštuonių savaičių veršeliui turi būti nuolatos didinamas iki 250 g dvidešimties savaičių veršeliui.

Atjunkymo metu veršelio virškinamojo trakto funkcijos turi stipriai adaptuotis, kadangi veršelis pereina nuo skystos dietos, kuri virškinama ir pasisavinama nuo pat atvedimo, prie stambiųjų pašarų dietos, kai virškinimas ir medžiagų pasisavinimas vyksta tiek prieš, tiek po skrandžio esančiose virškinamojo trakto dalyse. Įprastai nujunkant veršelius siekiama, kad prieš visiškai pašalinant pieną ar pieno pakaitalus iš raciono, veršelis jau būtų pratęs ėsti stambiuosius pašarus ir suvartotų pakankamą jų kiekį. Tai palengvina adaptacijos procesą ir padeda palaikyti reikiamą maistinių medžiagų suvartojimą (24).

Veršeliui augant ir prasidėjus nujunkymo procesui, didysis prieskrandis progresyviai vystosi iki pilno subrendimo. Pradėjus vartoti kietąjį pašarą, prasideda intensyvūs fermentacijos procesai didžiajame prieskrandyje, tai labai pakeičia didžiojo prieskrandžio mikroorganizmų populiacijos sudėtį (20).

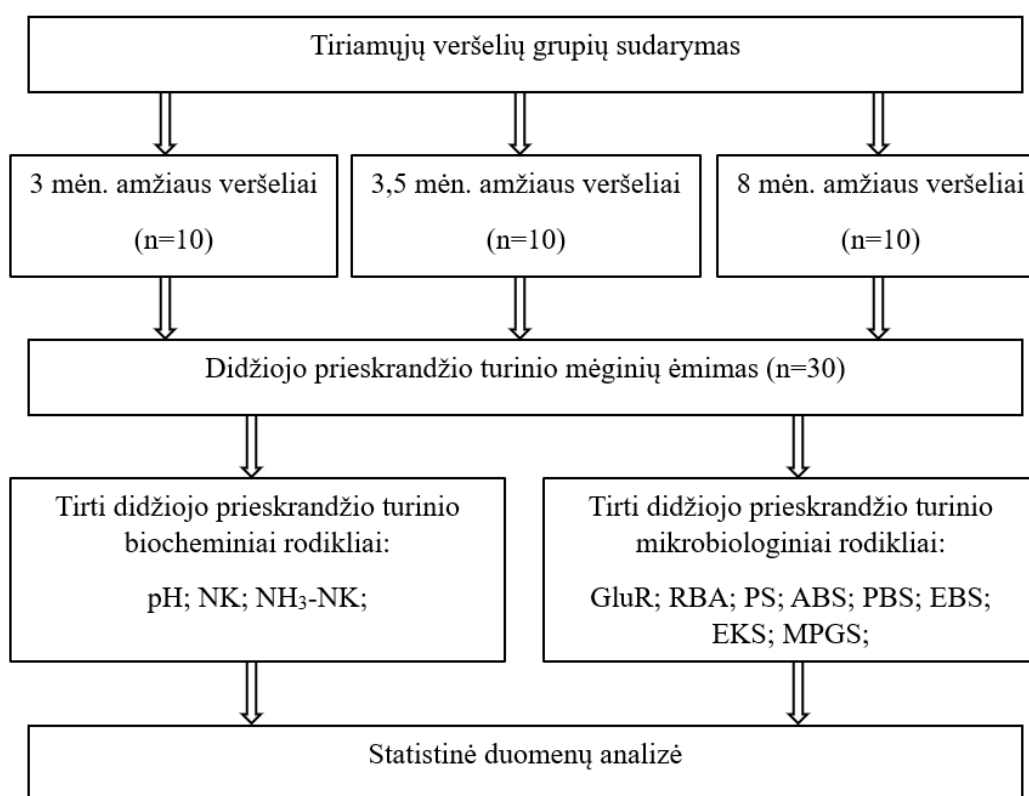
Siekiant išvengti neigiamų padarinių, susijusių su nujunkymu (žarnyno apsauginio barjero funkcijos sutrikimas, kūno svorio priaugimo sumažėjimas dėl sumažėjusio pašarų suvartojimo), kai veikiamas didžiojo prieskrandžio pH, galima laikytis strategijų, kurios gerina pašaro suvartojimą, svorio priaugį, veršelių elgseną. Tokios strategijos – laipsniškas nujunkymas, veršelių laikymas poromis (18).

2. TYRIMO METODAI IR MEDŽIAGA

2.1 Tyrimo sąlygos ir schema

Tyrimas vyko 2022–2023 m. LSMU VA Anatomijos ir fiziologijos katedros Virškinimo fiziologijos ir patologijos centre bei VšĮ LSMU Praktinio mokymo ir bandymų centre. Bandymo trukmė buvo 8 mėn. Jame dalyvavo 30 kliniškai sveikų holšteinizuotų Lietuvos juodmargių veislės veršelių nuo 3 mėn. iki 8 mėn. amžiaus. Jie buvo suskirstyti į tris grupes atsižvelgiant į jų amžių. Veršelių laikymo sąlygos atitiko Veršelių gerovės reikalavimus (23). Tyrimas su veršeliais vykdytas pritarus Valstybinei maisto ir veterinarijos tarnybai (2021-03-09 Nr. 33S(33.6.)-704).

Tyrimas vykdytas pagal 3 paveiksle pateiktą schemą.



3 pav. Tyrimo schema

2.2 Bandomieji veršeliai, jų grupės, mityba ir laikymas

Tyrimui pasirinkti kliniškai sveiki veršeliai buvo 3 mėnesių amžiaus, vidutiniškai svėrė 80,4 kg. Veršelių mityba atitiko jų amžiui rekomenduojamas mitybos fiziologines normas (25). Tiriamieji veršeliai buvo suskirstyti į tris amžiaus grupes, kiekvienoje grupėje buvo po 10 veršelių:

- I grupė (I-G) – šiai grupei priklausė 3 mėnesių amžiaus veršeliai. Šio amžiaus veršeliai šeriami subalansuotu pašaro mišiniu (1 lent.) Vanduo veršeliams prieinamas laisvai girdyklose. Veršeliai laikomi individualiuose boksuose arba aptvaruose grupėmis po 2-4 veršelius.

- II grupė (II-G) – šiai grupei priklausė 3,5 mėnesių amžiaus veršeliai. Šio amžiaus veršeliai taip pat šeriami subalansuotu pašaro mišiniu (1 lent.) Vanduo veršeliams prieinamas laisvai. Veršeliai laikomi aptvaruose grupėmis po 2-4 veršelius.
- III grupė (III-G) – šiai grupei priklausė 8 mėnesių amžiaus veršeliai. Jie šeriami subalansuotu pašaro mišiniu (1 lent.), girdyklose vanduo prieinamas laisvai. Šio amžiaus veršeliai laikomi aptvaruose, su išėjimu į lauką, po 10-15 veršelių.

1 lentelė. Tiriamųjų veršelių raciono sudėtis ir jo maistingumas

Pašarai	Sausųjų medžiagų (SM) kiekis, kg	
	I-G ir II-G	III-G
Šienas	0,860	0,860
Žolės silosas	1,788	1,788
Kombinuotas pašaras	2,560	2,119
Rapsų išspaudos	0,218	0,218
Sojų pupelių rupiniai	0,261	0,261
Žirniai	0,211	0,211
Kviečių grūdai	1,264	1,264
Kukurūzų silosas	1,386	1,386
Cukrinių runkelių melasa	0,154	0,154
Ceolitas	0,018	0,018
Druska gyvuliams	0,009	0,009
Pašarinės kalkės	0,060	0,060
Mineralinis-vitamininis papildas	0,078	0,078
Raciono maistingumas		
Organinė medžiaga, g/kg SM	1803,00	911,00
Apykaitos energija, MJ/kg SM	23,34	11,10
Žalieji pelenai, g/kg SM	198,00	89,00
Žalieji baltymai, g/kg SM	344,00	154,00
Žalieji riebalai, g/kg SM	53,00	27,00
Žalioji ląsteliena, g/kg SM	199,00	161,00
NEM, g/kg SM	1207,00	569,00
Krakmolas, g/kg SM	675,00	219,00
Cukrus, g/kg SM	98,00	52,00
Angliavandeniai, g/kg SM	1402,00	729,00
Kalcis, g/kg SM	28,30	9,48
Fosforas, g/kg SM	11,11	4,36

2.3 Didžiojo prieskrandžio turinio ėmimo ir tyrimo metodika

Veršelių didžiojo prieskrandžio turinio mėginiai buvo imti zonu Ruminator (26) iš visų veršelių praėjus 2 valandoms po šėrimo. Mėginiai patalpinti į termosus ir pristatyti į laboratoriją. Didžiojo prieskrandžio turinio mėginiuose tirti šie biocheminiai ir mikrobiologiniai rodikliai:

- didžiojo prieskrandžio pH tirtas nešiojamu pH matuokliu (Horiba-Twin pH, *Spectrum Technologies*);
- bendras azoto kiekis (NK) tirtas Kjeldalio metodu su mineralizavimo įrenginiu *Behrotest® InKjel M* (*Labor-Technik GmbH*, Vokietija) ir distiliavimo vandens garais įrenginiu *Behr SI* (*Labor-Technik GmbH*, Vokietija) (27);
- amoniako azoto kiekis (NH₃-NK) tirtas titravimo metodu su distiliavimo vandens garais įrenginiu *Behr SI* (*Labor-Technik GmbH*, Vokietija) (27);
- gliukozės rūgimo reakcija (GluR) tirta įvertinant anglies dioksido išsiskyrimo intensyvumą Einhorno sacharometre (28);
- redukcinis bakterijų aktyvumas (RBA) tirtas įvertinant metileno mėlynojo redukavimo laiką, sekundėmis (28);
- pirmuonių skaičius (PS) – pirmuonių skaičius tirtas mikroskopavimo metodu. Fuchs-Rosenthal skaičiavimo kamera (*Blaubrand*, Wertheim, Vokietija) užpildyta 4 proc. formalino tirpalu stabilizuotu didžiojo prieskrandžio turiniu ir mikroskopu „Olympus“ U-TV1X-2 (Tokijas, Japonija) nustatytas pirmuonių skaičius. Pirmuonių gentis identifikuota pagal B. A. Dehority metodiką (29). Identifikuojant pirmuonių gentį, mikroskopo objektyvo padidinimas buvo 20 kartų. Pirmuonių skaičiai yra išreikšti dešimtainiu logaritmu 1 ml turinio (log₁₀/ml);
- aerobinių ir fakultatyvinių anaerobinių bakterijų skaičius (ABS) tirtas vadovaujantis LST ISO 4833-1:2013 pateikta metodika (30) „Plate count agar“ (*Sigma-Aldrich*, Vokietija) terpėje;
- pienarūgščių bakterijų skaičius (PBS) tirtas vadovaujantis LST ISO 15214:2009 pateikta metodika (31) „MRS agar“ (*Sigma-Aldrich*, Vokietija) terpėje;
- enterobakterijų skaičius (EBS) tirtas vadovaujantis LST ISO 21528-2:2009 (32) „VRBG agar“ (*Sigma-Aldrich*, Vokietija) terpėje;
- enterokokų skaičius (EKS) tirtas vadovaujantis LST EN ISO 7899-2:2001 pateikta metodika (33) „Slanetz and Bartley Agar“ (*Sigma-Aldrich*, Vokietija) terpėje;
- mielinių ir pelėsinių grybų skaičius (MPGS) tirtas vadovaujantis LST ISO 6611:2004 pateikta metodika (34) „Rose bengal agar“ (*Sigma-Aldrich*, Vokietija) terpėje.

Bakterijų skaičiai yra išreikšti dešimtainiu logaritmu 1 g turinio (\log_{10}/g).

2.4 Statistinė duomenų analizė

Statistinė duomenų analizė buvo atlikta programa IBM SPSS Statistics 29.0.1.0. Gliukozės rūgimo reakcijos, bendro pirmuonių skaičiaus, atskirų pirmuonių genčių, bendro azoto kiekio, amoniako kiekio, bendro bakterijų skaičiaus, pH bei atskirų bakterijų šeimų rodikliams buvo skaičiuoti aritmetiniai vidurkiai (Vid.), standartinis nuokrypis ($\pm SD$), didžiausios ir mažiausios reikšmės (Max ir Min), atlikta ANOVA – dispersinė analizė, atlikti poriniai palyginimai Post-Hoc testu, apskaičiuotas koreliacinis koeficientas (r) tarp požymių pagal Pirsoną (Pearson). Redukcinio bakterijų aktyvumo duomenų nepriklausomumas įvertintas Crosstabulation metodu, Chi-kvadrato testu. Įvertintas patikimumo koeficientas (p) – laikyta, kad rezultatai patikimi, kai $p < 0,05$, nepatikimi, kai $p > 0,05$.

3. TYRIMO REZULTATAI

3.1 Didžiojo prieskrandžio turinio pirmuonių tyrimo rezultatai

Ištirus I-G, II-G ir III-G veršelių didžiojo prieskrandžio turinio bendrą pirmuonių ir atskirų pirmuonių genčių skaičių (2 lent.), nustatyta, kad rodikliai tarp grupių skyrėsi statistiškai reikšmingai ($p < 0,05$).

2 lentelė. Didžiojo prieskrandžio turinio bendro pirmuonių skaičiaus ir atskirų pirmuonių genčių rezultatai

Rodiklis	I-G		
	Vid. \pm SD	Min	Max
Bendras pirmuonių skaičius, log10/ml	4,39 \pm 0,26*	4,05	4,80
Pirmuonių gentis <i>Diplodinium</i> , log10/ml	3,42 \pm 1,22	0,00	4,18
Pirmuonių gentis <i>Enoploplastron</i> , log10/ml	1,06 \pm 1,71*	0,00	3,57
Pirmuonių gentis <i>Entodinium</i> , log10/ml	4,19 \pm 0,30*/**	3,80	4,70
Pirmuonių gentis <i>Isotricha</i> , log10/ml	0,00 \pm 0,00*	0,00	0,00
Pirmuonių gentis <i>Opisthotrichum</i> , log10/ml	0,36 \pm 1,13*	0,00	3,57
Pirmuonių gentis <i>Ostracodinium</i> , log10/ml	1,44 \pm 1,86*/**	0,00	3,80
Rodiklis	II-G		
	Vid. \pm SD	Min	Max
Bendras pirmuonių skaičius, log10/ml	4,17 \pm 0,46*	3,57	5,12
Pirmuonių gentis <i>Diplodinium</i> , log10/ml	2,04 \pm 2,18	0,00	4,90
Pirmuonių gentis <i>Enoploplastron</i> , log10/ml	0,80 \pm 1,70*	0,00	4,42
Pirmuonių gentis <i>Entodinium</i> , log10/ml	3,57 \pm 1,29*	0,00	4,42
Pirmuonių gentis <i>Isotricha</i> , log10/ml	0,67 \pm 1,41*	0,00	3,57
Pirmuonių gentis <i>Opisthotrichum</i> , log10/ml	0,36 \pm 1,13*	0,00	3,57
Pirmuonių gentis <i>Ostracodinium</i> , log10/ml	1,05 \pm 1,70*	0,00	3,57
Rodiklis	III-G		
	Vid. \pm SD	Min	Max
Bendras pirmuonių skaičius, log10/ml	5,26 \pm 0,23	4,97	5,58
Pirmuonių gentis <i>Diplodinium</i> , log10/ml	4,83 \pm 0,26	4,53	5,17
Pirmuonių gentis <i>Enoploplastron</i> , log10/ml	4,39 \pm 0,49	3,57	4,92
Pirmuonių gentis <i>Entodinium</i> , log10/ml	4,68 \pm 0,39**	4,05	5,09
Pirmuonių gentis <i>Isotricha</i> , log10/ml	3,89 \pm 0,21	3,57	4,18
Pirmuonių gentis <i>Opisthotrichum</i> , log10/ml	3,08 \pm 1,64	0,00	4,27
Pirmuonių gentis <i>Ostracodinium</i> , log10/ml	2,76 \pm 1,92**	0,00	4,45

* - $p < 0,05$ lyginant I-G ir III-G; ** - $p < 0,05$ lyginant II-G ir III-G; *** - $p < 0,05$;

Lyginant skirtingo amžiaus veršelių didžiojo prieskrandžio turinio bendrą pirmuonių skaičių, nustatyta, kad III-G bendras pirmuonių skaičius buvo 0,87 log₁₀/ml (p<0,05) ir 1,09 log₁₀/ml (p<0,05) didesnis nei atitinkamai I-G ir II-G. I-G bendras pirmuonių skaičius buvo 0,22 log₁₀/ml didesnis nei II-G, tačiau rezultatas nėra statistiškai reikšmingas (p>0,05).

Tiriant veršelių didžiojo prieskrandžio turinio pirmuonis, buvo nustatyti šešių skirtingų genčių pirmuonys – *Diplodinium* (4 pav.), *Enoploplastron* (5 pav.), *Entodinium* (6 pav.), *Isotricha* (7 pav.), *Opisthotrichum* (8 pav.), *Ostracodinium* (9 pav.)

Diplodinium genties pirmuonių III-G buvo 1,41 log₁₀/ml (p<0,05) ir 2,79 log₁₀/ml (p<0,05) daugiau nei atitinkamai I-G ir II-G. I-G *Diplodinium* genties pirmuonių buvo 1,38 log₁₀/ml (p<0,05) daugiau nei II-G.

Enoploplastron genties pirmuonių skaičius III-G buvo 3,33 log₁₀/ml (p<0,05) ir 3,59 log₁₀/ml (p<0,05) didesnis nei atitinkamai I-G ir II-G. *Enoploplastron* genties pirmuonių buvo 0,26 log₁₀/ml (p>0,05) daugiau I-G nei II-G.

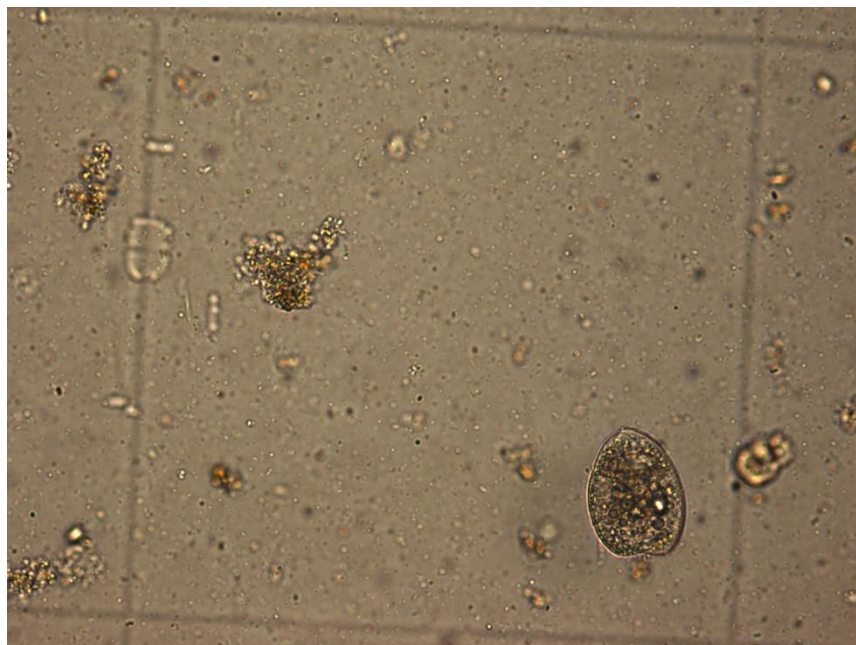
Entodinium genties pirmuonių visose grupėse buvo panašus kiekis – III-G buvo 0,49 log₁₀/ml (p>0,05) ir 1,11 log₁₀/ml (p<0,05) daugiau nei I-G ir II-G atitinkamai. I-G šios genties pirmuonių buvo 0,62 log₁₀/ml (p>0,05) daugiau nei II-G, tačiau rezultatas nėra statistiškai reikšmingas.

Isotricha genties pirmuonių III-G buvo 3,22 log₁₀/ml (p<0,05) daugiau nei II-G. Šios genties pirmuonių I-G nenustatyta.

III-G *Opisthotrichum* genties pirmuonių buvo 2,72 log₁₀/ml (p<0,05) daugiau nei I-G ir II-G. I-G ir II-G *Opisthotrichum* genties pirmuonių skaičius buvo vienodas.

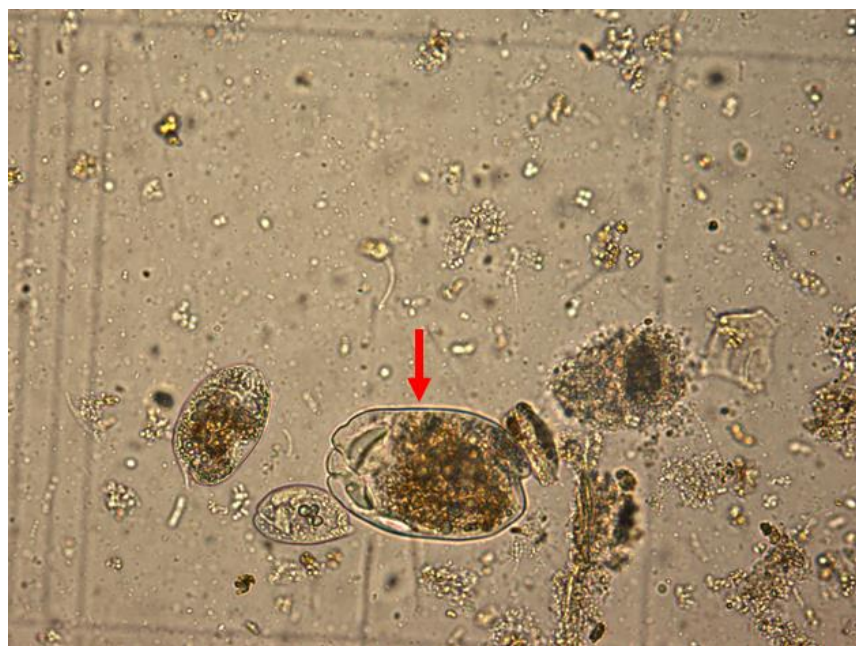
Ostracodinium genties pirmuonių III-G buvo 1,32 log₁₀/ml (p>0,05) ir 1,71 log₁₀/ml (p<0,05) daugiau nei I-G ir II-G atitinkamai. I-G *Ostracodinium* genties pirmuonių buvo 0,39 log₁₀/ml (p>0,05) daugiau nei II-G, tačiau statistinio reikšmingumo nėra.

Pirmuonių pasiskirstymas kiekvienoje grupėje pagal gentis pavaizduotas 10-12 paveiksluose.



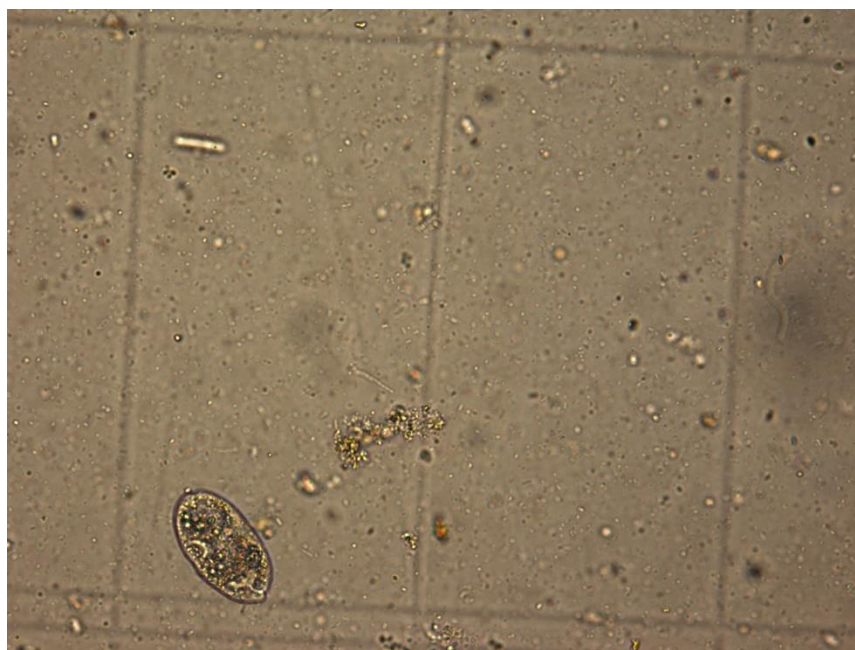
4 pav. *Diplodinium gentic pirtuonis*

Fuchs-Rosenthal skaičiavimo kameros tinklelio matomo vieno langelio dydis – 250x250 μm (autorės nuotrauka).



5 pav. *Enoploplastron gentic pirtuonis*

Enoploplastron gentic pirtuonis pažymėtas raudona rodykle. Fuchs-Rosenthal skaičiavimo kameros tinklelio matomo vieno langelio dydis – 250x250 μm (autorės nuotrauka).



6 pav. *Entodinium genties pirmuonis*

Fuchs-Rosenthal skaičiavimo kameros tinklelio matomo vieno langelio dydis – 250x250 μm (autorės nuotrauka).



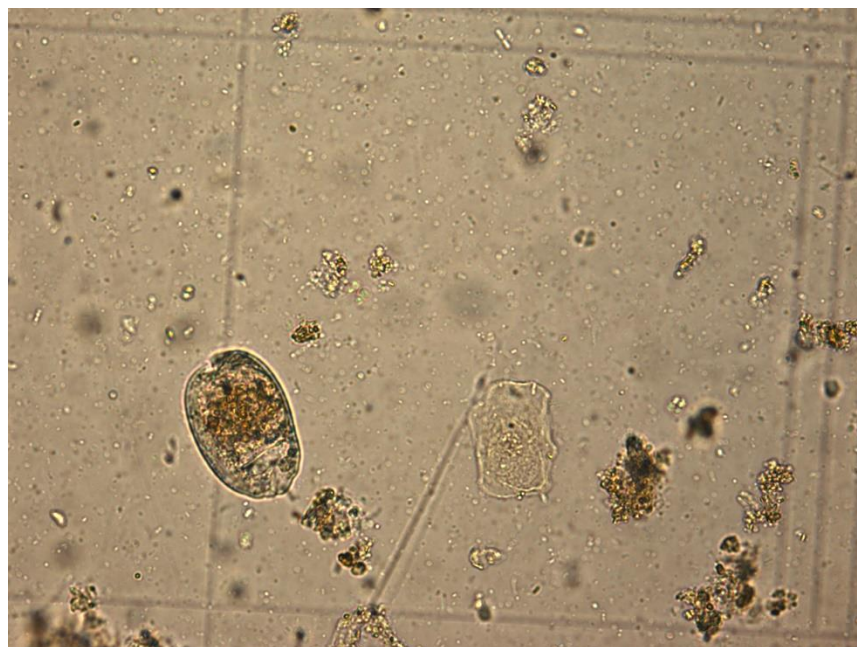
7 pav. *Isotricha genties pirmuonis*

Isotricha genties pirmuonis pažymėtas raudona rodykle. Fuchs-Rosenthal skaičiavimo kameros tinklelio matomo vieno langelio dydis – 250x250 μm (autorės nuotrauka).



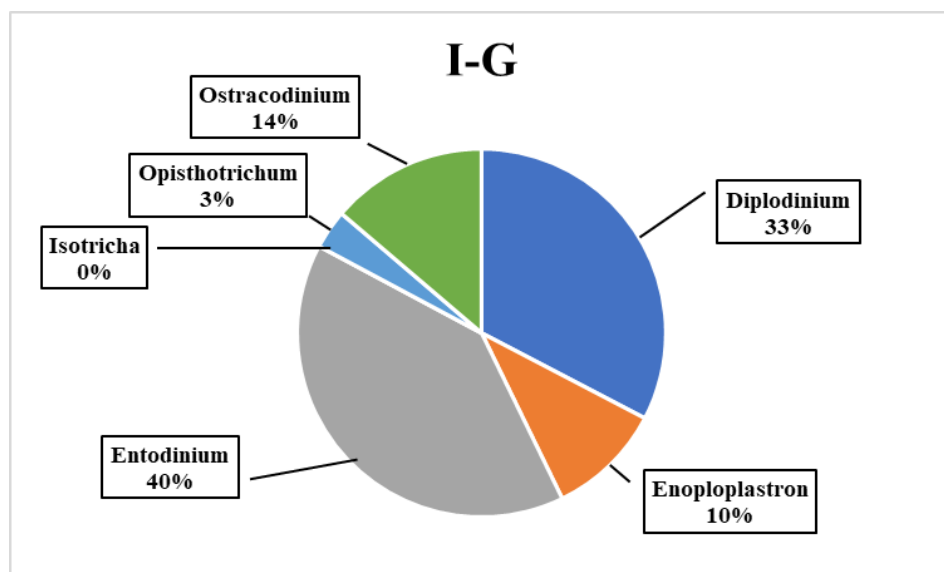
8 pav. *Opisthotrichum genties pirmuonis*

Opisthotrichum genties pirmuonis pažymėtas raudona rodykle. Fuchs-Rosenthal skaičiavimo kameros tinklelio matomo vieno langelio dydis – 250x250 μm (autorės nuotrauka).

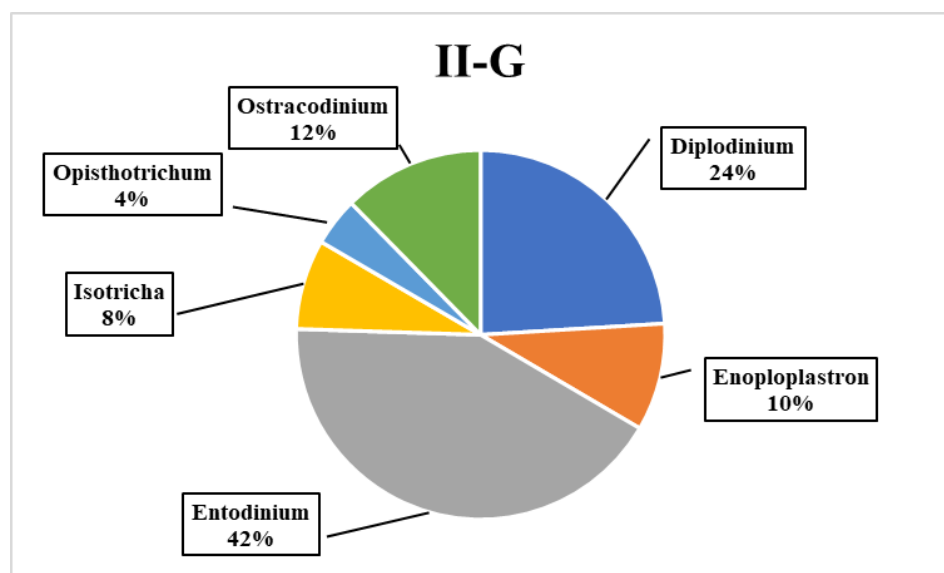


9 pav. *Ostracodinium genties pirmuonis*

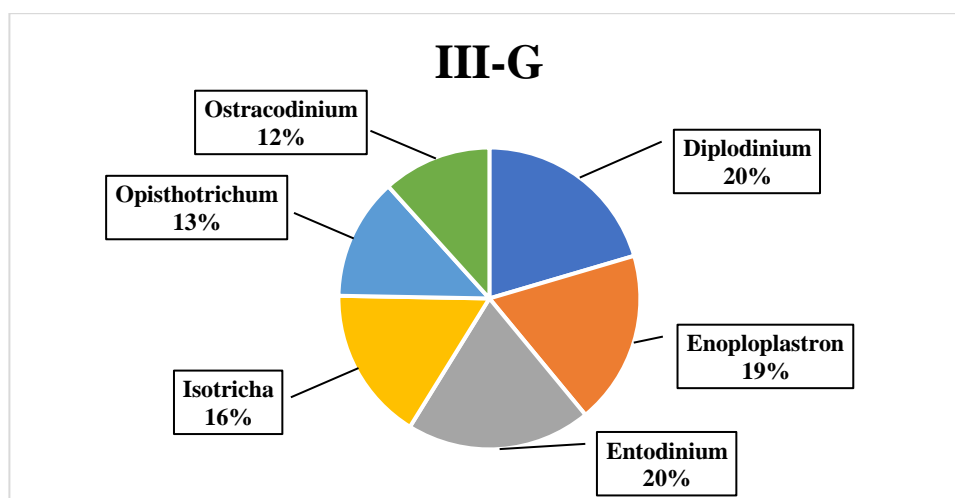
Fuchs-Rosenthal skaičiavimo kameros tinklelio matomo vieno langelio dydis – 250x250 μm (autorės nuotrauka).



10 pav. I-G didžiojo prieskrandžio turinio pirmuonių pasiskirstymas pagal gentis



11 pav. II-G didžiojo prieskrandžio turinio pirmuonių pasiskirstymas pagal gentis



12 pav. III-G didžiojo prieskrandžio turinio pirmuonių pasiskirstymas pagal gentis

Atlikus rodiklių dispersinę analizę (3 lent.), nustatyta, kad skirtingas amžius turėjo įtakos bendram pirmuonių skaičiui, pirmuonių genčių *Diplodinium*, *Enoploplastron*, *Entodinium*, *Isotricha* ir *Opisthotrichum* skaičiams statistiškai reikšmingai ($p < 0,05$). Amžius įtakos neturėjo pirmuonių genties *Ostracodinium* skaičiui ($p > 0,05$). Didžiausia amžiaus įtaka buvo pirmuonių genties *Isotricha* skaičiui.

3 lentelė. Amžiaus įtaka bendram pirmuonių skaičiui ir atskirų pirmuonių genčių skaičiui didžiojo prieskrandžio turinyje

Rodiklis	Amžius turi įtakos tiriamam rodikliui	p reikšmė	Amžiaus įtaka, proc.
Bendras pirmuonių skaičius	Taip	0,0000	68,4
Pirmuonių gentis <i>Diplodinium</i>	Taip	0,0008	40,8
Pirmuonių gentis <i>Enoploplastron</i>	Taip	0,0000	59,7
Pirmuonių gentis <i>Entodinium</i>	Taip	0,0153	26,6
Pirmuonių gentis <i>Isotricha</i>	Taip	0,0000	82,6
Pirmuonių gentis <i>Opisthotrichum</i>	Taip	0,0001	51,0
Pirmuonių gentis <i>Ostracodinium</i>	Ne	0,1112	15,0

3.2 Didžiojo prieskrandžio turinio bakterijų ir jų aktyvumo tyrimo rezultatai

Ištyrus I-G, II-G ir III-G veršelių didžiojo prieskrandžio turinio aerobinių ir fakultatyvinių anaerobinių bakterijų (ABS) skaičių, enterobakterijų, pieno rūgšties bakterijų, enterokokų bei mielinių ir pelėsinių grybų skaičius (4 lent.), nustatyta, kad rodikliai tarp grupių skyrėsi statistiškai reikšmingai ($p < 0,05$).

4 lentelė. Didžiojo prieskrandžio turinio aerobinių ir fakultatyvinių anaerobinių bakterijų skaičiaus, enterobakterijų, pieno rūgšties bakterijų, enterokokų bei mielinių ir pelėsinių grybų rezultatai

Rodiklis	I-G		
	Vid.±SD	Min	Max
ABS, log10/g	3,19±2,76*	0,00	6,00
Enterobakterijos, log10/g	0,00±0,00	0,00	0,00
Pieno rūgšties bakterijos, log10/g	0,00±0,00***	0,00	0,00
Enterokokai, log10/g	0,00±0,00	0,00	0,00
Mieliniai ir pelėsiniai grybai, log10/g	0,47±1,48	0,00	4,67
Rodiklis	II-G		
	Vid.±SD	Min	Max
ABS, log10/g	2,82±2,98**	0,00	6,26
Enterobakterijos, log10/g	0,52±1,64	0,00	5,20
Pieno rūgšties bakterijos, log10/g	2,21±2,87***	0,00	6,25
Enterokokai, log10/g	0,00±0,00	0,00	0,00
Mieliniai ir pelėsiniai grybai, log10/g	0,00±0,00	0,00	0,00
Rodiklis	III-G		
	Vid.±SD	Min	Max
ABS, log10/g	5,47±0,36***	5,02	6,35
Enterobakterijos, log10/g	0,47±1,49	0,00	4,72
Pieno rūgšties bakterijos, log10/g	4,15±2,20***	0,00	5,55
Enterokokai, log10/g	0,00±0,00	0,00	0,00
Mieliniai ir pelėsiniai grybai, log10/g	0,00±0,00	0,00	0,00

* - $p < 0,05$ lyginant I-G ir III-G; ** - $p < 0,05$ lyginant II-G ir III-G; *** - $p < 0,05$;

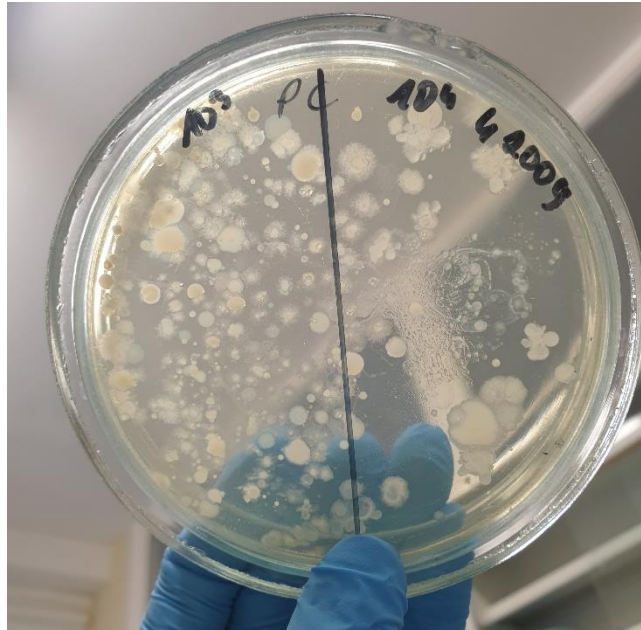
Lyginant skirtingo amžiaus veršelių didžiojo prieskrandžio turinyje esantį ABS (13 pav.), nustatyta, kad III-G ABS buvo 2,28 log10/g ($p < 0,05$) ir 2,65 log10/g ($p < 0,05$) didesnis nei atitinkamai I-G ir II-G. I-G ABS buvo 0,37 log10/g didesnis nei II-G, tačiau rezultatas nėra statistiškai reikšmingas ($p > 0,05$).

Enterobakterijų (14 pav.) daugiausia buvo II-G – 0,52 log10/g daugiau nei I-G ir 0,05 log10/g daugiau nei III-G, tačiau statistiškai nereikšmingai ($p > 0,05$). I-G mėginiuose enterobakterijų nenustatyta.

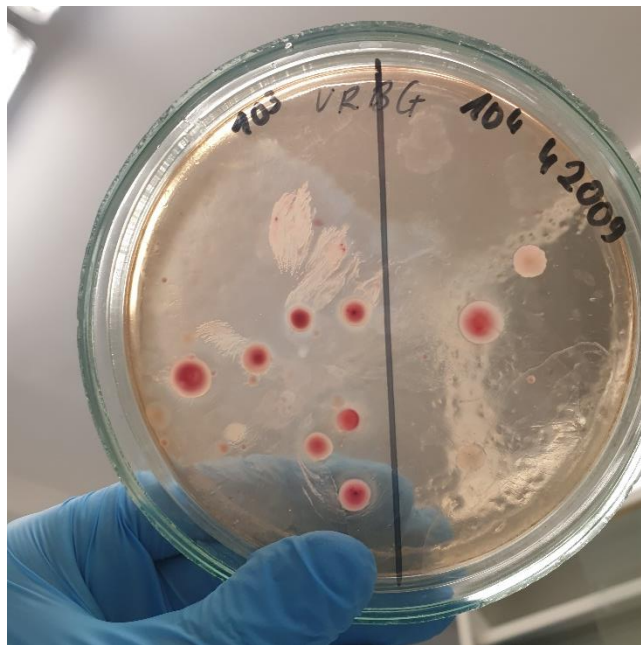
Pieno rūgšties bakterijų (15 pav.) III-G buvo 4,15 log10/g ($p < 0,05$) ir 1,94 log10/g ($p < 0,05$) daugiau nei atitinkamai I-G ir II-G. II-G šių bakterijų buvo 2,21 log10/g ($p < 0,05$) daugiau nei I-G. I-G pieno rūgšties bakterijų nenustatyta.

Enterokokų nenustatyta nei vienos grupės veršelių didžiojo prieskrandžio turinyje.

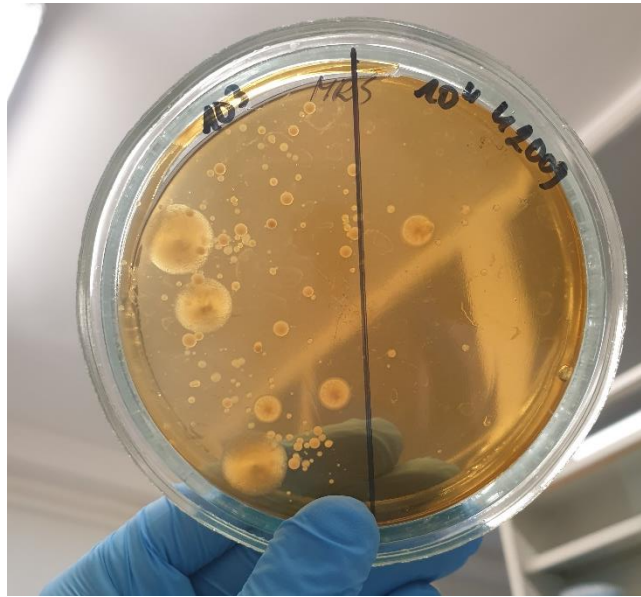
Mieliniai ir pelėsiniai grybai (16 pav.) nustatyti tik I-G mėginiuose – 0,47 log10/g daugiau nei II-G ir III-G, tačiau statistinio reikšmingumo nėra.



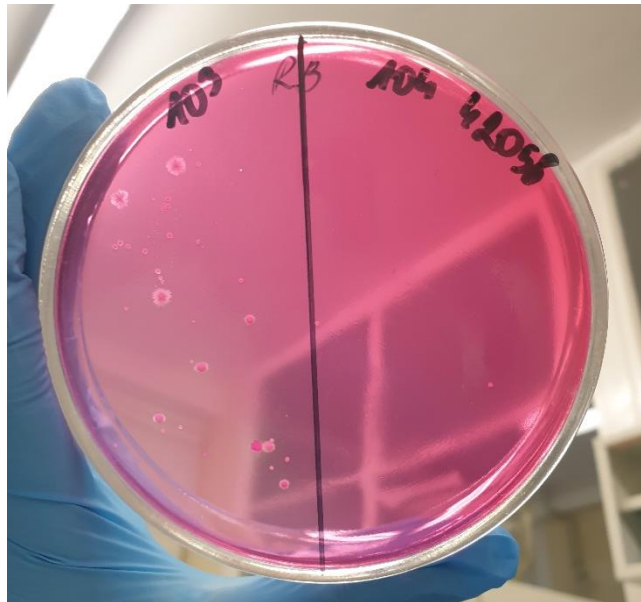
13 pav. Aerobinės ir fakultatyvinės anaerobinės bakterijos (autorės nuotrauka)



14 pav. Enterobakterijos (autorės nuotrauka)



15 pav. Pieno rūgšties bakterijos (autorės nuotrauka)



16 pav. Mieliniai ir pelėsiniai grybai (autorės nuotrauka)

Ištirus fermentacijos intensyvumą (5 lent.) verselių didžiajame prieskrandyje nustatyta, kad gliukozės rūgimo reakcija intensyviausiai vyko I-G – dujų išsiskyre $0,13 \text{ cm}^3/\text{h}$ ir $0,62 \text{ cm}^3/\text{h}$ daugiau nei atitinkamai II-G ir III-G, tačiau rezultatas nėra statistiškai reikšmingas ($p > 0,05$).

5 lentelė. Didžiojo prieskrandžio turinio gliukozės rūgimo reakcijos rezultatai

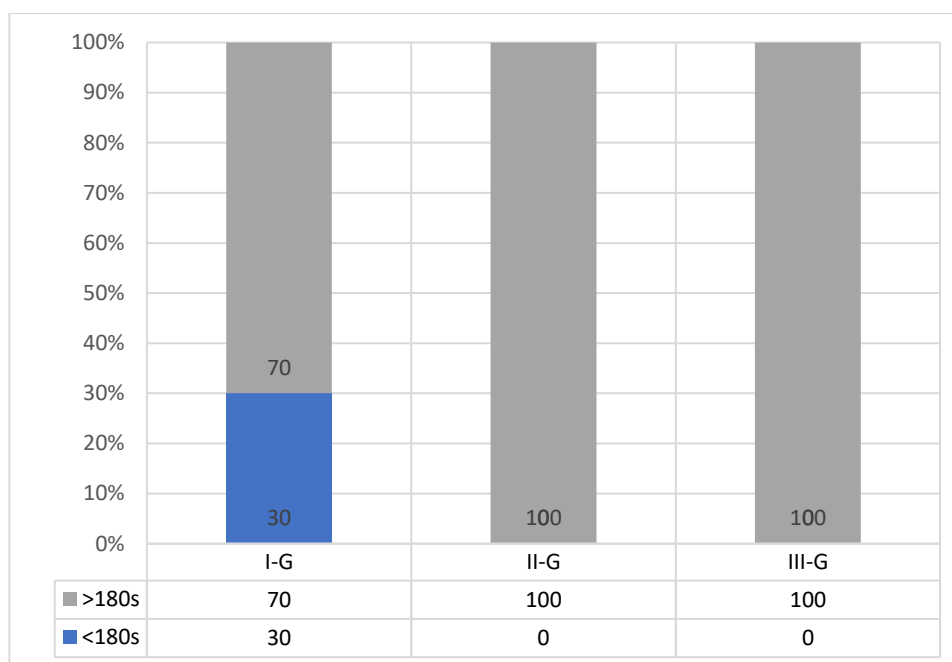
Rodiklis	I-G		
	Vid.±SD	Min	Max
Gliukozės rūgimo reakcija, cm ³ /h	2,67±1,54	0,00	4,1
	II-G		
	Vid.±SD	Min	Max
	2,54±1,26	0,00	3,7
	III-G		
	Vid.±SD	Min	Max
	2,05±0,92	0,50	3,9

Atlikus rodiklių dispersinę analizę (6 lent.), nustatyta, kad skirtingas veršelių amžius turėjo įtakos ABS ir pieno rūgšties bakterijų skaičiui statistiškai reikšmingai ($p < 0,05$). Amžius įtakos neturėjo enterobakterijų, mielinių ir pelėsinių grybų skaičiams bei gliukozės rūgimo reakcijos intensyvumui ($p > 0,05$). Didžiausia amžiaus įtaka buvo pieno rūgšties bakterijų skaičiui.

6 lentelė. Amžiaus įtaka bakterijų skaičiui ir gliukozės rūgimo reakcijos intensyvumui

Rodiklis	Amžius turi įtakos tiriamam rodikliui	p reikšmė	Amžiaus įtaka, proc.
ABS	Taip	0,0373	21,6
Enterobakterijos	Ne	0,6107	3,6
Pieno rūgšties bakterijos	Taip	0,0006	42,3
Enterokokai	-	-	-
Mieliniai ir pelėsiniai grybai	Ne	0,3811	6,9
Gliukozės rūgimo reakcija	Ne	0,5207	4,7

Analizuojant redukcinio bakterijų aktyvumo priklausomybę nuo amžiaus (17 pav.), nustatyta, kad I-G redukcinis bakterijų aktyvumas ($< 180s$) pasireiškė 30 proc. daugiau mėginių nei II-G ir III-G ($p < 0,05$). II-G ir III-G visuose mėginiuose redukcinis bakterijų aktyvumas buvo $> 180s$.



16 pav. Redukcinio bakterijų aktyvumo priklausomybė nuo amžiaus

3.3 Didžiojo prieskrandžio turinio biocheminių rodiklių tyrimo rezultatai

Ištyrus I-G, II-G ir III-G veršelių didžiojo prieskrandžio turinio biocheminius rodiklius – pH, bendrą azoto kiekį ir amoniako azoto kiekį (7 lent.), nustatyta, kad rodikliai tarp grupių skyrėsi statistiškai reikšmingai ($p < 0,05$).

7 lentelė. Didžiojo prieskrandžio turinio biocheminių rodiklių – pH, bendro azoto kiekio ir amoniako azoto kiekio rezultatai

Rodiklis	I-G		
	Vid. \pm SD	Min	Max
pH	5,59 \pm 0,60	4,5	6,5
Bendras azoto kiekis, mg/100ml	197,12 \pm 73,91*	78,4	333,2
Amoniako azoto kiekis, mg/100ml	45,14 \pm 20,31*	14,56	79,52
Rodiklis	II-G		
	Vid. \pm SD	Min	Max
pH	5,67 \pm 0,41	5,2	6,6
Bendras azoto kiekis, mg/100ml	124,88 \pm 37,27*	71,4	186,2
Amoniako azoto kiekis, mg/100ml	23,69 \pm 10,64**	6,72	42,56
Rodiklis	III-G		
	Vid. \pm SD	Min	Max
pH	5,78 \pm 0,48	4,9	6,3
Bendras azoto kiekis, mg/100ml	76,72 \pm 27,42*	51,8	142,8
Amoniako azoto kiekis, mg/100ml	20,10 \pm 3,14***	14,00	23,52

* - $p < 0,05$; ** - $p < 0,05$ lyginant I-G ir II-G; *** - $p < 0,05$ lyginant I-G ir III-G;

III-G veršelių didžiojo prieskrandžio turinio pH buvo 0,19 ir 0,11 didesnis nei atitinkamai I-G ir II-G. II-G pH rodiklis buvo 0,08 didesnis nei I-G. Skirtumai tarp grupių nebuvo statistiškai reikšmingi ($p > 0,05$).

Bendras azoto kiekis buvo didžiausias I-G – 72,24 mg/100ml ($p < 0,05$) ir 120,4 mg/100ml ($p < 0,05$) didesnis nei atitinkamai II-G ir III-G. II-G bendras azoto kiekis buvo 48,16 mg/100ml ($p < 0,05$) didesnis nei III-G.

I-G amoniako azoto kiekis buvo 21,45 mg/100ml ($p < 0,05$) ir 25,04 mg/100ml ($p < 0,05$) didesnis nei atitinkamai II-G ir III-G. II-G amoniako azoto buvo 3,59 mg/100ml ($p < 0,05$) daugiau nei III-G.

Atlikus biocheminių rodiklių dispersinę analizę (8 lent.), nustatyta, kad skirtingas veršelių amžius turėjo įtakos bendram azoto kiekiui bei amoniako azoto kiekiui statistiškai reikšmingai ($p < 0,05$). Amžius įtakos neturėjo pH rodikliui ($p > 0,05$). Didžiausia amžiaus įtaka buvo bendram azoto kiekiui.

8 lentelė. Amžiaus įtaka biocheminiams rodikliams

Rodiklis	Amžius turi įtakos tiriamam rodikliui	p reikšmė	Amžiaus įtaka, proc.
pH	Ne	0,6991	2,6
Bendras azoto kiekis	Taip	0,0001	51,8
Amoniako azoto kiekis	Taip	0,0005	43,2

3.4 Didžiojo prieskrandžio turinio biocheminių ir mikrobiologinių rodiklių koreliacinė analizė

Veršelių didžiojo prieskrandžio turinio biocheminių ir mikrobiologinių rodiklių koreliacinės analizės rezultatai pateikti 9 lentelėje.

Stipri teigiama koreliacija nustatyta tarp PS-*Enoploplastron* ir PS ($r=0,791$, $p < 0,05$), PS-*Entodinium* ir PS ($r=0,700$, $p < 0,05$), PS-*Isotricha* ir PS ($r=0,837$, $p < 0,05$), PS-*Opisthotrichum* ir PS ($r=0,725$, $p < 0,05$), PS-*Isotricha* ir PS-*Enoploplastron* ($r=0,770$, $p < 0,05$), NH₃-NK ir NK ($r=0,753$, $p < 0,05$). Koreliaciniai ryšiai tarp šių porų buvo statistiškai patikimi.

Vidutinė teigiama koreliacija nustatyta tarp PS-*Diplodinium* ir PS ($r=0,686$, $p < 0,05$), PS-*Ostracodinium* ir PS ($r=0,475$, $p < 0,05$), ABS ir PS ($r=0,371$, $p < 0,05$), PS-*Enoploplastron* ir PS-*Diplodinium* ($r=0,543$, $p < 0,05$), PS-*Entodinium* ir PS-*Diplodinium* ($r=0,489$, $p < 0,05$), PS-*Isotricha* ir PS-*Diplodinium* ($r=0,618$, $p < 0,05$), PS-*Opisthotrichum* ir PS-*Diplodinium* ($r=0,520$, $p < 0,05$), PS-

Entodinium ir PS-*Enoploplastron* ($r=0,435$, $p<0,05$), PS-*Opisthotrichum* ir PS-*Enoploplastron* ($r=0,604$, $p<0,05$), PS-*Ostracodinium* ir PS-*Enoploplastron* ($r=0,392$, $p<0,05$), ABS ir PS-*Enoploplastron* ($r=0,493$, $p<0,05$), PBS ir PS-*Enoploplastron* ($r=0,400$, $p<0,05$), PS-*Isotricha* ir PS-*Entodinium* ($r=0,421$, $p<0,05$), PS-*Opisthotrichum* ir PS-*Entodinium* ($r=0,476$, $p<0,05$), PS-*Opisthotrichum* ir PS-*Isotricha* ($r=0,615$, $p<0,05$), PS-*Ostracodinium* ir PS-*Isotricha* ($r=0,476$, $p<0,05$), PBS ir PS-*Isotricha* ($r=0,434$, $p<0,05$), ABS ir PS-*Opisthotrichum* ($r=0,426$, $p<0,05$), PBS ir ABS ($r=0,421$, $p<0,05$). Koreliaciniai ryšiai tarp šių porų buvo statistiškai patikimi.

Vidutinė neigiama koreliacija nustatyta tarp PS-*Opisthotrichum* ir GluR ($r=-0,431$, $p<0,05$), NK ir PS-*Enoploplastron* ($r=-0,418$, $p<0,05$), NK ir PS-*Isotricha* ($r=-0,634$, $p<0,05$), NH₃-NK ir PS-*Isotricha* ($r=-0,477$, $p<0,05$), NK ir PS-*Opisthotrichum* ($r=-0,411$, $p<0,05$), ABS ir NK ($r=-0,446$, $p<0,05$), PBS ir NK ($r=-0,473$, $p<0,05$), ABS ir NH₃-NK ($r=-0,379$, $p<0,05$), PBS ir NH₃-NK ($r=-0,479$, $p<0,05$). Koreliaciniai ryšiai tarp šių porų buvo statistiškai patikimi.

Kitos neišvardintos poros nebuvo susijusios aukštais ar vidutiniais koreliaciniais ryšiais ir/arba ryšys nebuvo statistiškai patikimas.

9 lentelė. Koreliaciniai ryšiai tarp didžiojo prieskrandžio turinio biocheminių ir mikrobiologinių rodiklių

Rodiklis	pH	GluR	PS	PS- <i>Diplodinium</i>	PS- <i>Enoploplastron</i>	PS- <i>Entodinium</i>	PS- <i>Isotricha</i>	PS- <i>Opisthotrichum</i>	PS- <i>Ostracodinium</i>	NK	NH ₃ -NK	ABS	EBS	PBS	MPGS
pH	1,000														
GluR	0,140	1,000													
PS	0,105	-0,196	1,000												
PS- <i>Diplodinium</i>	0,180	-0,244	0,686*	1,000											
PS- <i>Enoploplastron</i>	0,046	-0,123	0,791*	0,543*	1,000										
PS- <i>Entodinium</i>	0,055	-0,064	0,700*	0,489*	0,435*	1,000									
PS- <i>Isotricha</i>	0,093	-0,245	0,837*	0,618*	0,770*	0,421*	1,000								
PS- <i>Opisthotrichum</i>	0,039	-0,431*	0,725*	0,520*	0,604*	0,476*	0,615*	1,000							
PS- <i>Ostracodinium</i>	0,271	0,149	0,475*	0,274	0,392*	0,010	0,476*	0,125	1,000						
NK	-0,292	0,088	-0,339	-0,247	-0,418*	-0,002	-0,634*	-0,411*	-0,255	1,000					
NH ₃ -NK	-0,149	0,081	-0,232	-0,236	-0,353	0,077	-0,477*	-0,310	-0,030	0,753*	1,000				
ABS	0,263	-0,091	0,371*	0,099	0,493*	0,114	0,271	0,426*	0,188	-0,446*	-0,379*	1,000			
EBS	-0,060	-0,256	0,071	0,152	-0,048	0,058	0,278	0,065	0,004	-0,254	-0,179	-0,128	1,000		
PBS	-0,074	0,029	0,242	0,027	0,400*	-0,078	0,434*	0,269	0,050	-0,473*	-0,479*	0,421*	0,043	1,000	
MPGS	-0,065	0,254	-0,062	0,015	0,131	0,026	-0,151	-0,131	-0,173	0,027	-0,024	0,091	-0,050	-0,151	1,000

* - p<0,05

GluR – gliukozės rūgimo reakcija; PS – pirmuonių skaičius; PS-*Diplodinium* – *Diplodinium* genties pirmuonių skaičius; PS-*Enoploplastron* – *Enoploplastron* genties pirmuonių skaičius; PS-*Entodinium* – *Entodinium* genties pirmuonių skaičius; PS-*Isotricha* – *Isotricha* genties pirmuonių skaičius; PS-*Opisthotrichum* – *Opisthotrichum* genties pirmuonių skaičius; PS-*Ostracodinium* – *Ostracodinium* genties pirmuonių skaičius; NK – bendras azoto kiekis; NH₃-NK – amoniako azoto kiekis; ABS – aerobinių ir fakultatyvinių anaerobinių bakterijų skaičius; EBS – enterobakterijų skaičius; PBS – pienarūgščių bakterijų skaičius; MPGS – mielinių ir pelėsinų grybų skaičius;

4. TYRIMO REZULTATŲ APTARIMAS

Ką tik gimęs veršelis iš pradžių maitinasi tik pienu ar pieno pakaitalu, todėl didžiajame prieskrandyje nevyksta sudėtingi fermentaciniai procesai, kurie prasideda, kai į veršelio mitybą įvedami stambieji pašarai (14). Veršeliui augant labai intensyviai vyksta didžiojo prieskrandžio mikroorganizmų kolonizacija (16). Tai yra būtina, kad veršelio suvartojami augaliniai pašarai būtų paversti maistinėmis medžiagomis (14). Suprantant kaip ir kodėl kinta veršelių didžiojo prieskrandžio biocheminiai ir mikrobiologiniai rodikliai, galima geriau parinkti tinkamą veršelio nujunkymo strategiją, sudėlioti planą, kaip, kada ir kokie stambieji pašarai bus įvedami į veršelio mitybą.

Atlikus tyrimą nustatyta, kad veršelių didžiajame prieskrandyje pirmuonių skaičius didėja veršeliui augant. Nustatėme, kad 8 mėn. veršelių didžiojo prieskrandžio turinyje pirmuonių skaičius buvo 19,82 proc. didesnis ($p < 0,05$) nei 3 mėn. amžiaus veršelių, o 3 ir 3,5 mėn. amžiaus veršelių šis rodiklis skyrėsi tik 5,28 proc. ir buvo statistiškai nereikšmingas. J. K. van Niekerk ir bendraautorai (35) savo tyrime nustatė, kad 5 ir 12 savaičių veršelių didžiajame prieskrandyje pirmuonių skaičius beveik nekinta, t. y. 12 savaičių amžiaus veršelių didžiajame prieskrandyje pirmuonių buvo tik 5,71 proc. daugiau nei 5 savaičių amžiaus. Manome, kad pirmuonių skaičiaus didėjimas susijęs su veršelių šėrimo pasikeitimu, kai nujunkyti veršeliai pereina prie suaugusiems gyvūnams būdingo raciono ir jų didžiojo prieskrandžio mikrobiologiniai procesai palaipsniui adaptuojasi prie pakitusių sąlygų, susidarantių dėl raciono sudėties pasikeitimo. Pirmuonys aktyviai dalyvauja stambiųjų pašarų skaidymo procesuose ir jų skaičiui turi įtakos šių pašarų kiekis racione (19).

H. Huuki ir kiti autoriai (36) ištyrė, kad 2 mėnesių amžiaus veršelių didžiojo prieskrandžio turinyje vyrauja *Isotricha* genties pirmuonys. Mūsų tyrimo rezultatai parodė, kad 3 mėnesių amžiaus veršelių didžiajame prieskrandyje vyraavo *Entodinium* genties pirmuonys ir sudarė net 40 proc. bendro pirmuonių skaičiaus. Tuo tarpu 8 mėnesių amžiaus veršelių didžiajame prieskrandyje daugiausia buvo *Entodinium* ir *Diplodinium* genčių pirmuonių (po 20 proc. bendro pirmuonių skaičiaus). S. Yuste ir kiti autoriai (37) savo tyrime nustatė, kad 7 mėnesių amžiaus veršelių didžiajame prieskrandyje vyraavo *Entodinium* ir *Isotricha* pirmuonių gentys. T. A. X. dos Santos ir kolegos (38) atlikę tyrimą teigia, kad 8 mėnesių veršelių didžiojo prieskrandžio turinyje vyraavo *Entodinium* genties pirmuonys. Pirmuonių rūšinę sudėtį lemia du pagrindiniai veiksniai – veršelių kontaktavimas su suaugusiais arba vyresniais galvijais ir ėdamo pašaro sudėtis (39).

Šiame tyrime lyginant ABS 3 ir 8 mėnesių amžiaus veršelių didžiojo prieskrandžio turinyje, nustatyta, kad 8 mėnesių veršelių didžiojo prieskrandžio turinio ABS buvo 71,47 proc. ($p < 0,05$) didesnis

nei 3 mėnesių veršelių. Tačiau 3 mėn. amžiaus veršelių redukcinis bakterijų aktyvumas buvo didesnis, tai gali būti dėl nepilnai susiformavusios mikrobiotos veršelių didžiajame prieskrandyje. Y. Hao ir kiti autoriai (40) savo tyrime palygino veršelius prieš ir po nujunkymo, jų tyrimo rezultatais, ABS didėja po nujunkymo, nes veršelis suvartoja daugiau stambiųjų pašarų, bakterijų kolonijos atlieka svarbų vaidmenį skaidant celiuliozę, kuri randama augaliniuose pašaruose. J. K. van Niekerk ir bendraautoriai (35) tyrė 5 ir 12 savaičių amžiaus veršelių didžiojo prieskrandžio turinio ABS ir nustatė, kad per šį laikotarpį veršeliui augant bakterijų skaičius sumažėjo 3,6 proc., tačiau tai gali būti dėl sumažėjusio didžiojo prieskrandžio pH, kuris tyrimo pabaigoje pasiekė rūgštinę vertę.

Šiame tyrime analizuojant veršelių didžiojo prieskrandžio biocheminius rodiklius, nustatyta, kad vyresnių veršelių didžiojo prieskrandžio turinio pH nežymiai didėja. Lyginant 3 ir 8 mėnesių amžiaus veršelius, didžiojo prieskrandžio turinio pH vertė padidėjo 3,4 proc. ($p > 0,05$). Literatūros šaltiniuose pavyko rasti gana prieštarigus pH tyrimų rezultatus. S. Yuste ir kiti autoriai (37) savo tyrime nustatė, kad vyresnių veršelių didžiojo prieskrandžio turinio pH mažėja. Tai patvirtina ir Y. Hao su bendraautoriais (40) tyrimas, kuriame jie lygino 2 ir 3 mėnesių amžiaus veršelius. Tačiau J. K. van Niekerk ir kiti autoriai (35) savo tyrime nustatė, kad 3 mėnesių veršelių didžiojo prieskrandžio turinio pH yra didesnis nei 2 mėnesių. Vis dėlto, pH pokyčiai veršeliui augant yra nežymūs ir statistiškai nereikšmingi, didžiojo prieskrandžio turinio pH vertė labai priklauso nuo veršelių šėrimo laiko, pašaro rūšies, suvartojamo pašaro bei vandens kiekio, mėginio ėmimo laiko bei mėginio temperatūros matavimo metu, ir gali varijuoti plačia amplitude.

Ištirus amoniako azoto kiekį veršelių didžiojo prieskrandžio turinyje, pastebėta, kad amoniako azoto kiekis mažėja veršeliui augant – 8 mėnesių veršelių didžiojo prieskrandžio turinio mėginiuose amoniako azoto kiekis buvo 55,47 proc. ($p < 0,05$) mažesnis nei 3 mėnesių veršelių. Bendro azoto kiekis vyresnių veršelių didžiojo prieskrandžio turinyje sumažėjo 61,08 proc. Y. Hao ir kiti autoriai (40) savo tyrime tyrė amoniako azoto kiekį 2 ir 3 mėnesių amžiaus veršelių didžiojo prieskrandžio turinyje ir nustatė, kad amoniako azoto kiekis nežymiai didėja po nujunkymo, tačiau rezultatai nėra statistiškai reikšmingi. Išskiriamas amoniako azoto kiekis didžiajame prieskrandyje susijęs su mikrobinių baltymų sinteze, kuri suintensyvėja pasikeitus veršelio mitybai – pradėjus suvartoti daugiau stambiųjų pašarų.

Vertinant veršelių didžiojo prieskrandžio biocheminių ir mikrobiologinių rodiklių tarpusavio priklausomybę, nustatėme, kad didžiausia priklausomybė yra tarp bendro pirmuonių skaičiaus ir skirtingų pirmuonių genčių skaičiaus, t. y. didėjant skirtingų pirmuonių genčių skaičiui, didėja ir bendras pirmuonių skaičius. Taip pat didėjant amoniako azoto kiekiui didėja ir bendro azoto kiekis.

Analizuojant mikrobiologinių rodiklių tarpusavio priklausomybę, nustatėme, kad didėjant ABS, didėja ir bendras pirmuonių skaičius, taip yra dėl to, kad nujunkius veršelių vystosi didysis prieskrandis, kartu vystosi mikrobiologinė įvairovė, kuri reikalinga augalinių pašarų virškinimui (41). Tas pats galioja ir kitų bakterijų rūšių kolonijoms bei pirmuonių gentims.

Vertinant mikrobiologinių ir biocheminių rodiklių tarpusavio priklausomybę, pastebėta, kad didėjant ABS, pienarūgščių bakterijų skaičiui, mažėja bendro azoto ir amoniako azoto kiekis, tai susiję su suaktyvėjusia mikroorganizmų veikla didžiajame prieskrandyje pasikeitus veršelių mitybai.

IŠVADOS

1. Ištirus 3, 3,5 ir 8 mėnesių amžiaus veršelių didžiojo prieskrandžio turinio mikrobiologinius rodiklius, nustatyta, kad šie rodikliai skyrėsi statistiškai reikšmingai:
 - 1.1. 8 mėn. amžiaus veršelių bendras pirmuonių skaičius buvo vidutiniškai 18,6 proc. didesnis nei 3 ir 3,5 mėn. amžiaus. Visų amžiaus grupių veršelių didžiojo prieskrandžio turinyje vyravo *Entodinium* genties pirmuonys. *Isotricha* genties pirmuonys nustatyti nuo 3,5 mėn. amžiaus veršelių didžiojo prieskrandžio turinyje. 8 mėn. amžiaus veršelių prieskrandžio turinyje *Diplodinium* genties pirmuonių vidutiniškai buvo 1,9 kartų, *Enoploplastron* – 4,8 kartų ir *Opisthotrichum* – 8,6 kartų daugiau nei 3 ir 3,5 mėn. amžiaus. *Entodinium* genties pirmuonių buvo 1,3 kartų ir *Isotricha* – 5,8 kartų daugiau nei 3,5 mėn. amžiaus veršelių.
 - 1.2. 8 mėn. amžiaus veršelių aerobinių ir fakultatyvinių anaerobinių bakterijų skaičius buvo vidutiniškai 45,1 proc. didesnis nei 3 ir 3,5 mėn. amžiaus. Pieno rūgšties bakterijos ir enterobakterijos nustatytos nuo 3,5 mėn. amžiaus ir tuo metu jų skaičius atitinkamai buvo 46,8 proc. mažesnis ir 10,6 proc. didesnis nei 8 mėn. amžiaus veršelių.
2. Ištirus 3, 3,5 ir 8 mėnesių amžiaus veršelių didžiojo prieskrandžio turinio biocheminius rodiklius, nustatyta, kad 8 mėn. amžiaus veršelių bendras azoto kiekis buvo vidutiniškai 2,1 ir amoniako azoto kiekis – 1,7 kartų statistiškai reikšmingai didesnis nei 3 ir 3,5 mėn. amžiaus.
3. Veršelių amžius turėjo statistiškai reikšmingos įtakos bendram pirmuonių skaičiui – 68,4 proc., pirmuonių genčių *Diplodinium*, *Enoploplastron*, *Entodinium*, *Isotricha* ir *Opisthotrichum* skaičiams – vidutiniškai 52,14 proc., aerobinių ir fakultatyvinių anaerobinių bakterijų skaičiui – 21,6 proc., pieno rūgšties bakterijų skaičiui – 42,3 proc. bei bendram ir amoniako azoto kiekiams – vidutiniškai 47,5 proc.
4. Išanalizavus veršelių didžiojo prieskrandžio turinio mikrobiologinių ir biocheminių rodiklių tarpusavio koreliacinius ryšius, nustatyta:
 - 4.1. stipri teigiama koreliacija tarp *Enoploplastron*, *Entodinium*, *Isotricha*, *Opisthotrichum* genčių pirmuonių skaičiaus ir bendro pirmuonių skaičiaus, taip pat tarp amoniako azoto kiekio ir bendro azoto kiekio;
 - 4.2. vidutinė teigiama koreliacija tarp *Diplodinium*, *Ostracodinium* genčių pirmuonių skaičiaus ir bendro pirmuonių skaičiaus. Taip pat tarp aerobinių ir fakultatyvinių anaerobinių bakterijų skaičiaus bei pirmuonių skaičiaus, tarp pienarūgščių bakterijų skaičiaus bei aerobinių ir fakultatyvinių anaerobinių bakterijų skaičiaus;

4.3. vidutinė neigiama koreliacija tarp aerobinių ir fakultatyvinių anaerobinių bakterijų skaičiaus bei bendro azoto kiekio, tarp pienarūgščių bakterijų skaičiaus ir bendro azoto kiekio, tarp aerobinių ir fakultatyvinių anaerobinių bakterijų skaičiaus bei amoniako azoto kiekio, tarp pienarūgščių bakterijų skaičiaus ir amoniako azoto kiekio.

REKOMENDACIJOS

Remiantis šio tyrimo rezultatais, rekomenduojame atliekant suaugusiems galvijams skirtų pašarų ar jų priedų tyrimus, rinktis tokio amžiaus galvijus, kurių didžiojo prieskrandžio mikrobiota jau yra susiformavusi. Veršelių didžiajame prieskrandyje jų brendimo metu vyksta daug mikrobiologinių ir biocheminių kitimų, kurie gali turėti įtakos pašarų ar jų priedų tyrimo rezultatams.

PADĖKA

Labai dėkoju savo darbo vadovei prof. dr. Rasai Želvytei už žinias, visapusišką pagalbą ir palaikymą rašant baigiamąjį magistro darbą. Dėkoju dr. Ignui Šilinskui, Gabrielei Vasiliauskienei, Robertui Vyšniauskui už pagalbą atliekant tyrimą.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Arshad M, Hassan F, Saif-Ur-Rehman M, Huws S, Cheng Y, Din AU. Gut microbiome colonization and development in neonatal ruminants: Strategies, prospects, and opportunities. *Animal Nutrition* [Internet]. 2021;7(3):883–95. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2021.03.004>
2. Zhang Y, Choi SH, Nogoy KMC, Liang S. Review: The development of the gastrointestinal tract microbiota and intervention in neonatal ruminants. *Animal* [Internet]. 2021;15(8):100316. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2021.100316>
3. Meale SJ, Chaucheyras-Durand F, Berends H, Guan LL, Steele MA. From pre- to postweaning: Transformation of the young calf's gastrointestinal tract. *Journal of Dairy Science* [Internet]. 2017;100(7):5984–95. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12474>
4. Schwarzkopf S, Kinoshita A, Hüther L, Salm L, Kehraus S, Südekum K, et al. Weaning age influences indicators of rumen function and development in female Holstein calves. *BMC Veterinary Research* [Internet]. 2022;18(1). <https://doi.org/10.1186/s12917-022-03163-1>
5. Arowolo MA, He J. Use of probiotics and botanical extracts to improve ruminant production in the tropics: A review. *Animal Nutrition* [Internet]. 2018;4(3):241–9. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2018.04.010>
6. Bach À, López-García A, González-Recio Ó, Elcoso G, Fàbregas F, Chaucheyras-Durand F, et al. Changes in the rumen and colon microbiota and effects of live yeast dietary supplementation during the transition from the dry period to lactation of dairy cows. *Journal of Dairy Science* [Internet]. 2019;102(7):6180–98. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-16105>
7. Dias AMPG, De Freitas JA, Micai B, De Azevedo RA, Greco LF, Santos JEP. Effect of supplemental yeast culture and dietary starch content on rumen fermentation and digestion in dairy cows. *Journal of Dairy Science* [Internet]. 2018;101(1):201–21. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13241>
8. McAllister TA, Beauchemin KA, Alazzeh AY, Baah J, Teather RM, Stanford K. Review: The use of direct fed microbials to mitigate pathogens and enhance production in cattle. *Canadian Journal of Animal Science* [Internet]. 2011;91(2):193–211. <https://doi.org/10.4141/cjas10047>
9. Miciński J, Miciński J, Matusievičius P, Stankeviče G, Želvytė R, Monkevičienė I, et al. Mixtures of extruded rape seed (*Brassica napus*) and faba beans (*Vicia faba*) in diet of dairy cows - ruminal and milk parameters. *Journal of Elementology* [Internet]. 2022;(1/2022). <https://doi.org/10.5601/jelem.2021.26.4.2198>

10. Stepanchenko N, Stefenoni H, Hennessy ML, Nagaraju I, Wasson DE, Cueva SF, et al. Microbial composition, rumen fermentation parameters, enteric methane emissions, and lactational performance of phenotypically high and low methane-emitting dairy cows. *Journal of Dairy Science* [Internet]. 2023;106(9):6146–70. <https://doi.org/10.3168/jds.2022-23190>
11. Imani M, Mirzaei M, Baghbanzadeh-Nobari B, Ghaffari M. Effects of forage provision to dairy calves on growth performance and rumen fermentation: A meta-analysis and meta-regression. *Journal of Dairy Science* [Internet]. 2017;100(2):1136–50. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11561>
12. Xiao J, Alugongo GM, Chung R, Dong S, Li SL, Yoon I, et al. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation products on dairy calves: Ruminal fermentation, gastrointestinal morphology, and microbial community. *Journal of Dairy Science* [Internet]. 2016;99(7):5401–12. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10563>
13. Yáñez-Ruíz DR, Abecia L, Newbold CJ. Manipulating rumen microbiome and fermentation through interventions during early life: a review. *Frontiers in Microbiology* [Internet]. 2015;6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01133>
14. Khan MA, Bach À, Weary DM, Von Keyserlingk MAG. Invited review: Transitioning from milk to solid feed in dairy heifers. *Journal of Dairy Science* [Internet]. 2016 ;99(2):885–902. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9975>
15. Diao Q, Zhang R, Fu T. Review of strategies to promote Rumen Development in Calves. *Animals* [Internet]. 2019;9(8):490. <https://doi.org/10.3390/ani9080490>
16. Júnior GFV, Bittar CMM. Microbial colonization of the gastrointestinal tract of dairy calves – a review of its importance and relationship to health and performance. *Animal Health Research Reviews* [Internet]. 2021;22(2):97–108. <https://doi.org/10.1017/s1466252321000062>
17. Jones CM, Heinrichs J. Feeding the newborn dairy calf. PennStateExtension. December 8, 2022. Accessed December 5, 2023. <https://extension.psu.edu/feeding-the-newborn-dairy-calf>
18. Yohe TT. Recent research on rumen development in dairy calves. Tri-State Dairy Nutrition Conference. 2021:111-125.
19. Du Y, Gao Y, Hu M, Hou J, Yang L, Wang X, et al. Colonization and development of the gut microbiome in calves. *Journal of Animal Science and Biotechnology* [Internet]. 2023;14(1). <https://doi.org/10.1186/s40104-023-00856-x>

20. Amin N, Schwarzkopf S, Kinoshita A, Tröscher-Mußotter J, Dänicke S, Camarinha-Silva A, et al. Evolution of rumen and oral microbiota in calves is influenced by age and time of weaning. *Animal Microbiome* [Internet]. 2021;3(1). <https://doi.org/10.1186/s42523-021-00095-3>
21. Li K, Shi B, Ren-Hua N. The colonization of rumen microbiota and intervention in Pre-Weaned ruminants. *Animals* [Internet]. 2023;13(6):994. <https://doi.org/10.3390/ani13060994>
22. Dill-McFarland KA, Breaker JD, Suen G. Microbial succession in the gastrointestinal tract of dairy cows from 2 weeks to first lactation. *Scientific Reports* [Internet]. 2017;7(1). <https://doi.org/10.1038/srep40864>
23. VMVT direktoriaus įsakymas dėl veršelių gerovės reikalavimų patvirtinimo Nr. B1-689, 2019-09-20; TAR 2019-09-23, Nr. 14981.
24. Wood KM, Palmer S, Steele MA, Metcalf JA, Penner GB. The influence of age and weaning on permeability of the gastrointestinal tract in Holstein bull calves. *Journal of Dairy Science* [Internet]. 2015;98(10):7226–37. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9393>
25. Matusėvičius P, Jukna V, Drochner W, Jeroch H, Steinhofel O, Stoger E, Schwarz FJ, Weber M, Wleck S, Knaus W, Wagner E, Zollitsch W. Gyvūnų šėrimas. Mokomoji knyga. Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Veterinarijos akademija, Aleksandro Stulginskio universitetas; 2017:43-49.
26. Geishauser T. An instrument for collection and transfer of ruminal fluid and for administration of water soluble drugs in adult cattle. *Bovine Practitioner*, 1993,27:38-42.
27. Stern MD, Endres MI. *Laboratory manual: research techniques in ruminant physiology*. Minnesota, USA. 1991;10-17.
28. Sederevičius A, Monkevičienė I, Želvytė R, Žymantienė J, Girnius B. Virškinimas atrajotojų didžiajame prieskrandyje. Kaunas; 2001:10-21.
29. Dehority BA. *Laboratory Manual for Classification and Morphology of Rumen Ciliate Protozoa*. CRC Press; 2018:9-99.
30. ISO 4833-1:2013. *Microbiology of the food chain — Horizontal method for the enumeration of microorganisms — Part 1: Colony count at 30°C by the pour plate technique*.
31. LST ISO 15214:2009. *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria – Colony-count technique at 30°C (ISO 15214:1998 identical)*.

32. LST ISO 21528-2:2009. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal methods for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae – Part 2: Colony-count method (ISO 21528-2:2004, identical).
33. LST EN ISO 7899-2:2001. Water quality - Detection and enumeration of intestinal enterococci - Part 2: Membrane filtration method (ISO 7899-2:2000).
34. LST ISO 6611:2004 Milk and milk products. Enumeration of colony-forming units of yeasts and/or moulds. Colony-count technique at 25°C (idt ISO 6611:2004).
35. Van Niekerk JK, Middeldorp M, Guan LL, Steele MA. Preweaning to postweaning rumen papillae structural growth, ruminal fermentation characteristics, and acute-phase proteins in calves. *Journal of Dairy Science* [Internet]. 2021;104(3):3632–45. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19003>
36. Huuki H, Ahvenjärvi S, Lidauer P, Popova M, Vilkki J, Vanhatalo A, et al. Fresh rumen liquid inoculant enhances the rumen microbial community establishment in pre-weaned dairy calves. *Frontiers in Microbiology* [Internet]. 2022;12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.758395>
37. Yuste S, Amanzougarene Z, De La Fuente G, De Vega A, Fondevila M. Rumen protozoal dynamics during the transition from milk/grass to high-concentrate based diet in beef calves as affected by the addition of tannins or medium-chain fatty acids. *Animal Feed Science and Technology* [Internet]. 2019;257:114273. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2019.114273>
38. Santos TAXD, Fernandes LMG, Carvalho PPX, Júnior VSM, Fonseca SA, Chaves AS, et al. Performance and microbiota of the digestive tract of Nellore calves supplemented with fungi isolated from bovine rumen. *Veterinary World* [Internet]. 2021;2686–93. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2021.2686-2693>
39. Cersosimo LM, Radloff W, Zanton GI. Microbial inoculum composition and pre-weaned dairy calf age alter the developing rumen microbial environment. *Frontiers in Microbiology* [Internet]. 2019;10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01651>
40. Hao Y, Guo C, Gong Y, Sun X, Wang W, Wang Y, et al. Rumen Fermentation, Digestive Enzyme Activity, and Bacteria Composition between Pre-Weaning and Post-Weaning Dairy Calves. *Animals* [Internet]. 2021;11(9):2527. <https://doi.org/10.3390/ani11092527>
41. Medina CEG, Gómez PL, De Jesús Maldonado Méndez J, Montañez-Valdez OD, Reyes-Gutiérrez JA, De Coss AL. Beneficial effects of a calf starter versus forage on rumen

development and bacteria populations in beef calves. *Ciencia Rural* [Internet]. 2021;51(5).
<https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20200562>

PRIEDAI

1 priedas. Paskelbtos tezės tarptautinėje mokslinėje konferencijoje

Monkevičienė, Ingrida; Šilinskas, Ignas; Sederevičius, Antanas; Bandžiulytė, Viktorija; **Petrutytė, Ieva**; Japertas, Sigitas; Želvytė, Rasa. Effect of a Diet Supplemented with *Aspergillus Oryzae* and Yeast on Ruminant Protozoa, pH and VFA Production // International Conference “Microbiota and Animal: Interaction, Health, Welfare and Production”, the conference dedicated to the 30th Anniversary of the Research Center of Digestive Physiology and Pathology of the Department of Anatomy and Physiology of LSMU Veterinary Academy : programme and abstracts : Kaunas, 29 September, 2022 / Lithuanian Academy of Sciences. Lithuanian University of Health Sciences. Veterinary Academy. Vilnius : Lithuanian Academy of Sciences, 2022. ISBN 9789986080893, p. 54-55, ISBN 9789986080893. Prieiga per internetą: <<https://hdl.handle.net/20.500.12512/115745>>. [T1d] [M.kr.: A002] [Indėlis: 0.143]