



Mgr Renata Miltko

**Zdolności chitynolityczne orzęsków *Eudiplodinium maggii*
i ich udział w przemianach chityny w żwaczu**

The chitinolytic ability of ciliates *Eudiplodinium maggii* and their
contribution to the metabolism of chitin in the rumen

Rozprawa doktorska

Doctoral thesis

Promotor:

Prof. dr hab. Tadeusz Michałowski
Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt
im. Jana Kielanowskiego PAN

Recenzenci:

Prof. dr hab. Kazimierz Kochman
Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt
im. Jana Kielanowskiego PAN

Prof. dr hab. Bronisław Cymborowski
Uniwersytet Warszawski
Wydział Biologii

IX. STRESZCZENIE

Zdolności chitynolityczne orzęsków *Eudiplodinium maggii* i ich udział w przemianach chityny w żwaczu

Orzęski są grupą drobnoustrojów, mającą znaczący udział w przemianach składników pokarmowych w żwaczu. Ich zdolności trawienia i wykorzystania wielocukrów strukturalnych i zapasowych dostarczanych w paszy były wielokrotnie przedmiotem badań. Natomiast, udział pierwotniaków w przemianach węglowodanów syntetyzowanych w żwaczu pozostaje ciągle niezbadany. Do wielocukrów strukturalnych, produkowanych w tej komorze żołądka przeżuwaczy, należy chityna i mureina. Wymienione węglowodany są składnikami ściany komórkowej grzybów i bakterii żwaczowych, odpowiednio. Z danych literaturowych wynika, że bakterie i grzyby są pobierane przez orzęski bytujące w żwaczu. Przyjmuje się, że bakterie są głównym źródłem białka dla pierwotniaków. Natomiast udział grzybów w zaspokajaniu wymagań pokarmowych orzęsków jest w rzeczywistości nieznan. Grzyby żwaczowe, a zwłaszcza ich wolno pływające, ruchliwe, zarodniki są potencjalnym źródłem białka i węglowodanów. Jednym z tych węglowodanów jest chityna. Jednak, dotychczasowa wiedza na temat możliwości jej wykorzystania przez orzęski ogranicza się do danych na temat ogólnej aktywności chitynolitycznej naturalnej fauny żwacza oraz dwóch gatunków pierwotniaków. Istnieją także dane o enzymach katalizujących rozkład chityny. Możliwości wykorzystania tego węglowodanu przez inne gatunki orzęsków oraz udział pierwotniaków w przemianach chityny w żwaczu nie były dotychczas badane. Wymienione zagadnienia stanowiły cel badań przedstawionych w niniejszej rozprawie. Ich obiektem badań były orzęski *Eudiplodinium maggii*, które należą do pospolitych przedstawicieli fauny żwaczowej. Pierwotniaki izolowano z płynu żwacza owiec i hodowano w warunkach *in vitro* lub wszczepiano do żwacza osobników, którym usunięto ich naturalną faunę orzęsków.

Przedmiotem badań były: 1) wpływ dodatku chityny i zoospor grzybów żwaczowych do podłoża hodowlanego na przeżywalność i liczebność populacji orzęsków *Eudiplodinium maggii* w warunkach *in vitro*; 2) zdolność trawienia chityny i zarodników grzybów żwaczowych przez orzęski oraz wykorzystanie uzyskanych produktów jako źródła węgla w przemianach dostarczających im energii; 3) identyfikacja i charakterystyka

enzymów katalizujących rozkład chityny w komórkach pierwotniaków; 4) wpływ badanych orzęsków na zawartość i produkcję chityny w żwaczu owiec; 5) udział pierwotniaków *Eudiplodinium maggii* w przemianach chityny w żwaczu.

Doświadczenia wykonane w warunkach *in vitro* wykazały, że przeżywalność pierwotniaków na podłożu złożonym z roztworu soli i chityny (0,12, 0,25 i 0,37 mg/ml/d) lub liofilizowanych zarodników grzybów (0,25 mg/ml/d) była krótsza niż 4 dni. Stwierdzono, również, że wielkość dawki chityny nie miała wpływu na przeżywalność pierwotniaków. Uzupełnienie podłoża liofilizowanym płynem żwacza (3,75 mg/ml/d) i glutenem pszennym (0,08 mg/ml/d) przedłużało przeżywalność pierwotniaków do 4 i 8 dni, odpowiednio. Podłoże złożone z roztworu soli, siana łąkowego (0,3 mg/ml/d) i glutenu pszennego (0,08 mg/ml/d) stwarzało warunki do utrzymywania się orzęsków przez co najmniej 28 dni. Dodatek chityny do tego podłoża stymulował rozwój populacji *Eudiplodinium maggii*. Stwierdzono, pozytywną korelację między dawką chityny a liczebnością populacji orzęsków. Wpływ dodatku liofilizowanych zarodników grzybów do takiego samego podłoża był mniej wyraźny a ich pozytywne oddziaływanie zaznaczyło się dopiero w ostatnich 8 dniach hodowli.

Wykazano, że podczas inkubacji pierwotniaków z chityną i z zoosporami grzybów żwaczowych wzrastało stężenie lotnych kwasów tłuszczowych, zaś tempo ich produkcji wynosiło 45 i 46,3 pM LKT/pierwotniaka/godzinę. Produkcja endogenna nie przekraczała 31 pM LKT/pierwotniaka/godzinę. Stwierdzono, że kwas octowy stanowił 72,0 i 77,7% ogółu produkowanych kwasów, kwas masłowy – 21,1 i 12,2 a kwas propionowy 6,9 i 11,0%, odpowiednio. Uzyskane wyniki dowodzą, że chityna i węglowodany obecne w zarodnikach grzybów były wykorzystywane w przemianach dostarczających pierwotniakom energii.

Do badań zdolności chitynolitycznych pierwotniaków użyto surowego preparatu enzymatycznego orzęsków *Eudiplodinium maggii*. Stwierdzono, że ogólna aktywność chitynolityczna wynosiła około 0,035 μ M uwolnionej N-acetyloglukozaminy/mg białka /min. Optymalne warunki rozkładu koloidalnej chityny stwierdzono przy pH 4,5 i temperaturze - 50⁰C. Wykazano, że surowy preparat enzymatyczny umożliwia całkowity rozkład chityny a końcowymi produktami reakcji były: N-acetyloglukozamina, chitobioza i chitotrioza. Badania zymograficzne wykazały, że w surowym preparacie enzymatycznym orzęsków *Eudiplodinium maggii* były obecne enzymy o właściwościach: endochitynazy, egzochitynazy i chitobiazы. Stwierdzono po dwa enzymy z każdej grupy.

Swoistymi substratami do określenia aktywności poszczególnych grup enzymów były: karboksymetylochityna, p-nitrofenylo-N-acetyloglukozamina oraz p-nitrofenylo-N,N-diacetylochitobioza. Najszybszy rozkład pierwszego z nich stwierdzono przy pH 5,5 i temperaturze 50°C. Natomiast, optymalne warunki do rozkładu dwóch pozostałych to pH 4,5 oraz temperatura 55 i 45°C, odpowiednio. Szybkość rozkładu CM-chityny, oraz nitrofenylowych pochodnych chitobiozy i chitotriozy wynosiła 0,028, 0,067 i 0,033 µM uwolnionego produktu/mg białka/min, odpowiednio. Przedstawione dane wskazują, że najmniejszą aktywność wykazywały enzymy o właściwościach endochitynazy a największą - chitobiozy.

Rozdział białka pierwotniaczego na złożu Sephadex G-150 wykazał, że enzymy chitynolityczne o właściwościach endochitynazy i chitobiozy wypływały z kolumny w tych samych frakcjach to jest: 16-25, natomiast enzymy o cechach egzochitynazy lokowały się we frakcjach 19-25. Stwierdzono, że w uzyskanych frakcjach były obecne pojedyncze enzymy z każdej grupy. Stwierdzono, że masa cząsteczkowa endochitynazy, chitobiozy i egzochitynazy wynosiła około 62, 51 i 41 kDa, odpowiednio. Wykazano, że rozdział surowego preparatu enzymatycznego metodą sączenia molekularnego umożliwił częściowe oczyszczenie badanych enzymów.

Badania w warunkach *in vivo* wykonano używając trzech owiec zaopatrzonych w trwałe przetoki żwacza. Badania podzielono na dwa okresy, to jest: kontrolny i doświadczalny. W okresie kontrolnym owce nie posiadały żadnych orzęsków w żwaczu. Faunę żwaczową owiec w okresie doświadczalnym tworzyły orzęski *Eudiplodinium maggii*, które wszczepiono tym samym zwierzętom po zakończeniu doświadczeń kontrolnych.

Wykonane doświadczenia wykazały, że liczebność rozwiniętej populacji orzęsków *Eudiplodinium maggii* wynosiła 14,2 - 20,3 x 10³/ml. Liczebność zarodników grzybów w okresie kontrolnym mieściła się w zakresie 9,2 - 10,3 x 10⁵/ml a w doświadczalnym - 10,0 - 12,2 x 10⁵/ml. Oznaczenia wykonano metodą q-PCR. Istotnie statystycznie różnice między liczebnością zarodników w okresie kontrolnym i doświadczalnym wystąpiły 4 i 8 godzin po karmieniu. Aktywność chitynolityczna płynu żwacza owiec w okresie kontrolnym i doświadczalnym wynosiła 2,4 - 3,4 i 3,1 - 3,9 µM N-acetyloglukozoaminy/g s.m. płynu/min, odpowiednio (p<0,05). Stwierdzono, że aktywność chitynolityczna pierwotniaków stanowiła tylko około 7,7 - 13,9% ogólnej aktywności chitynolitycznej płynu żwacza.

Na podstawie wykonanych badań stwierdzono, że w okresie kontrolnym zawartość chityny w płynie żwacza owiec wynosiła 6,1 - 6,8 a w doświadczalnym - 6,7 - 8,1 mg/g s.m. płynu żwacza ($p < 0,05$). Najmniej chityny stwierdzono przed karmieniem owiec, a najwięcej 4 godziny po podaniu paszy zwierzętom. Wykazano również, że chityna obecna w zarodnikach grzybów stanowiła 81 - 99% ogólnej ilości tego węglowodanu w płynie żwacza i wykazywała wahania zbieżne z wahaniami liczby zoospor. Stwierdzono, że sucha masa pojedynczego zarodnika wynosiła 2,1 ng a zawartość chityny w jego komórce - 0,23 ng, to jest około 11% suchej masy.

Wykazano, że całkowita zawartość chityny w płynie żwacza owiec w okresie kontrolnym i doświadczalnym wynosiła 2,1 i 3,1 g, odpowiednio ($p < 0,05$). Natomiast produkcja tego węglowodanu netto - 2,3 i 3,1 g/12 godz, odpowiednio ($p < 0,05$). Całkowita ilość chityny, z której mogły korzystać orzęski w ciągu 12 godzin wynosiła 6,2 g.

Stwierdzono, że zawartość chityny w pierwotniakach izolowanych ze żwacza przed karmieniem owiec wynosiła 1,1 mg/g suchej masy orzęsków i zwiększyła się o 36% w ciągu 4 godzin po podaniu paszy. Zmniejszenie się jej zawartości o 13% stwierdzono w ciągu następnych 4 godzin. To sugerowało, że intensywność trawienia chityny wynosiła około 3% na godzinę. Obliczono, że sucha masa pierwotniaka wynosiła 196,5 ng a zawartość chityny około 0,27 ng. Uzyskane wyniki pozwoliły oszacować, że zawartość tego węglowodanu we wszystkich komórkach orzęsków wynosiła około 54 mg i stanowiła 1,7% chityny w płynie żwacza owiec.

Podsumowanie: Wykonane badania wykazały, że pierwotniaki *Eudiplodinium maggii* są zdolne do trawienia i wykorzystania chityny syntetyzowanej w żwaczu. Jednak ten węglowodan wydaje się pełnić rolę jedynie uzupełniającego źródła węgla w przemianach energetycznych badanego gatunku orzęsków.