



**Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego
Polskiej Akademii Nauk**

Dr Renata Miltko

**Rola orzęsków zwaczowych w przemianach
węglowodanów ze szczególnym uwzględnieniem chityny.
Badania *in vitro* i *in vivo*.**

AUTOREFERAT

Jabłonna, 2017

1. Imię i Nazwisko: Renata Miltko

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

- **Magister chemii** – 12 czerwiec 2001 - Wydział Chemii, Uniwersytet Warszawski; Pracę magisterską pt. „*Entalpia mieszania układów binarnych typu n-alken + n-alkohol*” wykonywano pod kierunkiem prof. dr hab. Teresy Kasprzyckiej-Guttman w Zakładzie Technologii Chemicznej.
- **Doktor nauk rolniczych** w zakresie zootechniki – 29 czerwiec 2011 – Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego Polskiej Akademii Nauk; Pracę doktorską pt. „*Zdolności chitynolityczne orzęsków Eudiplodinium maggii i ich udział w przemianach chityny w żwaczu*” wykonywano pod kierunkiem prof. dr hab. Tadeusza Michałowskiego w Zakładzie Fizjologii Żywienia Zwierząt Przeżuwających.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.

Okres zatrudnienia	Stanowisko i miejsce zatrudnienia
07.2011 do chwili obecnej	Adiunkt Instytutu Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego Polskiej Akademii Nauk; Zakład Żywienia Zwierząt
04.2004 – 06.2011	Asystent Instytutu Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego Polskiej Akademii Nauk; Zakład Fizjologii Żywienia Zwierząt Przeżuwających
2002 – 2005	Pracownik kontraktowy - wykonawca polskiej części projektu badawczego pt. „Ciliates as monitors of the environmental safety of GMO (acronym CIMES)” V programu ramowego Unii Europejskiej; Numer kontraktu: QLK3-CT-2002-02151
2002 – 2003	Pracownik kontraktowy - wykonawca polskiej części projektu badawczego pt. „European rumen ciliate culture collection (acronym ERCULE)” V programu ramowego Unii Europejskiej; Numer kontraktu: QLRI-CT-2000-01-01455

4. Wskazanie osiągnięcia* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.):

a) tytuł osiągnięcia naukowego: „Rola orzęsków żwaczowych w przemianach węglowodanów ze szczególnym uwzględnieniem chityny. Badania *in vitro* i *in vivo*.”

b) wykaz publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego:

- [1] **Miltko R.**, Bełżecki G., Kowalik B., Skomiał J. 2016. Presence of carbohydrate-digesting enzymes throughout the digestive tract of sheep. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 40: 271–277; **(15 pkt MNiSW 2016; IF₂₀₁₅=0,352)**.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: sformułowaniu koncepcji badań; zaplanowaniu i organizacji doświadczenia; współwykonaniu pomiarów morfometrycznych przewodu pokarmowego owiec; oznaczeniu szybkości rozkładu węglowodanów strukturalnych treści pokarmowej; ilościowych i jakościowych oznaczeniach mikrofauny żwaczowej; opracowaniu zebranych danych doświadczalnych; przeglądzie literatury oraz przygotowaniu publikacji do druku. Mój udział procentowy szacuję na 70%.

- [2] **Miltko R.**, Kowalik B., Michałowski T., Bełżecki G. 2015. Chitin as a source of energy for the rumen ciliates. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 24: 203–207; **(20 pkt MNiSW 2015; IF₂₀₁₅=0,511)**.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: sformułowaniu koncepcji badań; prowadzeniu zachowawczych selektywnych hodowli pierwotniaków w warunkach *in vitro*; zaplanowaniu i organizacji doświadczeń hodowlanych polegających na określeniu wpływu dodatku chityny na stan populacji orzęsków *D. affine* oraz *E. caudatum* w warunkach hodowli *in vitro*; wykonaniu doświadczeń polegających na porównaniu wychwytu chityny przez badane gatunki pierwotniaków; wykonaniu doświadczeń mających na celu określenie szybkości fermentacji chityny przez badane gatunki orzęsków; opracowaniu wyników doświadczalnych; przeglądzie literatury, a także przygotowaniu publikacji do druku. Mój udział procentowy szacuję na 70%.

- [3] **Miltko R.**, Bełżecki G., Herman A., Kowalik B., Skomiał J. 2016. The effect of rumen ciliates on chitinolytic activity, chitin content and the number of fungal zoospores in the rumen fluid of sheep. *Archives of Animal Nutrition*, 6: 425-440; **(30 pkt MNiSW 2016; IF₂₀₁₅= 1,319)**.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: sformułowaniu koncepcji badań; zaplanowaniu i wykonaniu doświadczeń na zwierzętach; izolacji i hodowli orzęsków i grzybów w warunkach *in vitro*; oznaczeniach aktywności chitynolitycznej i zawartości chityny w płynie żwacza; oznaczeniach ilościowych mieszanej populacji orzęsków żwaczowych (metoda mikroskopowa) i zoospor grzybów (Real-Time PCR); opracowaniu zabranych danych doświadczalnych, oraz dokonaniu ich analizy statystycznej, a ponadto przeglądzie literatury i przygotowaniu publikacji do druku. Mój udział procentowy szacuję na 60%.

- [4] **Miltko R.**, Kowalik B., Majewska M.P., Bełżecki G., Skomiał J. 2015. The influence of supplementing heifers diet with yeast *Saccharomyces cerevisiae* on the activity of polysaccharidases in the rumen. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 24: 260–264; **(20 pkt MNiSW 2015; IF₂₀₁₅=0,511)**.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: sformułowaniu koncepcji badań; zaplanowaniu i nadzorowaniu doświadczeń na zwierzętach; oznaczeniach aktywności

hydrolitycznej treści żwacza w różnym czasie po karmieniu, a ponadto opracowaniu przeglądu literatury i przygotowaniu publikacji do druku. Mój udział procentowy szacuję na 60%.

* Oświadczenia współautorów o udziale własnym w przygotowaniu prac stanowiących szczególne osiągnięcia naukowe w Załączniku 6.

c) omówienie celu naukowego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Mikroorganizmy zasiedlające żwacz należą do czterech grup taksonomicznych to jest: bakterii, archeonów, grzybów i pierwotniaków. Drobnoustroje te nie tylko aktywnie uczestniczą w przemianach wszystkich składników pokarmowych [Hungate, 1966; Chesson i Fosberg, 1997], ale również dzięki procesom zachodzącym w ich komórkach (np. synteza białka mikroorganizmów, wbudowywanie nienasyconych kwasów tłuszczowych), stanowią znaczące źródło składników pokarmowych dla przeżuwaczy [Demeyer i Doreau, 1999]. Ich liczebność, proporcje oraz zachodzące między nimi interakcje, są czynnikami decydującymi o pokryciu potrzeb bytowych zwierząt oraz o uzyskaniu odpowiedniej ilości i jakości produktów pochodzenia zwierzęcego [DeVries i wsp., 2009; Roche i wsp., 2009].

Pierwotniaki pod względem liczebności oraz zawartości biomasy są drugą po bakteriach grupą drobnoustrojów bytujących w żwaczu. Najliczniejsze, spośród nich są orzęski, które należą do dwóch rzędów, to jest *Entodiniomorpha* i *Vestibulopherida*, odgrywających znaczącą rolę w funkcjonowaniu żwacza. Ich zdolności trawienia i wykorzystania węglowodanów rozpuszczalnych, a także wielocukrów strukturalnych i zapasowych dostarczanych w paszy były przedmiotem licznych badań. Natomiast, udział pierwotniaków w przemianach węglowodanów syntetyzowanych w żwaczu pozostaje wciąż mało poznany. Do wielocukrów strukturalnych, pochodzenia mikrobiologicznego, należy chityna i mureina. Wymienione węglowodany są składnikami ściany komórkowej odpowiednio grzybów i bakterii żwaczowych. Dostępne w literaturze dane oraz wyniki wcześniejszych badań własnych sugerują, że bakterie i grzyby są pobierane przez orzęski bytujące w żwaczu [Newbold i Hilman, 1990; Bełżecki i wsp., 2013; Miltko i wsp., 2014]. Przyjmuje się, że bakterie są głównym źródłem białka dla pierwotniaków [Williams i Coleman, 1997]. Natomiast udział grzybów żwaczowych w zaspokajaniu potrzeb pokarmowych orzęsków jest poznany jedynie w niewielkim stopniu. Orpin [1989] podaje, że biomasa grzybów należących do rodziny *Neocallimastigaceae* może stanowić około 8% biomasy wszystkich drobnoustrojów w żwaczu. Grzyby te, a zwłaszcza ich ruchliwe zarodniki, z uwagi na dogodne rozmiary komórek mogą być, potencjalnym źródłem białka i węglowodanów dla orzęsków. Jednym z tych węglowodanów jest chityna, będąca liniowym polisacharydem, złożonym z reszt N-acetyloglukozaminy połączonych wiązaniami 1,4-β-glikozydowymi. Struktura chemiczna chityny jest zbliżona do celulozy.

Dotychczasowe badania wykonane w warunkach *in vivo* nie pozwalają na jednoznaczną ocenę wpływu pierwotniaków na stan populacji grzybów w żwaczu. Niektórzy badacze podają, że rozwojowi mikrofauny żwacza towarzyszy zmniejszenie gęstości populacji zoospor grzybów [Orpin, 1977; Romulo i wsp., 1986], które może wynikać z intensywnego pobierania zarodników przez te mikroorganizmy [Newbold i Hilman, 1990]. Inni z kolei nie

zaobserwowali istotnego wpływu orzęsków na liczbę zoospor w płynie żwacza [Ushida i wsp., 1989]. Przeciwnie wyniki uzyskali Williams i Withers [1993], którzy wykazali, że rozwój mikrofauny w żwaczu zdefaunowanych owiec spowodował wzrost liczebności zoospor grzybów. Potwierdzenie stymulującego wpływu orzęsków na populację grzybów żwaczowych wykazano również w toku badań własnych, które dotyczyły określenia zdolności chitynolitycznych orzęsków *Eudiplodinium maggii* i ich udziału w przemianach chityny w żwaczu. W toku badań stwierdzono, że *E. maggii* dysponuje kompletem enzymów umożliwiających rozkład chityny, jednocześnie wykazano, że pełni on drugorzędną rolę w przemianach tego węglowodanu w żwaczu [Miltko i wsp., 2012; 2014].

Przedstawione powyżej informacje wskazują na potrzebę dalszych badań w tej dziedzinie, ale jednocześnie pozwalają na sformułowanie hipotezy badawczej, zgodnie z którą pierwotniaki uczestniczą w przemianach zarówno węglowodanów dostarczanych w paszy jak i pochodzenia mikrobiologicznego. Hipotezę tę, postanowiono sprawdzić w odniesieniu do pierwotniaków *Entodinium caudatum* i *Diploplastron affine* należących do powszechnie występujących przedstawicieli fauny żwaczowej. Omawiane badania wykonano w kilku etapach, które obejmują doświadczenia w warunkach *in vitro* i *in vivo*. Należy jednak zaznaczyć, że prowadzenie selektywnych hodowli orzęsków żwaczowych wymaga dużej wiedzy i doświadczenia z zakresu postępowania z mikroorganizmami w warunkach beztlenowych. Ponadto, badania te są bardzo czasochłonne i nastroczają wielu trudności, wynikających m.in z ograniczeń w możliwości wyizolowania czystych komórek pierwotniaków. W związku z powyższym są one prowadzone jedynie w nielicznych ośrodkach badawczych na świecie. Należy do nich nasz zespół, który rozpoczął je pod kierunkiem prof. T. Michałowskiego, a obecnie ze względu na posiadane metody identyfikacji, izolacji i hodowli nadal je kontynuuje i rozwija. Unikatowe wyniki uzyskane w toku tych badań stanowią cenną informację trudną jednak do zweryfikowania w literaturze światowej.

Etap I – Badania pilotażowe

Miltko R., Bełżecki G., Kowalik B., Skomial J. 2016. Presence of carbohydrate-digesting enzymes throughout the digestive tract of sheep. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences. 40: 271–277.

Głównym kierunkiem użytkowania owcy jest produkcja mięsa – jagnięciny, mniejszym mleka i marginalnym wełny i skór. Ze względu na preferencje pokarmowe, należy ona do przeżuwaczy roślinożernych preferujących pokarm bogaty w celulozę "grass/roughage eaters" [Hoffman, 1989]. Budowa przewodu pokarmowego w dużej mierze zależy od rodzaju pobieranego pokarmu. Zwierzęta przeżuwające wykształciły szereg przystosowań do pokarmu o małej wartości odżywczej. Najważniejszym z nich jest obecność czterokomorowego żołądka. Trawienie pokarmu w trzech pierwszych komorach to jest w żwaczu, czepcu i księgach odbywa się wyłącznie dzięki enzymom syntetyzowanym przez mikroorganizmy symbiotyczne. W pozostałych odcinkach przewodu pokarmowego w trawieniu biorą udział enzymy własne zwierzęcia oraz enzymy pochodzenia mikrobiologicznego. Większość informacji dostępnych w literaturze koncentruje się wokół zagadnień związanych z procesami trawienia zachodzącymi w żwaczu, a niewiele z nich opisuje trawienie w innych częściach przewodu pokarmowego

przeżuwaczy. Celem podjętych badań była charakterystyka rozkładu węglowodanów w całym przewodzie pokarmowym dorosłych owiec. Badania te wykonano w początkowej fazie prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego.

Doświadczenie wykonano na sześciu owcach rasy merynos polski o średniej masie ciała 55,3 kg. Zwierzęta karmiono dawką zawierającą 85,2% siana łąkowego, 13,7% śruty jęczmiennej oraz 1,1% mieszanki mineralno-witaminowej.

Pomiary morfometryczne wykazały, że całkowita masa przewodu pokarmowego stanowiła około 32% masy ciała owiec, natomiast udział wielokomorowego żołądka w masie zwierząt wynosił do 25%. Największą częścią żołądka był żwacz, który stanowił około 75% jego masy. Pomiary morfometryczne wykazały również, że najdłuższym odcinkiem było jelito cienkie, które stanowiło około 80% całkowitej długości jelit. W celu dokonania charakterystyki treści poszczególnych odcinków przewodu pokarmowego oznaczono pH, potencjał redoks, oraz zawartość suchej masy. Wyniki pomiarów wykazały, najmniejszą wartość pH w trawieńcu, co było spowodowane wydzielaniem kwasu solnego przez gruczoły żołądkowe, a największą w jelicie cienkim, co najprawdopodobniej było związane z wydzielaniem silnie alkalicznego soku trzustkowego. Ponadto, stwierdzono, że potencjał redoks przedżołądków, jelita ślepego i jelita grubego był niższy niż w księgach i jelicie cienkim. Stwierdzone różnice prawdopodobnie zależały od składu tlenowych i beztlenowych mikroorganizmów. Aktywność beztlenowych bakterii jest większa, kiedy potencjał redoks zmienia się w zakresie od 50 do -400 mV, zaś tlenowych od 400 do -200 mV [Baldwin i Emery, 1960]. Najwyższą zawartość suchej masy stwierdzono w księgach, co było prawdopodobnie spowodowane wchłanianiem wody w tym przedżołądku [Afzalzadeh i de. B Hovell, 2002].

Wyniki oznaczeń ilościowych orzęsków żwaczowych wykazały, że średnia gęstość populacji tych mikroorganizmów, wahała się od $37,2 \times 10^4$ do $54,0 \times 10^4$ komórek/ ml płynu żwacza. Zidentyfikowane orzęski należały do rodziny *Ophryoscolecidae* i rodzajów: *Entodinium*, *Diplodinium* i *Ophryoscolex* oraz do rodziny *Isotrichidae* i rodzajów: *Isotricha* i *Dasytricha*. Wykazano, że najliczniejsze wśród orzęsków były *Entodinia*, które stanowiły około 88,0% całkowitej liczebności pierwotniaków w żwaczu.

Wyniki badań enzymatycznych wykazały, że wszystkie badane węglowodany były trawione w całym przewodzie pokarmowym owiec. Stwierdzono, że ksylan, celuloza, pektyna i inulina były najefektywniej trawione w czepcu, co mogło być związane z większą ilością małych cząstek obecnych w tej komorze i w efekcie większą powierzchnią mikrobiologicznego ataku [Akin, 1976]. Skrobia w odróżnieniu od pozostałych roślinnych węglowodanów była najszybciej trawiona w jelicie cienkim wynikało to najprawdopodobniej z wydzielania α -amylazy trzustkowej. W jelicie cienkim stwierdzono również największą aktywność chitynolityczną (wyrażoną, jako ilość uwolnionej N-acetyloglukozaminy/ g SM treści pokarmowej na minutę), co mogło być związane ze stosunkowo dużą koncentracją tego grzybowego węglowodanu w tej części przewodu pokarmowego [Rezaeian i wsp., 2004]. Ponadto, wykazano że wśród badanych węglowodanów najszybciej rozkładana była skrobia, a najwolniej - chityna. Uzyskane wyniki potwierdzają opinię, że żwacz jest głównym miejscem trawienia u przeżuwaczy. Aktywność hydrolityczna tego segmentu stanowiła 75% całkowitej aktywności treści przewodu pokarmowego.

Uzyskane wyniki wykazały, że trawienie węglowodanów strukturalnych i zapasowych odbywa się we wszystkich odcinkach przewodu pokarmowego owiec. Szczególnym osiągnięciem jest wykazanie największej szybkości trawienia chityny w jelicie cienkim, przy jednoczesnym stwierdzeniu największego rozkładu tego węglowodanu w żwaczu.

Etap II - Badania *in vitro* – określenie zdolności orzęsków *E. caudatum* i *D. affine* do trawienia i wykorzystania chityny

Milko R., Kowalik B., Michałowski T., Bełżecki G. 2015. Chitin as a source of energy for the rumen ciliates. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 24: 203–207.

Pierwotniaki występujące w żwaczu należą do dwóch rzędów, to jest *Entodiniomorpha* i *Vestibulophorida*. Najliczniejsze spośród *Entodiniomorpha* są gatunki z rodziny *Ophryoscolecidae*, których liczba u bydła, owiec i kóz karmionych paszą treściwą może przekraczać 10^6 osobników/ g treści pokarmowej [Jouany, 1989; Jouany i Ushida, 1990].

Pierwotniaki aktywnie uczestniczą w trawieniu i przemianach wszystkich składników pokarmowych w tym węglowodanów strukturalnych i zapasowych obecnych w żwaczu [Williams i Coleman, 1992]. Polisacharydy te, można podzielić na dostarczane z paszą i pochodzenia mikrobiologicznego. Węglowodanem strukturalnym syntetyzowanym w żwaczu jest chityna, będąca liniowym polisacharydem złożonym z reszt N-acetyloglukozaminy połączonych wiązaniami 1,4- β -glikozydowymi. Chityna jest drugim po celulozie, najbardziej rozpowszechnionym, naturalnym biopolimerem. Jednak, piśmiennictwo dotyczące trawienia tego węglowodanu w żwaczu jest bardzo ubogie. Celem podjętych badań było, określenie zdolności badanych gatunków orzęsków do trawienia i wykorzystania chityny.

Do badań wybrano pierwotniaki pospolicie występujące w żwaczu o skrajnie odmiennych preferencjach pokarmowych to jest: skrobiolubne - *Entodinium caudatum* oraz należące do grupy pierwotniaków o właściwościach fibrolitycznych - *Diploplastron affine*. Przeprowadzone badania obejmowały długookresowe doświadczenia hodowlane oraz 12 lub 24 godzinne inkubacje.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że podłoże złożone z roztworu soli "caudatum", siana łąkowego, glutenu pszennego i mączki jęczmiennej (*E. caudatum*) lub mikrokrystalicznej celulozy (*D. affine*) stwarzało warunki niezbędne do utrzymywania się orzęsków przez okres, co najmniej 28 dni. Dodatek chityny do tego podłoża stymulował rozwój populacji obu badanych gatunków. Ponadto, odnotowano, pozytywną korelację między stosowaną dawką chityny, a liczebnością populacji orzęsków. Należy jednak zaznaczyć, że wzrost koncentracji pierwotniaków był większy w przypadku orzęsków *D. affine*.

Zdolność pobierania chityny przez badane gatunki orzęsków określono podczas 24 godzinnych inkubacji. Kultury doświadczalne stanowiły pierwotniaki, karmione chityną, natomiast kultury kontrolne były głodzone. Stwierdzono, że bezpośrednio przed podaniem chityny część osobników *D. affine* (13,3%) i *E. caudatum* (15,3%) zawierała niestrawione cząstki pokarmu. Ilość tych komórek wzrosła w obu przypadkach w ciągu pierwszych 2 godzin po karmieniu, po czym obserwowano jej zmniejszenie. Uzyskane wyniki mogą

świadczyć o tym, że pobrana chityna podlegała trawieniu w komórkach orzęsków. Ponadto, stwierdzono, że ilość osobników zawierających ten węglowodan była większa w przypadku *D. affine* niż *E. caudatum*.

W celu potwierdzenia zdolności badanych orzęsków do wykorzystania chityny, jako źródła węgla wykonano 12 godzinne inkubacje pierwotniaków z chityną w obecności antybiotyków. Kontrolę stanowiły orzęski, głodzone. Wykonane oznaczenia wykazały, że stężenie lotnych kwasów tłuszczowych (LKT) wzrastało wraz z upływem czasu zarówno w przypadku kultur kontrolnych jak i doświadczalnych. Jednak, obserwowany przyrost był istotnie większy w przypadku kultur inkubowanych z chityną niż w przypadku kultur głodzonych. Z przedstawionych danych wynika również, że chityna była najintensywniej metabolizowana w ciągu pierwszych 8 godzin. Ponadto, na podstawie zmian stężenia LKT i liczby pierwotniaków obliczono średnie tempo produkcji LKT w przeliczeniu na komórkę orzęska. Wykazano, że było one prawie 8 krotnie większe w przypadku orzęsków *D. affine* w porównaniu z *E. caudatum*. W trakcie doświadczeń fermentacyjnych stwierdzono również, że głównymi produktami fermentacji chityny był kwas octowy, następnie masłowy a najmniejszą część ogólnej produkcji stanowił kwas propionowy. Uzyskane wyniki dowodzą, że chityna była wykorzystywana w przemianach dostarczających pierwotniakom energii.

Zdolności chitynolityczne *D. affine* i *E. caudatum* określano na podstawie wyników inkubacji koloidalnej chityny z surowym preparatem enzymatycznym orzęsków. Stwierdzono, że szybkość rozkładu chityny zależała od środowiska reakcji. Optymalne warunki dla obu badanych gatunków pierwotniaków wynosiły pH 5,0 i temperatura 45°C. Ponadto wykazano, że szybkość rozkładu chityny była prawie 1,5 raza mniejsza w przypadku surowego preparatu enzymatycznego orzęsków *D. affine* w porównaniu z preparatem *E. caudatum*.

Wykonane doświadczenia wykazały, że oba badane gatunki orzęsków są zdolne do trawienia i wykorzystania chityny. Na podstawie pomiarów lotnych kwasów tłuszczowych wykazano, że orzęski *D. affine* w większym stopniu uczestniczą w rozkładzie tego węglowodanu niż *E. caudatum*. Nie potwierdzają jednak tej zależności oznaczenia szybkość trawienia chityny przez surowy preparat enzymatyczny orzęsków.

Etap III – Badania *in vivo* - określenie wpływu orzęsków żwaczowych na aktywność chitynolityczną, zawartość chityny oraz na populację zoospor grzybów w płynie żwacza owiec

Miltko R., Bełżecki G., Herman A., Kowalik B., Skomial J. 2016. The effect of rumen ciliates on chitinolytic activity, chitin content and the number of fungal zoospores in the rumen fluid of sheep. Archives of Animal Nutrition, 6: 425-440.

Fizjologiczne, enzymatyczne i metaboliczne właściwości beztlenowych bakterii, grzybów i pierwotniaków wskazują, że mikroorganizmy te odgrywają istotną rolę w trawieniu węglowodanów strukturalnych i zapasowych w żwaczu. Utrzymanie stabilnego konsorcjum mikroorganizmów zależy od rodzaju diety, poziomu i częstotliwości podawania paszy zwierzętom, a także interakcji pomiędzy mikroorganizmami [Wolin i wsp., 1997]. Interakcje, te mogą być zarówno pozytywne jak i negatywne występujące wewnątrz i pomiędzy różnymi rodzajami drobnoustrojów [Dehority, 2003].

Współzależność pierwotniaki-grzyby była przedmiotem licznych badań opisanych w literaturze. Inspiracją do rozszerzenia tematyki z tego zakresu były wyniki badań własnych [Miltko i wsp., 2012; 2014] oraz opublikowane prace innych autorów [Orpin, 1977; Romulo i wsp., 1986; Ushida i wsp., 1989; Newbold i Hilman, 1990; Williams i Withers, 1993]. Należy podkreślić, że powyższe badania nie pozwalają na jednoznaczną ocenę wpływu pierwotniaków na stan populacji grzybów w żwaczu. Rozbieżne wyniki, a także znaczący udział tych mikroorganizmów w trawieniu włókna w żwaczu, sprawiło, że celem podjętych badań było określenie wpływu pospolitych gatunków orzęsków *E. caudatum* i *D. affine* na szybkość trawienia i stężenie chityny oraz na liczebność zoospor grzybów w płynie żwacza owiec.

Doświadczenie wykonano na trzech dorosłych owcach rasy merynos polski o średniej masie ciała wynoszącej 50,0-56,2 kg zaopatrzonych w przetoki do żwacza. Zwierzęta karmiono dawką zawierającą 83,9% siana łąkowego, 13,8% śruty jęczmiennej oraz 2,3% mieszanki mineralno-witaminowej. Doświadczenie było podzielone na cztery okresy. W pierwszym (kontrolnym) owce pozbawiono pierwotniaków (defaunacja), a następnie w kolejnych monofaunowano je *E. caudatum* oraz *D. affine*, po czym refaunowano naturalną mieszaną fauną żwacza. Materiał badawczy stanowiła treść oraz płyn żwacza, który pobierano tuż przed porannym karmieniem oraz 4, 8 i 12 godzin po podaniu owcom paszy.

W wyniku przeprowadzonych oznaczeń ilościowych, określono średnią gęstość populacji pierwotniaków, która wahała się od $6,1 \times 10^4$ (*D. affine*) do $42,2 \times 10^4$ komórek/ ml płynu żwacza (naturalna mieszana fauna żwacza). Stwierdzono, że koncentracja mieszanej populacji orzęsków była blisko 1,5 raza większa niż *E. caudatum* i około 7 razy większa w porównaniu z liczebnością *D. affine*. Ponadto, odnotowano ten sam cykl dobowych zmian liczebności orzęsków niezależny od gatunku pierwotniaka. Największą gęstość populacji stwierdzono przed porannym i wieczornym karmieniem owiec, a najmniejszą w 4 godziny po karmieniu. Zmniejszenie stężenia pierwotniaków po podaniu paszy mogło być związane z rozcieńczeniem wodą i/ lub paszą, a także przepływem treści żwacza [Ankrah i wsp., 1990], podczas gdy wzrost liczebności stwierdzony przed karmieniem był prawdopodobnie związany z podziałem komórek orzęsków [Michałowski, 1990].

Wszczepienie pierwotniaków do żwacza zdefaunowanych owiec spowodowało wzrost wszystkich badanych parametrów. Wyniki oznaczeń enzymatycznych wykazały statystycznie istotny wzrost szybkości rozkładu chityny niezależny od gatunku orzęska. Obserwowany wzrost aktywności chitynolitycznej stwierdzony w 4 godziny po podaniu paszy mógł być spowodowany rozwojem populacji bakterii chitynolitycznych [Simunek i wsp., 2001] oraz populacji zarodników grzybów [Warner, 1966; Orpin, 1974; Edwards i wsp., 2008; Miltko i wsp., 2014]. Liczebność populacji zarodników grzybów w płynie żwacza określano na podstawie liczby kopii genów kodujących 18S rRNA tych mikroorganizmów. Uzyskane wyniki wykazały, że we wszystkich badanych okresach eksperymentalnych obecność pierwotniaków w żwaczu spowodowała wzrost liczebności zarodników grzybów, a tym samym zwiększenie zawartości chityny w porównaniu do owiec pozbawionych orzęsków. Stwierdzono, że chityna zoospor stanowiła 75,8-94,7% całkowitej zawartości tego polisacharydu w płynie żwacza owiec i że wykazuje ona wahania zbieżne z wahaniami liczby zoospor. Ponadto, stwierdzono, że zawartość chityny oznaczonej wewnątrz komórek orzęsków wynosiła w przypadku *E. caudatum* i *D. affine* odpowiednio 3,3% i 4,8% całkowitej zawartości tego polisacharydu w

plynie żwacza. Wykazano również, że ilość chityny stwierdzona w pojedynczej komórce *D. affine* odpowiada koncentracji tego polisacharydu w jednej zoosporze, podczas gdy jej stężenie w przeliczeniu na komórkę *E. caudatum* było 8-krotnie mniejsze. Warto podkreślić, że oznaczenia te były możliwe dzięki wcześniejszym badaniom własnym, w których określono zawartość chityny w pojedynczym zarodniku oraz, że informacja ta była pierwszą na świecie [Miltko i wsp., 2014]. Ponadto, odnotowano ten sam cykl dobowych zmian zawartości chityny w komórkach obu badanych gatunków, zgodnie, z którym największą koncentrację chityny stwierdzono w 4 godziny po porannym karmieniu, a następnie obserwowano stały spadek. Zmniejszenie ilości chityny może świadczyć o tym, że była ona trawiona wewnątrz komórek orzęsków. Oznaczona szybkość rozkładu chityny, była niezależna od gatunku orzęsków i wynosiła 7,2% na godzinę.

Przedstawione powyżej wyniki badań wykazały, że wszczepienie pierwotniaków do żwacza defaunowanych owiec stymuluje rozwój populacji grzybów (tworzenie się nowych zarodni i powstawanie zwiększonej liczby zarodników) oraz wpływa na wzrost zawartości i szybkość degradacji chityny. Jednocześnie wykazały one, że węglowodan ten wydaje się pełnić rolę jedynie uzupełniającego źródła węgla w przemianach energetycznych badanych gatunków orzęsków.

Etap IV – Wpływ zastosowania preparatu drożdżowego, jako naturalnego źródła chityny na procesy trawienne zachodzące w żwaczu

*Miltko R., Kowalik B., Majewska M.P., Bełżecki G., Skomial J. 2015. The influence of supplementing heifers diet with yeast *Saccharomyces cerevisiae* on the activity of polysaccharidases in the rumen. Journal of Animal and Feed Sciences, 24: 260–264.*

Wysokoprodukcyjne zwierzęta przeżuwające, szczególnie krowy wysokomleczne wymagają intensywnego żywienia dawkami pokarmowymi, z dużym udziałem pasz treściwych. Długotrwałe stosowanie tego typu pasz może prowadzić do zaburzeń procesów trawiennych, destabilizacji ekosystemu żwacza, a w konsekwencji do problemów zdrowotnych, zmniejszenia wydajności i pogorszenia składu mleka. Aby temu zapobiec do dawek pokarmowych dodawane są różne dodatki paszowe, które mogą w znacznym stopniu modyfikować skład mikroorganizmów żwaczowych, a tym samym wpływać na przemiany pokarmowe zachodzące w żwaczu oraz na zaopatrzenie przeżuwacza w białko i energię.

Preparaty drożdżowe powszechnie stosowane w żywieniu przeżuwaczy wpływają korzystnie na stabilizację ekosystemu żwacza [Chung i wsp., 2011] oraz na wzrost produktywności zwierząt [Moharrery i Asadi, 2009]. Ściana komórkowa drożdży *Saccharomyces cerevisiae* jest bogatym źródłem węglowodanów strukturalnych składających się z: glukanów (około 60%), mannanów (40%), oraz chityny (około 5%), które mogą dostarczać energii dla mikroorganizmów żwacza. Drożdże wykorzystując niewielkie ilości tlenu obecnego w żwaczu [Newbold i wsp., 1996] stymulują rozwój bakterii celulozowych [Callaway i Martin, 1997] oraz orzęsków żwaczowych [Kowalik i wsp., 2011] co poprawia strawność węglowodanów strukturalnych i sprzyja efektywniejszemu wykorzystaniu produktów ich rozkładu przez przeżuwacze.

Przedstawione powyżej dane pozwoliły sformułować hipotezę, zgodnie, z którą żywe drożdże i ich metabolity mogą wpływać na aktywność enzymów hydrolitycznych poprzez modyfikacje populacji mikroorganizmów żwacza. Celem podjętych badań było określenie szybkości rozkładu węglowodanów dostarczanych w paszy: celulozy, ksylanu, pektyny i skrobi oraz pochodzenia mikrobiologicznego: chityny w żwaczu jałówek.

Doświadczenie wykonano na trzech jałówkach rasy jersey o średniej masie ciała 350 kg. Zwierzęta karmiono dawką kontrolną (7,0 kg SM/ dzień) zawierającą 87,5% siana łąkowego, 12% mieszanki pasz treściwych (śruta jęczmienna, poekstrakcyjna śruta rzepakowa, poekstrakcyjna śruta sojowa) oraz 0,5% mieszanki mineralno-witaminowej. Zwierzęta doświadczalne otrzymywały dietę kontrolną, wzbogaconą żywymi kulturami drożdży *S. cerevisiae* (10 g/ dzień) lub ich metabolitami (60 g/ dzień).

W wyniku przeprowadzonych badań wykazano, że zastosowanie żywych drożdży *S. cerevisiae* zwiększyło aktywność celulolityczną i amyloolityczną treści żwacza przed karmieniem i 4 godziny po karmieniu zwierząt w porównaniu z grupą kontrolną. Wzrost szybkości trawienia celulozy mógł być związany ze zwiększeniem liczebności bakterii celulolitycznych [Newbold i wsp., 1995] oraz orzęsków, należących do rodzaju *Diplodinium* lub *Ophryoscolex* [Dehority, 1993; Michałowski, 2001]. Zwiększenie szybkości rozkładu skrobi mogło być spowodowane wzrostem gęstości bakterii amyloolitycznych [Kmet i wsp., 1992], oraz populacji orzęsków należących do rodzaju *Isotricha* i *Dasytricha* [Williams, 1986] jak również *Entodinium* [Kowalik i wsp., 2008], które aktywnie uczestniczą w trawieniu i przemianach tego węglowodanu. Uzupełnienie diety w preparaty drożdżowe (zarówno w żywe kultury jak i ich metabolity) zmniejszyło aktywność ksylanazy, oraz pektynazy w porównaniu z grupą kontrolną. Zaobserwowane zmniejszenie aktywności enzymów mogło być wynikiem hamującego wpływu stosowanych dodatków na populację mikroorganizmów ksylanolitycznych i pektynolitycznych w żwaczu. Ponadto, wykazano, że zastosowanie drożdży nie miało wpływu na aktywność chitynolityczną treści żwacza, co mogło być spowodowane znikomą koncentracją tego węglowodanu w ścianach komórkowych drożdży, a tym samym jego niewielką dostępnością dla mikroorganizmów żwacza.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że stosowane preparaty drożdżowe mogą modyfikować aktywność enzymów hydrolitycznych w żwaczu. Jednak prawdopodobnie ze względu na małą zawartość chityny nie wpłynęły na aktywność chitynolityczną treści żwacza.

PODSUMOWANIE

Prace, przedstawione, jako jednolity cykl publikacji pozwalają wyjaśnić rolę badanych mikroorganizmów w trawieniu węglowodanów, co jest szczególnie ważne przy bardzo ograniczonej liczbie takich badań na świecie. Na podstawie uzyskanych wyników sformułowano następujące wnioski:

- Chityna stosowana, jako dodatek do podłoża hodowlanego stymuluje rozwój populacji orzęsków *Entodinium caudatum* i *Diploplastron affine* w warunkach długookresowej hodowli *in vitro*;
- Przyrost stężenia lotnych kwasów tłuszczowych w podłożu, obserwowany podczas doświadczeń fermentacyjnych wskazuje, że chityna była trawiona i wykorzystywana, jako źródło węgla w przemianach dostarczających pierwotniakom energii;
- Trawienie węglowodanów strukturalnych i zapasowych odbywa się we wszystkich odcinkach przewodu pokarmowego owiec;
- Zastosowanie preparatów drożdżowych będących naturalnym źródłem chityny w żywieniu przeżuwaczy moduluje aktywność hydrolityczną żwacza;
- Orzęski żwaczowe *E. caudatum* i *D. affine* posiadają enzymy zdolne do rozkładu chityny;
- Pierwotniaki stymulując rozwój grzybów w żwaczu sprzyjają tworzeniu się nowych zarodni i powstawaniu zwiększonej liczby zarodników. Wynikiem tych procesów jest wzrost aktywności chitynolitycznej i zawartości chityny w płynie żwacza. Powyższe parametry są zależne od składu gatunkowego mikrofauny żwacza;
- Badane gatunki orzęsków pełnią, drugorzędną rolę w przemianach chityny w żwaczu, co może być związane z bardzo małym wychwytem zarodników grzybów, będących głównym źródłem tego węglowodanu dla pierwotniaków.

Powyższe wnioski nie tylko stanowią uzupełnienie dotychczasowej wiedzy dotyczącej interakcji pomiędzy symbiotycznymi mikroorganizmami, ale również mogą być wykorzystane w praktyce do opracowania metod lepszego wykorzystania składników pokarmowych przez przeżuwacze poprzez modyfikacje ich mikrobiomu.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Afzalzadeh A., Hovell F.D. de B. (2002). Role of omasum in the control of feed intake and rumen digesta outflow. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 4: 37–50.
- [2] Akin D.E. 1976. Ultrastructure of rumen bacterial attachment to forage cell walls. *Applied and Environmental Microbiology*, 31: 562–568.
- [3] Ankrah P., Loerch S.C., Dehority B.A. (1990). Sequestration migration and lysis of protozoa in the rumen. *Journal of General Microbiology*, 136: 1869–1875.
- [4] Bełżecki G., Miltko R., Kwiatkowska E., Michałowski T. (2013). The ability of rumen ciliates *Eudiplodinium maggii*, *Diploplastron affine*, and *Entodinium caudatum* to use the murein saccharides. *Folia Microbiologica*, 58: 463–468.
- [5] Baldwin R.L., Emery R.S. (1960). The oxidation-reduction potential of rumen contents. *Journal of Dairy Science*, 43: 506–511.
- [6] Chesson A., Forsberg C.W. (1997). Polysaccharide degradation by rumen microorganisms. In: *The Rumen Microbial Ecosystem* (Eds. Hobson P.N., Stewart C.S.).

Blackie Academic & Professional, London, Wheinheim, New York, Tokyo, Melbourne, Madras; pp: 329–381.

- [7] Callaway E.S., Martin S.A., (1997). Effects of *Saccharomyces cerevisiae* culture on ruminal bacteria that utilize lactate and digest cellulose. *Journal of Dairy Science*, 80: 2035–2044.
- [8] Chung Y.H., Walker N.D., McGinn S.M., Beauchemin K.A. (2011). Differing effects of 2 active dried yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) strains on ruminal acidosis and methane production in nonlactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 94: 2431–2439.
- [9] Dehority B.A. (1993) Microbial ecology of cell wall fermentation. In: Forage cell wall structure and digestibility (Eds. Jung H.G., Buxton D.R., Hatfield R.D., Ralph J.) ASA-CSSA-SSSA, Madison, USA; pp: 425–453.
- [10] Dehority B.A. (2003). *Rumen microbiology*. Nottingham: Nottingham University Press.
- [11] Demeyer D., Doreau M. (1999). Targets and procedures for altering ruminant meat and milk lipids. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 59: 593–607.
- [12] DeVries, T.J., Beauchemin K.A., Dohme F., Schwartzkopf-Genswein K.S. (2009). Repeated ruminal acidosis challenges in lactating dairy cows at high and low risk for developing acidosis: Feeding, ruminating, and lying behavior. *Journal of Dairy Science*, 92: 5067–5078.
- [13] Edwards J.E., Kingston-Smith A.H., Jimenez H.R., Huws S.A., Skot K.P., Griffith G.W., McEwan N.R., Theodorou M.K. (2008). Dynamics of initial colonization of nonconserved perennial ryegrass by anaerobic fungi in the bovine rumen. *FEMS Microbiology Ecology*, 66: 537–545.
- [14] Hofmann R.R. (1989). Evolutionary steps of ecophysiological adaptation and diversification of ruminants: a comparative view of their digestive system. *Oecologia*, 78: 443–457.
- [15] Hungate R.E. (1966). *The Rumen and its Microbes*. Academic Press. Inc., New York.
- [16] Jouany J.P. (1989). Effects of diet on populations of rumen protozoa in relation to fiber digestion. In: *The roles of protozoa and fungi in ruminant digestion*. (Eds. Nolan J.V., Leng R.A., Demeyer D.I.) Proceedings of an International Seminar held at the University of New England; 1988 Sep 26–29; Armidale. Armidale: Penambul Books Armidale; pp: 59–74.
- [17] Jouany J.P., Ushida K. (1990). Protozoa and fibre digestion in the rumen. In: *The rumen ecosystem: the microbial metabolism and its regulation*. (Eds. Hoshino S., Onodera R., Mianto H., Itabashi H.) Tokyo: Japan Scientific Society Press; pp. 139–151.
- [18] Kmet V., Jonecová Z., Stachová M. (1992). The effect of pectinolytic yeast on rumen microflora. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 1: 165–170.
- [19] Kowalik B., Michałowski T., Pająk J.J., Taciak M., Rawa J. (2008). The effect of supplementing cows with live yeast *Saccharomyces cerevisiae*, on ciliate fauna and ruminal fermentation. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 17: 157–165.
- [20] Kowalik B., Michałowski T., Pająk J.J., Taciak M., Zalewska M., (2011). The effect of live yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, and their metabolites on ciliate fauna, fibrolytic and amylolytic activity, carbohydrate digestion and fermentation in the rumen of goats. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 20, 526–536.

- [21] Michałowski T. (1990). The synthesis and turnover of cellular matter of ciliates in the rumen. *Acta Protozoologica*, 29: 47–72.
- [22] Michałowski T. (2001). The *in vitro* digestion and fermentation of hay by the rumen ciliates *Eudiplodinium maggii*. *Annals of Warsaw Agricultural University - Animal Sciences; Special Number*, pp: 138–147.
- [23] Miltko R., Belżecki G., Kowalik B., Michałowski T. (2014). Can fungal zoospores be the source of energy for the rumen protozoa *Eudiplodinium maggii* ? *Anaerobe*, 29: 68–72.
- [24] Miltko R., Belżecki G., Michałowski T. (2012). Chitinolytic enzymes of the rumen ciliate *Eudiplodinium maggii*. *Folia Microbiologica*, 57 (4): 317–319.
- [25] Moharrery A., Asadi E. (2009). Effects of supplementing malate and yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) on the rumen enzyme profile and growth performance of lambs. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 18: 283–295.
- [26] Newbold C.J., Hilman K. (1990) The effect of ciliate protozoa in the turnover of bacteria and fungal protein in the rumen of sheep. *Letters in Applied Microbiology*, 11: 100–102.
- [27] Newbold C.J., Wallace R.J., Chen X.B., McIntosh F.M. (1995). Different strains of *Saccharomyces cerevisiae* differ in their effects on ruminal bacterial numbers *in vitro* and in sheep. *Journal of Animal Sciences*, 73: 1811–1818.
- [28] Newbold C.J., Wallace R.J., Chen X.B., McIntosh F.M. (1996). Mode of action of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a feed additive for ruminants. *British Journal of Nutrition*, 76: 249–261.
- [29] Orpin C.G. (1974). The rumen flagellate *Callimastix frontalis*: does sequestration occur? *Journal of General Microbiology*, 84: 395–398.
- [30] Orpin C.G. (1977). Studies on the defaunation of the ovine rumen using dioctyl sodium sulphosuccinate. *Journal of Applied Microbiology*, 43: 309–318.
- [31] Orpin C.G. (1989). Ecology of rumen anaerobic fungi in relation to the nutrition of the host animal. In: *The Roles of Protozoa and Fungi in Ruminant Digestion* (Eds. Nolan J.V., Leng R.A., Demeyer D.I.) Penambul Press, Armidale; pp: 29–38.
- [32] Rezaeian M., Beakes G.W., Parker D.S. (2004). Distribution and estimation of anaerobic zoospore fungi along the digestive tracts of sheep. *Mycological Research*, 108: 1227–1233.
- [33] Roche J.R., Friggens N.C., Kay J.K., Fisher M.W., Stafford K.J., Berry D.P. (2009). Body condition score and its association with dairy cow productivity, health, and welfare. *Journal of Dairy Science*, 92: 5769–5801.
- [34] Romulo B.H., Bird S.H., Leng R.A. (1986). The effects of defaunation on digestibility and rumen fungi counts in sheep fed high fibre diets. *Proceedings of the Australian Society of Animal Production*, 16: 327–330.
- [35] Simunek J, Hodrova B, Bartoova H, Kopečný J. (2001). Chitinolytic bacteria of the mammal digestive tract. *Folia Microbiologica*, 46: 76–78.
- [36] Ushida K., Tanaka H., Kojima Y. (1989). A simple *in situ* method for estimating fungal population size in the rumen. *Letters in Applied Microbiology*, 9: 109–111.

- [37] Warner A.C.I. (1966). Diurnal changes in the concentrations of micro-organisms in the rumens of sheep fed limited diets once daily. *Journal of General Microbiology*, 45: 213–235.
- [38] Williams A.G. (1986). Rumen holotrich ciliate protozoa. *Microbiological Reviews*, 50: 25–49.
- [39] Williams A.G., Coleman G.S. (1992). *The Rumen Protozoa*. Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona, Budapest.
- [40] Williams A.G., Coleman G.S. (1997). *The Rumen Protozoa*. In: *The Rumen Microbial Ecosystem* (Eds. Hobson P.N., Stewart C.S.). Blackie Academic & Professional, London, Weinheim, New York, Tokyo, Melbourne, Madras; pp: 73–139.
- [41] Williams A.G., Withers S.E. (1993). Changes in the rumen microbial population and its activities during the refaunation period after the reintroduction of ciliate protozoa into the rumen of defaunated sheep. *Canadian Journal of Microbiology*, 39: 61–69.
- [42] Wolin M.J., Miller T.L., Stewart C.S. (1997). Microbe-microbe interactions. In: *The rumen microbial ecosystem*. (Eds. Hobson P.N., Stewart C.S.) 2nd ed. London: Blackie Academic & Professional; pp. 467–491.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych.

Mikroorganizmy (bakterie, grzyby, pierwotniaki) pełnią kluczową rolę w procesach trawiennych zachodzących w przedżołądkach przeżuwaczy. Zdolności trawienne pierwotniaków i ich genetyczne uwarunkowanie są jednak słabo poznane. Ważnym biologicznie i również mało zbadanym zagadnieniem jest zmienność osobnicza tych drobnoustrojów. Zagadnienia te stały się, przedmiotem moich zainteresowań naukowych po rozpoczęciu pracy w Instytucie Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego Polskiej Akademii Nauk, w Jabłonie w 2002 roku. Badania rozpoczęłam, jako pracownik (asystent) kontraktowy, zatrudniony do realizacji dwóch projektów badawczych w V Programie Ramowym Unii Europejskiej w okresie 2002-2005. W grantach tych uczestniczyły zespoły (partnerzy) z Francji, Holandii, Niemiec, Polski, Słowacji i Szkocji. Celem pierwszego z nich pt. „European rumen ciliate culture collection (ERCULE)” było stworzenie banku czystych kultur orzęsków oraz bibliotek genów najbardziej pospolitych gatunków występujących w żwaczu. Zespół polski, kierowany przez prof. T. Michałowskiego, ze względu na posiadane metody identyfikacji, izolacji i hodowli pierwotniaków w jednogatunkowych kulturach, pełnił kluczową rolę w tym projekcie. Opanowanie powyższych metod pozwoliło mi na czynny udział we wszystkich realizowanych zadaniach. Badania filogenetyczne wykonano na 32 gatunkach orzęsków żwaczowych wyizolowanych ze żwacza owiec i krów. Do badań zmienności w obrębie gatunku izolowano pojedyncze orzęski. Badania 18S rRNA pierwotniaków należących do rodzaju *Ophryoscolex*, wykonano metodą analizy restrykcyjnej po amplifikacji DNA pojedynczych komórek różniących się budową morfologiczną. Nie wykazano różnic wskazujących na przynależność poszczególnych form morfologicznych do odrębnych gatunków. Uzyskane wyniki mogą świadczyć o tym, że opisane w literaturze gatunki są różnymi formami tego samego gatunku oraz wskazują na konieczność rewizji taksonomii rodziny *Ophryoscolecidae* z użyciem metod biologii molekularnej. Efektem wspólnych prac było stworzenie banku czystych kultur 16 gatunków oraz bibliotek cDNA 15 gatunków

orzęsków żwaczowych z rodziny *Ophryoscolecidae* i *Isotrichidae*. Kolekcja kultur została zdeponowana w INRA w Clermont-Ferrand (Francja), a biblioteki cDNA w RRI w Aberdeen (Szkocja). Obecnie służą one, jako materiał badawczy dla placówek naukowych na całym świecie, które są zainteresowane badaniami dotyczącymi biologii orzęsków żwaczowych, a nie dysponują metodami ich identyfikacji i hodowli. Celem drugiego projektu pt. „Ciliates as monitors of the environmental safety of GMO (acronym CIMES)” było zbadanie możliwości i częstości transferu genów lateralnych z genetycznie modyfikowanej kukurydzy do genomu pierwotniaków żwaczowych wykazujących zdolności celulolityczne. W ramach projektu prowadzono długookresowe hodowle orzęsków żwaczowych, którym jako główny składnik pokarmu podawano wysuszone i sproszkowane liście genetycznie transformowanej kukurydzy BT 176 z dodanym genem odporności na zakażenia grzybicze. W toku badań dokonano optymalizacji metod utrwalania pierwotniaków, zaprojektowano specyficzne sondy molekularne oraz wykonano pomiary ich autofluorescencji. W celu śledzenia transferu genu z kukurydzy do makronuklearnego DNA orzęsków stosowano metodę hybrydyzacji *in situ* (FISH). W oparciu o uzyskane wyniki nie wykazano transferu genów. Należy jednak, zaznaczyć, że maksymalny okres hodowli pierwotniaków we wspomnianym doświadczeniu nie przekraczał 24 miesięcy.

Część wyników uzyskanych w opisanych projektach została zaprezentowana na konferencjach o zasięgu międzynarodowym i opublikowana w materiałach konferencyjnych (III.B.1; III.B.2; III.B.4; III.B.5-III.B.7) oraz jako prace oryginalne (II.A.3; II.A.19; II.D.1).

Po zakończeniu grantów europejskich, ważnym punktem na mojej drodze naukowej było uczestnictwo w grantie realizowanym we współpracy z Instytutem Biochemii i Biofizyki PAN pt. „Budowa i optymalizacja mikrobiologicznych ogniw paliwowych z udziałem mikroorganizmów żwacza oraz bakterii redukujących metale”. Perspektywa wyczerpania konwencjonalnych źródeł energii oraz stale rosnąca ilość odpadów związana z jej pozyskaniem skłoniła nas do podjęcia próby skonstruowania i zoptymalizowania mikrobiologicznego ogniwa paliwowego z udziałem mikroorganizmów żwacza. W trakcie badań wykazano, że orzęski żwaczowe z rodziny *Isotrichidae* mogą być wykorzystywane, jako potencjalne źródło wodoru, oraz że wyprodukowany biogaz może być używany w ogniwach paliwowych służących do pozyskiwania energii elektrycznej. Należy podkreślić, że gęstość mocy uzyskana w biowodorowym ogniwie paliwowym równała się gęstości mocy uzyskanej w chemicznym ogniwie paliwowym zasilanym czystym wodorem, oraz że nie odnotowano żadnych efektów zatrucia bioogniwa gazem fermentacyjnym.

Uzyskane wyniki przedstawiono na sesji sprawozdawczej w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie (III.B.8) oraz opublikowano, jako pracę oryginalną (II.A.9).

Doświadczenie zdobyte podczas realizacji powyższych projektów pozwoliło na podjęcie nowych wyzwań naukowych, które koncentrowały się wokół zagadnień obejmujących następujące tematy:

I. Rola mikroorganizmów w przemianach węglowodanów:

a) zapasowych (skrobia, fruktany)

b) strukturalnych pochodzenia roślinnego (lichean, pachyman, kurdlan)

c) strukturalnych pochodzenia mikrobiologicznego (mureina, chityna)

II. Udział orzęsków w procesach metanogenzy i gospodarki lipidowej

III. Charakterystyka procesów trawiennych zachodzących u ssaków roślinożernych

IV. Wpływ stosowanych dodatków paszowych na procesy trawienne, wskaźniki biochemiczne krwi oraz efektywność produkcji i jakość mięsa

W początkowym okresie, po zakończeniu grantów europejskich, zostałam włączona do zespołu zajmującego się tematyką związaną z określeniem roli drobnoustrojów żwacza w przemianach węglowodanów zapasowych i strukturalnych.

Ia. Rola mikroorganizmów w przemianach węglowodanów zapasowych (skrobia, fruktany)

Wykonano doświadczenia, na podstawie, których wykazano, że pospolite gatunki orzęsków: *Eudiplodinium maggii* i *Entodinium caudatum* uczestniczą w metabolizmie skrobi w żwaczu. Udowodniono, że orzęski te aktywnie pobierają granule skrobi, którą trawiają wewnątrzkomórkowo, a powstałe produkty wykorzystują na pokrycie bieżącego zapotrzebowania energetycznego oraz do syntezy węglowodanów zapasowych. Ponadto, wykazano, że zmniejszając pulę skrobi dostępną dla innych mikroorganizmów, zwiększają zawartość węglowodanów zapasowych w treści odpływającej do dalszych odcinków przewodu pokarmowego, co poprawia zaopatrzenie gospodarza w glukozę.

Inne doświadczenia, w których brałam udział obejmowały charakterystykę fruktanolitycznych bakterii należących do rodzaju *Treponema*. Badania te, wykonano we współpracy z mikrobiologami z Instytutu Fizjologii Zwierząt Słowackiej Akademii Nauk w Koszycach. Bakterie wyizolowano z płynu żwacza, oznaczono symbolem kT i utrzymywano w warunkach *in vitro*. Badania morfologii i ultrastruktury wykonano przy pomocy skaningowego i transmisyjnego mikroskopu elektronowego. Wykazano, że komórki badanych bakterii mają postać spirali o długości 5,5-11,5 μm i szerokości 0,42-0,51 μm , a maksymalna liczba zwojów wynosi 7. Ponadto, stwierdzono, że badany szczep bakterii fermentował liczne cukry proste i dwucukry oraz, że głównymi produktami tej fermentacji były: kwas mrówkowy, kwas octowy i etanol w proporcjach molowych 16:10:1. Badania enzymatyczne wykazały obecność dwóch enzymów rozkładających wiązania glikozydowe 2,6 wewnątrz łańcucha reszt β -D-fruktozylowych. Na podstawie analizy porównawczej sekwencji genu 16S rRNA szczepu kT z danymi z banku genów wykazano największe podobieństwo do szczepu CA treponemy żwaczowej wyizolowanej w USA. Na podstawie badań morfologicznych oraz analizy filogenetycznej wyodrębniono nowy gatunek bakterii *Treponema zioleckii* sp.

Wyniki dotyczące roli mikroorganizmów w przemianach węglowodanów zapasowych zostały opublikowane w materiałach konferencyjnych (III.B.3) oraz jako prace oryginalne (II.A.1; II.A.5; II.A.23).

Ib. Rola mikroorganizmów w przemianach węglowodanów strukturalnych pochodzenia roślinnego (lichean, pachyman, kurdlan)

Uczestniczyłam również w zadaniu, w którym określano udział orzęsków *Diploplastron affine* w przemianach niecelulozowych węglowodanów strukturalnych β -glukanów pochodzenia roślinnego: licheanu, pachymanu i kurdlanu. Realizacja tego zadania była możliwa dzięki dotacji statutowej Instytutu Fizjologii i Żywienia Zwierząt Polskiej Akademii Nauk. Badania wykonano z podziałem na dwie części: doświadczenia wzrostowe w warunkach długookresowej hodowli *in vitro*, oraz badania enzymatyczne. Wyniki doświadczeń hodowlanych wykazały, że wzbogacenie podłoża o pachyman (1,3- β -glukan) stymulowało rozwój populacji orzęsków *D. affine* i było zależne od stosowanej dawki. Na podstawie oznaczeń enzymatycznych stwierdzono, że wszystkie badane rodzaje β -glukanów podlegały rozkładowi. Najszybciej trawionym węglowodanem był lichean, a najwolniej kurdlan, optymalne warunki ich rozkładu, mieściły się w zakresie 45-55°C i 5-5,5 pH. Ostateczne potwierdzenie zdolności orzęsków *D. affine* do trawienia β -glukanów wykazano w badaniach zymograficznych, w których stwierdzono obecność 3 enzymów rozkładających wiązania β -1,3-glikozydowe.

Wyniki uzyskane podczas realizacji powyższego tematu zostały zawarte w doniesieniach zaprezentowanych na konferencjach międzynarodowych i krajowych (III.A.16; III.A.19; III.A.29-III.A.31) oraz opublikowane, jako praca oryginalna (II.A.11).

Ic. Rola mikroorganizmów w przemianach węglowodanów strukturalnych pochodzenia mikrobiologicznego (mureina, chityna)

Kolejnym tematem mojej pracy badawczej było określenie udziału orzęsków w przemianach węglowodanów strukturalnych syntetyzowanych w komórkach mikroorganizmów bytujących w żwaczu. Część badań była wykonana w ramach działalności statutowej Instytutu Fizjologii i Żywienia Zwierząt Polskiej Akademii Nauk, a pozostała była współfinansowana przez dwa projekty badawcze: „Zdolności orzęsków żwaczowych do trawienia i wykorzystania węglowodanów strukturalnych ścian komórkowych bakterii i grzybów w żwaczu”, oraz „Zdolności chitynolityczne orzęsków *Eudiplodinium maggii* i ich udział w przemianach chityny w żwaczu” (grant promotorski), w których byłam wykonawcą.

Zdolności chitynolityczne orzęsków żwaczowych *E. maggii* oraz ich możliwości wykorzystania komercyjnej chityny i chityny grzybów żwaczowych były przedmiotem mojej rozprawy doktorskiej, którą obroniłam z wyróżnieniem w 2011 roku. Celem podjętych badań było: określenie wpływu dodatku chityny i zarodników grzybów żwaczowych do podłoża hodowlanego na przeżywalność i liczebność populacji orzęsków w hodowli *in vitro*; zbadanie zdolności pierwotniaków *E. maggii* do trawienia chityny; charakterystyka enzymów katalizujących rozkład chityny w komórkach badanego gatunku pierwotniaków; oszacowanie zawartości i produkcji chityny w płynie żwacza, oraz określenie udziału badanych pierwotniaków w przemianach chityny w żwaczu.

Wyniki długookresowych doświadczeń hodowlanych wykazały, że dodatek chityny oraz liofilizowanych zoospor grzybów do podłoża spełniającego wymagania życiowe *E. maggii* stymulował ich rozwój. Ponadto, wykazano pozytywną korelację między dawką stosowanego dodatku a liczebnością orzęsków. Przyrost stężenia lotnych kwasów tłuszczowych w podłożu, stwierdzony podczas doświadczeń fermentacyjnych może świadczyć o tym, że chityna i węglowodany zawarte w zoosporach grzybów były trawione i wykorzystywane, jako źródła węgla w przemianach dostarczających pierwotniakom energii.

Potwierdziły to, oznaczenia enzymatyczne, które wykazały, że za trawienie tego węglowodanu w komórkach orzęsków *E. maggii* odpowiedzialne są enzymy o właściwościach endochitynazy, egzochitynazy i chiobiazy. Badania *in vivo* wykonano na owcach zaopatrzonych w trwałe przetoki żwaczowe. Wykazano, że pierwotniaki *E. maggii*, stymulowały rozwój grzybów w żwaczu sprzyjając tworzeniu się nowych zarodni i powstawaniu zwiększonej liczby zarodników. Wynikiem tych procesów był przyrost zawartości chityny w płynie żwacza. Jednocześnie wykazano, że badany gatunek orzęsków wykorzystywał tylko niewielką część chityny syntetyzowanej w żwaczu, co mogło być związane z bardzo małym wychwytem zarodników grzybów, będących głównym źródłem chityny dla badanego gatunku pierwotniaków.

W innych badaniach realizowanych w naszym zespole wykazaliśmy, że orzęski *Diploplastron affine* podobnie jak pierwotniaki *E. maggii* posiadają enzymy uczestniczące w rozkładzie chityny. Identyfikacji dokonano metodą zymografii po elektroforetycznym rozdziale białka na żelu poliakrylamidowym i renaturacji enzymów. W ekstrakcie komórkowym orzęsków zidentyfikowano trzy enzymy o właściwościach endochitynazy, dwa - egzochitynazy i dwa - chitobiazy. Masa cząsteczkowa endoenzymów wynosiła odpowiednio 80, 65 i 30 kDa, egzoenzymów - 75 i 55 kDa, a chitobiazy - 45kDa.

Cześć wyników dotycząca zdolności pierwotniaków żwaczowych do wykorzystania chityny została opisana w doniesieniach prezentowanych na konferencjach międzynarodowych i krajowych (III.B.11-III.B.14; III.B.17; III.B.18; III.B.22; III.B.24-III.B.27; III.B.33-III.B.35; III.B.46) oraz w publikacjach oryginalnych (II.A.4; II.A.7; II.A.10; II.A.15; II.D.2). Natomiast, pozostała część, została przedstawiona, jako osiągnięcie będące podstawą do ubiegania się o stopień naukowy doktora habilitowanego.

Drugim kierunkiem, realizowanym w obrębie powyższego tematu, było określenie zdolności pospolitych orzęsków do trawienia i wykorzystania węglowodanów ścian komórkowych bakterii. Badania te wykonano z podziałem na trzy części: doświadczenia wzrostowe w warunkach długookresowej hodowli *in vitro*, badania enzymatyczne oraz doświadczenia *in vivo*. Jako obiekt badań wybrano orzęski *D. affine*, *E. maggii* oraz *E. caudatum*. Stwierdzono, że dodatek mureiny do podłoża hodowlanego stymulował rozwój wszystkich badanych gatunków orzęsków. Uzyskane wyniki wykazały również pozytywną korelację między wielkością dawki mureiny, a liczebnością populacji pierwotniaków. Stymulujący wpływ mureiny mógł być wynikiem zwiększenia ilości węglowodanów, które orzęski wykorzystywały, jako źródło energii. Powyższą sugestię potwierdzają wyniki badań fermentacyjnych, które wykazały, że kultury orzęsków inkubowane z mureiną produkowały więcej LKT niż „głodzone” kultury kontrolne. Ponadto, wykazano, że orzęski posiadają aktywność mureinolityczną i zmniejszają ilość mureiny w żwaczu. Badania enzymatyczne potwierdziły zdolność pierwotniaków do trawienia mureiny. Węglowodany wyizolowane z mureiny rozkładane były z największą szybkością w przypadku surowego preparatu enzymatycznego pierwotniaków *E. caudatum*, następnie *D. affine*, a najwolniej w przypadku *E. maggii*. Optymalne warunki reakcji rozkładu wahały się w zakresie temperatur 40-45°C oraz pH 4,5-5,0. Ostateczne potwierdzenie zdolności orzęsków *D. affine* do trawienia mureiny wykazano w badaniach zymograficznych, w których stwierdzono obecność dwóch enzymów o cechach lizozymu. Badania *in vivo* wykonano na owcach zaopatrzonych w trwałe przetoki

zwaczowe. Wyniki tych badań potwierdziły, że pobrane przez orzęski węglowodanowe składniki mureiny podlegały wewnątrzkomórkowemu trawieniu, a powstałe produkty były wykorzystywane na pokrycie bieżącego zapotrzebowania energetycznego orzęsków.

Uzyskane wyniki przedstawiono na konferencjach o zasięgu krajowym i międzynarodowym oraz opublikowano, jako doniesienia (III.A.15; III.A.20; III.A.21; III.A.23; III.A.28) oraz jako publikacje oryginalne (II.A.8; II.A.12-II.A.14).

II. Udział orzęsków w procesach metanogeny i gospodarki lipidowej

Kolejny obszar moich zainteresowań naukowych koncentrował się wokół zagadnień związanych z rolą orzęsków w przemianach lipidów roślinnych. Realizacja tego tematu była możliwa dzięki dotacji na działalność statutową Instytutu Fizjologii i Żywienia Zwierząt Polskiej Akademii Nauk. W trakcie badań wykonano długookresowe doświadczenia hodowlane, których celem było określenie wpływu tłuszczu roślinnego dodawanego w formie mączki z nasion lnu, słonecznika lub rzepaku do podłoża hodowlanego na przeżywalność i rozwój populacji orzęsków *D. affine*. Stosowano dwa poziomy mączek, które wynosiły 3 i 9% dawki podstawowej. Stwierdzono, stymulujący wpływ nieodtłuszczonej mączki na liczebność pierwotniaków niezależnie od jej rodzaju i zawartości w diecie. Ponadto, wykazano, że odtłuszczenie mączki znosiło jej pozytywny wpływ na rozwój populacji orzęsków. Negatywny wpływ odtłuszczenia zaznaczył się najwyraźniej w przypadku mączki z nasion słonecznika, najmniej widoczny był on w przypadku 3% dodatku mączki z nasion rzepaku.

Powyższe wyniki oraz sprzeczne dane literaturowe opisujące oddziaływanie nienasyconych kwasów tłuszczowych pochodzących z olejów roślinnych na liczebność populacji orzęsków zwaczowych oraz produkcję metanu zachęciły nas do kontynuowania badań realizowanych we współpracy z zespołem badawczym z Katedry Żywienia Zwierząt i Gospodarki Paszowej, Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Celem pierwszego etapu doświadczeń było określenie wpływu olejów: rzepakowego i lnianego (bogatych w nienasycone kwasy tłuszczowe), na populację orzęsków oraz produkcję metanu. Ze względu na swoje powiązania z metanogenami, jako obiekt badań wybrano orzęski *Eremoplastron dilobum*. Wyniki 24 godzinnej inkubacji pierwotniaków z 5% oleju rzepakowego dodanego do medium hodowlanego, wykazały, że dodatek ten nie miał wpływu na stan populacji orzęsków przy jednoczesnym ograniczeniu emisji metanu. Odwrotny efekt zaobserwowano po zastosowaniu dodatku oleju lnianego, który stymulował rozwój populacji pierwotniaków, jednak nie miał wpływu na produkcję metanu. Celem drugiego etapu realizowanego w ramach współpracy była analiza profilu kwasów tłuszczowych obecnych w komórkach pierwotniaków pospolicie występujących w żwaczu. Obiektem badań były orzęski *E. caudatum*, *E. maggii* oraz *D. affine* pozyskane od monofaunowanych owiec. Profil długołańcuchowych kwasów tłuszczowych oznaczono przy użyciu chromatografu gazowego. Wyniki oznaczeń chromatograficznych wykazały, że skład kwasów tłuszczowych obecnych w komórkach pierwotniaków bytujących w żwaczu jest zależny od gatunku orzęsków. Najwyższy poziom kwasu palmitynowego (C16:0) stwierdzono w komórkach *E. caudatum*, natomiast *E. maggii* charakteryzowało się najwyższą zawartością kwasu α -linolenowego (C18:3 cis-9,12,15). *D. affine* miało największą koncentrację kwasu wakcenenowego (C18:1 trans-11),

sumy C18:1 trans oraz sumy jednonienasyconych kwasów tłuszczowych. Natomiast zarówno w komórkach *D. affine* jak i w *E. caudatum* wykazano duże stężenie sprzężonego kwasu linolowego (CLA) (C18:2 cis-9 trans-11). Uzyskane wyniki mogą świadczyć o różnorodnym metabolizmie w komórkach orzęsków, oraz że drobnoustroje te mogą stanowić źródło nienasyconych kwasów tłuszczowych dla zwierząt przeżuwających.

Wyniki tych badań opublikowano, jako doniesienia naukowe w materiałach konferencyjnych o zasięgu międzynarodowym i krajowym (III.B.9; III.B.10) oraz jako prace oryginalne (II.A.2; II.A.6).

III. Charakterystyka procesów trawiennych zachodzących u ssaków roślinożernych

W kolejnych latach poszerzyłam zakres swoich zainteresowań naukowych o tematykę związaną z procesami trawiennymi zachodzącymi u dziko żyjących i utrzymywanych w warunkach zamkniętych zwierząt roślinożernych. Większość danych literaturowych związanych z fizjologią trawienia u ssaków skupia się wokół zwierząt gospodarskich. Celowym wydawało się, więc podjęcie badań nad procesami trawienia materiału roślinnego u zwierząt takich jak: konie, gryzonie, oraz dziko żyjące przeżuwacze.

Realizacja badań związanych z procesami trawiennymi u największego euroazjatyckiego gryzonia – bobra (*Castor fiber*) była możliwa dzięki projektowi: „Charakterystyka mikroflory i mikrofauny oraz helminofauny przewodu pokarmowego bobra europejskiego: badanie zależności pomiędzy stanem populacji mikroorganizmów a aktywnością celulolityczną i profilem kwasów tłuszczowych w wybranych tkankach” - w którym byłam wykonawcą.

Prawna ochrona bobra euroazjatyckiego na terenie Polski trwająca przez kilka ostatnich dekad sprawiła, że obecnie jest on gatunkiem pospolitym, wchodzącym w bezpośredni kontakt z człowiekiem. W związku z powyższym począwszy od 2004 roku bóbr został zakwalifikowany do grupy zwierząt podlegających ochronie częściowej - niezagrożonych wyginięciem. Zmiana klasyfikacji pozwoliła na podjęcie badań fizjologicznych tego gatunku. Materiał badawczy stanowiły bobry pozyskane za zgodą Ministerstwa Ochrony Środowiska oraz Komisji Etycznej z terenów województwa podlaskiego oraz warmińsko - mazurskiego. Zwierzęta odławiano w okresach: zimowym, letnim i jesiennym, usypiano a następnie przeprowadzano pomiary morfometryczne i zbierano materiał do badań.

Badania preferencji pokarmowych tego gatunku potwierdziły jego przynależność do grupy „*caecal fermentors*”. Cechą charakterystyczną tych zwierząt jest trawienie węglowodanowych składników pokarmu w jelicie ślepym. Przeprowadzona analiza treści pokarmowej wykazała, że skład diety bobra zależy od dostępności bazy pokarmowej i może świadczyć o dużych zdolnościach przystosowawczych. Głównym źródłem pokarmu w zimie były pędy drzew, natomiast wraz z postępem okresu wegetacyjnego w jego diecie zwiększał się udział liści drzew, traw, turzyc, oraz roślinności zielonej przy jednoczesnym zmniejszeniu udziału pędów. Odwrotny efekt, zaobserwowano jesienią. Stwierdzone różnice sezonowe widoczne w diecie, były zsynchronizowane ze zmianami w długości i w masie przewodu pokarmowego, oraz w strukturze treści pokarmowej. Skład diety wpływał również na aktywność hydrolityczną treści pokarmowej, co mogło być spowodowane różnicami w składzie populacji bakterii. Analiza zmienności bakterii treści przewodu pokarmowego bobra

(zrealizowana w ramach współpracy z Instytutem Fizjologii Słowackiej Akademii Nauk) wykazała, że podlega ona zmianom zarówno ilościowym jak i jakościowym w ciągu roku. Największą liczebność całkowitą bakterii stwierdzono w jelicie grubym - jesienią. Badania nad stopniem zainfekowania bobrów (realizowane we współpracy z Instytutem Parazytologii im. Witolda Stefańskiego PAN) wykazały zmiany zapalne śluzówki żołądka, spowodowane przez niczenie *Travassosius rufus* oraz jelita ślepego - przez przywrę *Stichorchis subtriquertus*. Stwierdzono również zmiany w wątrobie, spowodowane przez bąblowicę wielojamową *Echinococcus multilocularis*.

Wyniki uzyskane w czasie realizacji projektu zostały przedstawione na konferencjach o zasięgu międzynarodowym i krajowym, opublikowane, jako doniesienia naukowe (III.B.32; III.B.36-III.B.40; III.B.47; III.B.50; III.B.52), oraz jako praca oryginalna (II.A.16). Realizacja tego tematu wspólnie z Instytutem Fizjologii Słowackiej Akademii Nauk w Koszycach była możliwa dzięki wymianie bezdewizowej pomiędzy Słowacką i Polską Akademią Nauk. W ramach, wymiany odbyłam trzy krótkoterminowe staże naukowe wynikiem, których są wspólne doniesienia konferencyjne (III.B.41; III.B.44; III.B.45; III.B.48), oraz publikacje oryginalne (II.A.18; II.D.3; II.D.4).

Stale rosnąca populacja dziko żyjących rodzimych przeżuwaczy oraz wzrost zainteresowania ich hodowlą fermową przyczyniły się do podjęcia przeze mnie pionierskich badań skoncentrowanych wokół zagadnień dotyczących próby określenia interakcji pomiędzy rodzajem pobieranego pokarmu, a składem mikrobiomu i procesami trawiennymi zachodzącymi w żwaczu. Powyższe badania realizowane są w ramach działalności statutowej Instytutu Fizjologii i Żywienia Zwierząt Polskiej Akademii Nauk oraz we współpracy z kilkoma krajowymi ośrodkami: z Instytutem Parazytologii im. Witolda Stefańskiego PAN w Warszawie, z Samodzielnym Zakładem Botaniki Leśnej SGGW i z Katedrą Genetyki Ogólnej Hodowli Zwierząt SGGW, jak również we współpracy zagranicznej z Instytutem Fizjologii Zwierząt Słowackiej Akademii Nauk.

Materiałem badawczym była treść i/ lub płyn żwacza pozyskany w okresie jesienno-zimowym z odstrzałów selekcyjno-redukcyjnych realizowanych w ramach planowej gospodarki łowieckiej na terenie Polski. Badania mikroskopowe wykazały, zróżnicowany skład i gęstość populacji mikrofauny jeleniowatych żyjących w stanie wolnym. Największą liczebność orzęsków stwierdzono w płynie żwacza sarny europejskiej, następnie daniela europejskiego, najmniejszą – jelenia szlachetnego. Odwrotną zależność zaobserwowano w przypadku oznaczeń jakościowych, które wykazały obecność przedstawicieli rodziny *Ophryoscolecidae* należących do 3 rodzajów: *Entodinium*, *Diplodinium* i *Epidinium* (jeleń), 2 rodzajów: *Entodinium* i *Epidinium* (daniel) oraz rodzaju: *Entodinium* (sarna). Badania faunistyczne treści żwacza żubra wykazały obecność pierwotniaków z rodzajów: *Entodinium*, *Diplodinium*, *Epidinium*, *Eudiplodinium* i *Elytroplastron* należących do rodziny *Ophryoscolecidae* oraz *Isotricha* i *Dasytricha* z rodziny *Isotrichidae*.

Analiza botaniczna treści żwacza badanych gatunków przeżuwaczy wykazała zróżnicowany skład. Stwierdzono, że główny udział w diecie sarny europejskiej mają krzewinki, które stanowiły do 94% pobieranego pokarmu, następnie igły (świerk, modrzew i sosna), rośliny zielne dwuliścienne, pędy liściaste, rośliny trawiaste, oraz liście (w tym liście rzepaku). Krzewinki były również głównym składnikiem diety jelenia szlachetnego z tym,

że stanowiły one do 30% pobieranego pokarmu, przy stosunkowo dużym udziale roślin trawiastych i igieł (świerka, modrzewia i sosny) wynoszącym odpowiednio - 24% i 20%. Odmienne preferencje pokarmowe stwierdzono w przypadku daniela europejskiego gdzie rośliny trawiaste, igły sosny i żołądźce były obecne we wszystkich badanych próbkach treści żwacza. Rośliny zielne, jeżynę, krzewinki i liście drzew zaobserwowano w ponad połowie prób, natomiast mech i zdrewniałe pędy pojawiały się sporadycznie. Wyniki analizy botanicznej treści żwacza żubra potwierdziły przynależność tego gatunku do typu „grazers” („trawożerców”).

Dotychczasowe wyniki badań przedstawiono na konferencjach o zasięgu międzynarodowym i krajowym, oraz opublikowano, jako doniesienia naukowe (III.B.42; III.B.43; III.B.49; III. B.51; III.B53; III.B.56; III.B.57) oraz jako prace oryginalne (II.A.17; II.A.20).

IV. Wpływ stosowanych dodatków paszowych na procesy trawienne, wskaźniki biochemiczne krwi oraz efektywność produkcji i jakość mięsa

Kolejny obszar mojej pracy badawczej koncentrował się wokół zagadnień związanych z zastosowaniem dodatków paszowych, w żywieniu zwierząt gospodarskich i towarzyszących.

W badaniach nad zastosowaniem różnych form chemicznych selenu w żywieniu jagniąt wykazano, że dodatek 0,1% kwasu karnozynowego oraz 0,35 ppm Se w postaci selenianu (VI) do dawki pokarmowej zmniejsza produkcję metanu oraz dwutlenku węgla w żwaczu w porównaniu z grupami kontrolnymi. Ponadto, stwierdzono, że zastosowanie selenowego preparatu drożdżowego (SeY) wpłynęło na zwiększenie sumy krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych w płynie żwacza w porównaniu z grupą kontrolną i grupą zawierającą dodatek selenianu (VI). Wykazano, że dodanie kwasu karnozynowego do dawki poprawia, jakość sensoryczną mięsa oraz zwiększa zawartość prozdrowotnych kwasów tłuszczowych i egzogennych aminokwasów w mięsie jagniąt.

Uzyskane wyniki zostały przedstawione i opublikowane, jako doniesienie konferencyjne (III.B.59) oraz jako publikacja naukowa (II.A.22).

Uczestniczyłam również w badaniach nad wpływem żywych kultur drożdży *Saccharomyces cerevisiae* na procesy zachodzące w żwaczu oraz na wskaźniki biochemiczne krwi owiec. W badaniach tych nie wykazano, wpływu żywych drożdży na całkowitą strawność białka i włókna pokarmowego, natomiast zaobserwowano trend spadkowy zmian strawności węglowodanów zapasowych. Ponadto, stwierdzono zwiększenie retencji magnezu, oraz zmniejszenie stężenia całkowitego cholesterolu i jego frakcji LDL, oraz triacyloglicerolu w surowicy krwi.

Uzyskane wyniki zostały zaprezentowane w formie doniesienia konferencyjnego (III.B.54) oraz jako publikacja naukowa (III.A.21).

Określenie znaczenia stosowania polifenolowych dodatków w żywieniu przeżuwaczy było kolejnym etapem moich badań naukowych. Realizacja tego tematu była możliwa dzięki projektowi pt.: „Wpływ dodatku tanin i olejów do paszy dla owiec na populację mikroorganizmów i przemiany w żwaczu oraz aktywność enzymatyczną soku żółciowo–trzustkowego i jakość jagnięciny”, w którym byłam wykonawcą.

Celem poznawczym grantu było określenie wpływu rodzaju tanin i olejów roślinnych w dawkach pokarmowych na procesy trawienne u owiec. Celem użytecznym natomiast, było określenie wpływu tych dodatków na wyniki odchowu jagniąt i profil długołańcuchowych kwasów tłuszczowych jagnięciny.

Na podstawie uzyskanych wyników wykazano, że zastosowany w żywieniu owiec dodatek kory dębu, jako źródło tanin hydrolizujących, może modyfikować procesy trawienne w żwaczu (zwiększa liczebność pierwotniaków oraz ilość kwasu masłowego) oraz zwiększać odłożenie wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w tuszy jagniąt. Ponadto, stwierdzono, że łącznie oleju lnianego i liści borówki brusznicy ogranicza produkcję metanu w żwaczu, co może zmniejszać efekt cieplarniany. Wykazano, również, że olej lniany zawarty w dietach powodował większe odłożenie nienasyconych kwasów tłuszczowych z rodziny n-3 w jagnięcinie.

Część uzyskanych wyników przedstawiono, jako doniesienia naukowe zaprezentowane na konferencjach o zasięgu krajowym i zagranicznym (III.B.58; III.B.60; III.B.61; III.B.64).

W ramach współpracy naukowej realizowanej na podstawie porozumienia pomiędzy Instytutem Fizjologii i Żywienia Zwierząt Polskiej Akademii Nauk i Instytutem Fizjologii Zwierząt Słowackiej Akademii Nauk prowadzone są badania nad zastosowaniem probiotycznych szczepów bakterii oraz i/ lub ich bakteriocyn w żywieniu zwierząt (króliki, konie, psy). Badania te są w trakcie realizacji, jednak na podstawie dotychczasowych wyników można stwierdzić, że zastosowane szczepy bakterii (*E. durans* ED26E/7, *L. fermentum* CCM 7421) wpłynęły korzystnie na parametry biochemiczne krwi, zmniejszenie liczebności mikroorganizmów patogennych, zachowanie równowagi symbiotycznej mikroflory, poprawę procesów trawiennych, oraz w przypadku królików również na poprawę jakości mięsa.

Efektom dotychczasowej współpracy są doniesienia konferencyjne zaprezentowane na konferencjach o zasięgu międzynarodowym (III.B.55; III.B.62; III.B.63; III.B.65; III.B.66).

PODSUMOWANIE

Badania dotyczące procesów trawiennych w komorach fermentacyjnych dostarczają wiedzy na temat składu mikrobiomu u różnych gatunków zwierząt i jego zmian w zależności od dostępnego pożywienia. Moim zdaniem, kontynuacja badań dotyczących zdolności trawiennych wyselekcjonowanych gatunków mikroorganizmów żwacza jest celowa. Uzyskane wyniki mogą być użyte do opracowania metod poprawy wykorzystania składników pokarmowych zarówno przez przeżuwacze gospodarskie jak i dziko żyjące drogą doboru odpowiedniego składu mikrobiomu. W związku z powyższym, mogą, przyczynić się one do lepszego zarządzania zarówno populacją dziko żyjącą jak i utrzymywaną w warunkach zamkniętych.

Mój dotychczasowy dorobek naukowy obejmuje 98 prac naukowych, na które składa się: 31 oryginalnych prac twórczych, z których 27 opublikowano w czasopiśmie ujętych w bazie Journal Citation Reports (JCR) i 4 prace w czasopiśmie nieujętych

w bazie JCR, ponadto **1** monografia, oraz **66** komunikatów prezentowanych na konferencjach, w tym **37** na sympozjach o zasięgu międzynarodowym.

Przed uzyskaniem stopnia doktora opublikowałam **11** prac oryginalnych w tym **9** ujętych w bazie JCR oraz **35** doniesień naukowych, a po obronie doktoratu opublikowałam **20** prac oryginalnych w tym **18** ujętych w bazie JCR, **1** monografię oraz **31** doniesień konferencyjnych.

Łączna liczba punktów MNiSW dla całości dorobku naukowego wynosi: **495 pkt.** Sumaryczny Impact Factor według listy Journal Citation Reports (JCR), zgodnie z rokiem opublikowania wynosi: **29,226**. Liczba cytowań publikacji według bazy Web of Science (WoS) wynosi: **74** (na dzień 08.05.2017). Indeks Hirscha według bazy Web of Science (WoS) wynosi: **6** (na dzień 08.05.2017).

Renata Miltko