

Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce

Nauki przyrodnicze – fauna i flora



www.mlodzinaukowcy.com

Poznań 2022

Redakcja naukowa

dr Jędrzej Nyćkowiak

dr hab. Jacek Leśny, prof. UPWR

Wydawca

Młodzi Naukowcy

www.mlodzinaukowcy.com

wydawnictwo@mlodzinaukowcy.com

ISBN (całość 978-83-66743-63-2)

ISBN (wydanie online 978-83-66743-73-1)

ISBN (wydanie drukowane 978-83-66743-74-8)

Data wydania: maj 2022

Niniejsza pozycja jest monografią naukową. Jej rozdziały zostały wydrukowane zgodnie z przesłanymi tekstami po ich zaakceptowaniu przez recenzentów. Odpowiedzialność za zgodne z prawem wykorzystanie użytych materiałów ponoszą autorzy poszczególnych rozdziałów.

Spis treści

1. Mykotoksyny w chowie drobiu <i>Remigiusz Bagrowski, Dawid Ziobro, Dominika Krakowiak, Natalia Kanadys, Karol Gomółka, Justyna Batkowska</i>	7
2. Makroelementy - pierwiastki kluczowe dla drobiu <i>Remigiusz Bagrowski, Dominika Krakowiak, Natalia Kanadys, Karol Gomółka, Justyna Batkowska</i>	13
3. Wybrane metody zoofizjoterapeutyczne u psów <i>Aleksandra Garbiec</i>	19
4. Wybrane metody terapii z udziałem zwierząt <i>Aleksandra Garbiec, Joanna Kapustka, Paweł Niedzielski</i>	27
5. Leptospiroza u psów jako choroba wielowątkowa, patogeneza, objawy, leczenie i zapobieganie <i>Adrianna Michniewicz</i>	35
6. Rośliny domowe jako potencjalne niebezpieczeństwo dla kotów <i>Adrianna Michniewicz</i>	41
7. Mulardy <i>Dawid Ziobro, Paweł Kawałko, Kinga Rokicka, Damian Spustek, Remigiusz Bagrowski, Justyna Batkowska, Kamil Drabik</i>	47
8. Gatunki niszowe drobiu w Polsce <i>Dawid Ziobro, Paweł Kawałko, Kinga Rokicka, Remigiusz Bagrowski, Justyna Batkowska</i>	53
9. Zastosowanie związków pochodzenia naturalnego w namnażaniu borówki wysokiej (<i>Vaccinium corymbosum</i> L.) w kulturach <i>in vitro</i> <i>Weronika Bil, Monika Figiel-Kroczyńska, Arleta Kruczek, Marcelina Krupa-Małkiewicz</i>	59
10. Zastosowanie substancji pochodzenia naturalnego do rozmnażania kaktusów w kulturach <i>in vitro</i> <i>Michalina Kędzierska, Monika Figiel-Kroczyńska, Marcelina Krupa-Małkiewicz</i>	67
11. Zmienność strukturalnych elementów komórkowych <i>Porphyromonas gingivalis</i>: przegląd badań molekularnych <i>Strzelec Karolina, Dziedzic Agata, Uroczynska Marta, Aptekorz Małgorzata, Plakwicz Paweł, Chomyszyn-Gajewska Maria, Gawron Katarzyna</i>	73
12. Rola białek enzymatycznych <i>Porphyromonas gingivalis</i> w wirulencji bakterii <i>Strzelec Karolina, Uroczynska Marta, Dziedzic Agata, Botor Malwina, Łazarz-Bartyzel Katarzyna, Lesiak Marta, Gawron Katarzyna</i>	79
13. Bioróżnorodność ryzobiów w Południowej Afryce <i>Aleksandra Wichrowska, Joanna Banasiewicz</i>	85

Przedmowa

Szanowni Państwo, wydawnictwo „Młodzi Naukowcy” oddaje do rąk czytelnika kolekcję monografii naukowych dotyczących szerokiego spektrum nauk. Znajdują się tutaj pozycje dotyczące nauk medycznych i nauk o zdrowiu, nauk przyrodniczych, nauk technicznych i inżynierskich oraz szeroko pojętych nauk humanistycznych i społecznych.

W prezentowanych monografiach poruszany jest bardzo szeroki przekrój zagadnień, jednak każda z osobna składa się z kilkunastu rozdziałów, spójnych tematycznie, dających jednocześnie bardzo dobry przegląd tematyki naukowej jaką zajmują się studenci studiów doktoranckich lub ich najmłodsi absolwenci, którzy uzyskali już stopień doktora.

Czytelnikom życzymy wielu przemyśleń związanych z tematyką zaprezentowanych prac. Uważamy, że doktoranci i młodzi badacze z pasją i bardzo profesjonalnie podchodzą do swojej pracy, a doświadczenie jakie nabierają publikując prace w monografiach wydawnictwa „Młodzi Naukowcy”, pozwoli im udoskonalać swój warsztat pracy. Dzięki temu, z pewnością wielu autorów niniejszych prac, z czasem zaczną publikować prace naukowe w prestiżowych czasopismach. Przyczyni się to zarówno do rozwoju nauki, jak i każdego autora, budując jego potencjał naukowy i osobisty.

Redakcja

1. Mykotoksyny w chowie drobiu

Mycotoxins in poultry farming

Remigiusz Bagrowski⁽¹⁾, Dawid Ziobro⁽¹⁾, Dominika Krakowiak⁽¹⁾, Natalia Kanadys⁽¹⁾, Karol Gomółka⁽¹⁾, Justyna Batkowska⁽²⁾,

⁽¹⁾Studenckie Koło Naukowe Biologii, Hodowli i Użytkowania Drobiu, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

⁽²⁾Instytut Biologicznych Podstaw Produkcji Zwierzęcej, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
Opiekunowie SKN: dr hab. Justyna Batkowska prof. UPL, mgr inż. Kamil Drabik

Remigiusz Bagrowski: remik.b2@onet.pl

Słowa kluczowe: metabolity wtórne, grzyby pleśniowe, odporność ptaków, żywienie drobiu

Streszczenie

Celem pracy było przedstawienie powagi zagrożenia, jakie niosą za sobą mykotoksyny dla zdrowotności oraz wyników produkcyjnych drobiu. Mykotoksyny są metabolitami grzybów strzępkowych, o niskiej masie cząsteczkowej. Najczęściej występującymi mykotoksynami są: richoteceny m.in. deoksyniwalenol (DON), ochratoksyna A (OTA) Aflatoksyny (AF), toksyna T-2 oraz zearalenon. Wymienione substancje mogą wpływać negatywnie na organizm ptaków. Powstawanie mykotoksyn uzależnione jest od rozwoju grzybów pleśniowych je wytwarzających. Przy optymalnych warunkach do wzrostu pleśń wytwarza metabolity, którymi są właśnie mykotoksyny. Same metabolity nie zawsze są związkami jedynie ubocznymi. Mogą m.in. służyć do obrony grzybów przed innymi drobnoustrojami. Do czynników wpływających korzystnie na rozwój pleśni, a tym samym powstawanie mykotoksyn, należą temperatura, wilgotność, pora roku, miejsce uprawy, czas zbioru czy odpowiednie przechowywanie zebranych ziaren.

Wyniki obecnie prowadzonych badań świadczą o coraz większych stężeniach mykotoksyn w ziarnach zbóż. Toksyny w odpowiednich stężeniach wpływają negatywnie na organizm ptaków. Metabolity grzybów atakują układ pokarmowy, układ odpornościowy obniżając jego aktywność, powodują również schorzenia niektórych narządów m.in. wątroby, śledziony, jajnika oraz nerek.

1. Wstęp

Uzyskanie wysokich efektów produkcyjnych jest głównym celem producentów drobiu. Czynnikiem bardzo istotnie wpływającym na efektywność produkcji drobiarskiej może być dobrej jakości pasza. Obecne zmiany klimatu, ze względu na duże wahania temperatur oraz wilgotności, stwarzają niekorzystne warunki uprawy i zbioru roślin paszowych, co może przyczyniać się do porażenia plonów grzybami strzępkowymi i w konsekwencji do zanieczyszczenia paszy mykotoksynami. Ptaki pobierające pasze porażoną metabolitami grzybów strzępkowych mogą cechować się obniżoną zdrowotnością oraz produktywnością. Dlatego też należy przyrzeć się bliżej źródłom i rodzajom mykotoksyn oraz zagrożeniom wynikającym ze spożycia ich przez ptaki. Ponadto dostępna literatura sugeruje, że mogą one wpływać negatywnie nie tylko na drób, ale również pośrednio na zdrowie konsumentów.

2. Źródła i rodzaje mykotoksyn

Określenie „mykotoksyny” odnosi się do toksycznych metabolitów wtórnych wytwarzanych przez niektóre grzyby strzępkowe (Anjorin i in. 2013). Mykotoksyny to niskocząsteczkowe (< 1,5 kDa) związki wytwarzane jako produkt uboczny w procesach metabolicznych różnych rodzajów grzybów lub jako produkt służący w celach obronnych wykazujący działanie toksyczne i mający właściwości mutagenne lub teratogenne (Mruczyk i Jeszka, 2013). Są one grupą ok. 300 metabolitów wtórnych, z których zaledwie 20 jest dobrze poznanych, a wytwarzane są głównie przez pleśnie z rodzaju *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Fusarium* sp. i *Alternaria* sp.

Najbardziej znane mykotoksyny to aflatoksyny, ochratoksyna A, deoksynivalenol, patulina, zearalenon oraz fumonizyna. W większości miejscem ich występowania są zboża i owoce (Miśniakiewicz 2008). Ze względu na swoją toksyczność mykotoksyny mogą prowadzić do zanieczyszczenia szczególnie surowców roślinnych, już podczas ich uprawy, a tym samym być zagrożeniem w dalszych procesach produkcyjnych, jak również powodować psucie się produktów żywnościowych oraz prowadzić do ich wysokiej toksyczności (Ascota i in. 2011). Rozwój pleśni oraz skażenie produktu żywnościowego może nastąpić już w trakcie wegetacji rośliny, podczas produkcji bądź magazynowania (Anjorin i in. 2013). Toksyczne metabolity wtórne grzybów wywołują patologiczne zmiany zarówno u ludzi jak i zwierząt. Mogą być przyczyną ostrego zatrucia o różnym przebiegu a niekiedy doprowadzić nawet do zgonu. Zatrucia są często wywoływane już niewielkimi dawkami mykotoksyn, ale dostarczającymi do organizmu przez dłuższy czas (Miśniakiewicz 2008).

Obecność mykotoksyn wpływa na właściwości organoleptyczne i wartość odżywczą pasz. Działanie mykotoksyn na organizmy zwierząt jest silnie zależne od spożytej ilości tych substancji, rodzajów pobranych mykotoksyn oraz czasu ekspozycji na nie. Ich obecność w ciele zwierząt może powodować różne efekty biologiczne m.in.: rakotwórcze, neurotoksyczne, mutagenne, hepatotoksyczne, immunosupresyjne, nefrotoksyczne czy teratogenne.

Aflatoksyny są jedną z najbardziej rozpowszechnionych grup mykotoksyn występujących w produkcjach zwierzęcych. Wynika to z tego, iż są one spotykane w ziarnach zbóż wykorzystywanych do produkcji pasz dla zwierząt gospodarskich. Kluczowy jest tutaj też fakt, że poza szkodliwym działaniem na organizm zwierzęcia metabolity te mogą wtórnie gromadzić się w jajach oraz mięsie, co może skutkować przedostaniem się toksyn z produktów spożywczych pochodzenia zwierzęcego do organizmu człowieka wraz ze spożywanym pokarmem powodując zagrożenie jego życia (Czerwiecki 1997).

Kolejną grupą mykotoksyn są ochratoksyny A. Mogą występować m.in. w ziarnach zbóż, kawie, piwie czy produktach mleczarskich. Pojawiają się zazwyczaj w produktach źle wysuszonych oraz nieprawidłowo składowanych (Blank i in. 2003). Oddziałują szczególnie źle na nerki oraz układ krwionośny. Jednak ich negatywny wpływ obserwowany jest również w przypadku układu kostnego, gdzie prowadzą do zahamowania procesu tworzenia nowej tkanki kostnej. Zmiany te powodują tym samym zmniejszenie wytrzymałości kości i tym samym możliwości utrzymania ciężaru ciała, co jest szczególnie problematyczne w przypadku odchowu kurcząt brojlerów charakteryzujących się bardzo szybkimi przyrostami masy ciała (Elissalde i in. 1994; Sauvante i in. 1998).

Trichoteceny produkowane głównie przez grzyby *Fusarium sp.* to kolejna grupa mykotoksyn występująca w głównej mierze w nasionach zbóż, a tym samym również w produktach z nich pochodzących. Największą koncentrację odnotowuje się w ziarnach kukurydzy oraz pszenicy, szczególnie tej pochodzącej z klimatu umiarkowanego bądź subtropikalnego. Według Rodricks i in (1977) obecność 3 mg/kg paszy toksyny T-2 należącej do tej grupy, prowadzi do obniżenia nieśności oraz atrofii jajowodów u gęsi i kur niosek. Dawka 1-16 mg/kg paszy otrzymywana przez zwierzęta przez dłuższy czas może prowadzić do zmian w układzie nerwowym kurcząt oraz powstawania brodawkowatych narośli w dziobie ptaków.

Do grupy trichotecenen należy również eoksynivalenol występujący w niemalże wszystkich rodzajach ziaren zbóż. Ciekawy jest jednak fakt, że może on gromadzić się równocześnie z inną mykotoksyną, zearalenonem (Chełkowski 2012). Skażenie środków żywienia zwierząt mykotoksynami może implikować zmniejszone pobieranie paszy oraz spadek wydajności w produkcji.

3. Zagrożenia

Grzyby pleśniowe znajdują się w klatkach, pokarmie, odchodach i piórach ptaków. Niektóre gatunki pleśni należące do rodzajów *Fusarium*, *Aspergillus* oraz *Penicillium* produkują mykotoksyny o działaniu toksycznym, mutagennym, rakotwórczym, teratogennym oraz estrogenym (Szablewski i Cegielska – Radziejewska 2015). W większości przypadków mykotoksyny do organizmów zwierząt dostają się wraz ze skażoną paszą. Jeżeli dostaną się tam w małych ilościach to mogą być wydalane z moczem. W przypadku dużych ilości dochodzi do nagromadzenia się ich m. in. w nerkach, mięśniach i wątrobie. Duże ilości metabolitów w organizmie zwierzęcia są niebezpieczne również ze

względu na to, że mogą przedostać się do produktów pochodzenia zwierzęcego, np. mleka u krów czy jaj u drobiu. W konsekwencji niesie to za sobą ryzyko dalszego transferu mykotoksyn do organizmu człowieka i stanowi zagrożenie dla jego zdrowia działając alergizująco (Kapturowska i in. 2010; Świdarska-Kiełbik i in. 2010; Chełkowski 2012). Istotne jest przestrzeganie dopuszczalnych norm mykotoksyn w ziarnach zbóż przeznaczonych na pasze (Rozporządzenie Komisji (WE) NR 856/2005) np. ochratoksyna A- 0,25 mg/kg, alfatoksyna B1- 0,02 mg/kg, zearalenon (w kukurydzy) - 2 mg/kg, dezoksynivalenol (w kukurydzy) - 8 mg/kg.

Najbardziej szkodliwymi dla człowieka mykotoksynami są alfatoksyny, ochratoksyna A, trichoteceny, zearalenon oraz fumonizyny. Spożycie mykotoksyn powoduje rozwój mikotoksykoz, które działają szkodliwie na narządy wewnętrzne i skórę, a z organizmu gospodarza nie jest możliwe wyizolowanie patogennego grzyba. Natomiast w przypadku mikozyzy grzyb wnika i rozwija się w komórkach gospodarza, przykładem jest grzybica płuc oraz grzybica skóry. W szkodliwy sposób działają również konidia i strzępki pleśni, które powodują alergię (Ławniczek-Wałczyk i in. 2014; Wróbel 2014). Człowiek na działanie mykotoksyn narażony jest w dwojaki sposób: bezpośrednio poprzez spożycie produktów żywnościowych pochodzenia roślinnego zanieczyszczonych mykotoksynami, a także pośrednio w skutek spożycia produktów pochodzenia zwierzęcego, pozyskanych od zwierząt spożywających skażoną paszę (Galvano i in. 2005; Rozewicz 2019).

U osób z obniżoną odpornością mykotoksyny mogą powodować problemy z układem oddechowym i pokarmowym. W zależności od czasu i dawki oddziaływania mykotoksyn mogą wywoływać stan przewlekły lub ostry, skutkujący zaburzeniami w metabolizmie białek, tłuszczów i węglowodanów. Również synteza kwasów nukleinowych nie jest przeprowadzana w prawidłowy sposób, czego następstwem są uszkodzenia wątroby, nerek oraz rozwój chorób nowotworowych (Pokrzywa 2007; Barabasz i Pikulicka 2017). U ludzi mykotoksyny mogą działać: dermatotoksycznie, estrogenie, hepatotoksycznie, immunosupresyjnie, kancerogennie, kardiotoxycznie, mutagennie, nefratoksycznie, neurotoksycznie, pulmotoksycznie, teratogennie, mykohormonalnie czy immunotoksycznie. U płodów, których matki spożywają zanieczyszczoną żywność występują zaburzenia rozwojowe kręgosłupa i mózgu. Najczęściej występującymi wadami są bezmózgowie oraz rozszczep kręgosłupa (Barabasz i Pikulicka 2017; Głinski 2019).

4. Wpływ na wyniki produkcyjne i zdrowotność ptaków

Wymienione poniżej mykotoksyny negatywnie oddziałują na organizmy zwierząt przez zmniejszenie przyrostów, czy zaburzenia metabolizmu. Przekłada się to na zmniejszone wyniki produkcyjne i pogorszenie stanu zdrowia, co w wielkotowarowych fermach może przekładać się na znaczne straty finansowe.

W badaniu Huff i in. (1986) nad indywidualnym i połączonym działaniem aflatoksyny i deoksynivalenolu u kurcząt brojlerów wykazano, że podawanie samej aflatoksyny 2,5 µg/g paszy/na dzień (z zapewnieniem paszy i wody *ad libitum*) przez 3 tygodnie od wyklucia może powodować spadek masy ciała o 16,7% względem grupy kontrolnej, zwiększenie masy nerek, śledziony, wątroby, jak również zaburzenia poziomu frakcji cholesterolu i trójglicerydów w osoczu krwi, spadek poziomu białka albuminy i fosforu w surowicy krwi oraz znaczące zmniejszenie aktywności dehydrogenazy mleczanowej (LDH). W przypadku podawania samego deoksynivalenolu 16 µg/g paszy/dzień przez 3 tygodnie od wyklucia zauważono ograniczone tempo wzrostu o 8,8% względem grupy kontrolnej, a na poziomie narządowym zwiększenie masy żołądka i niedokrwistość, która może być objawem zaburzenia produkcji krwinek w szpiku kostnym. Wykazano również spadek aktywności dehydrogenazy mleczanowej oraz zmniejszoną zawartość trójglicerydów w surowicy. Aflatoksyny i deoksynivalenol w kombinacji 2,5 µg i 16 µg/g paszy/dzień powodowały wzrost pobrania paszy przy jednoczesnym zmniejszeniu tempa wzrostu i masy ciała o 22 % względem grupy kontrolnej. Zwiększyła się także masa żołądka gruczołowego, śledziony, nerek, następowała niedokrwistość, skutkiem były również niskie poziomy białka, albuminy i kwasu moczowego w surowicy (co jest objawem niewydolności pracy wątroby), jak również cholesterolu (zaburzenie neurologiczne i gospodarki hormonalnej) i trójglicerydów (zaburzenia odkładania tkanki tłuszczowej i gospodarki energetycznej) i wapnia (powoduje napady duszności, problemy z przełykaniem, wzrasta również ryzyko złamań kości). Już niewielkie dawki tych mykotoksyn powodowały duże

ograniczenia przyrostów ptaków oraz osłabienie zdrowia i kondycji brojlerów. Połączone działanie aflatoksyn (2,5 µg/g paszy/dzień) i deoksywalenolu (16 µg/g paszy/dzień) generowało największe straty ekonomiczne, poprzez znaczące ograniczenie wzrostu oraz podniesienie wskaźnika śmiertelności, w porównaniu do pozostałych analizowanych mykotoksyn.

Zearalenon może powodować zmiany w układzie rozrodczym zwierząt wiążąc się z receptorami estrogenowymi. W badaniu przeprowadzonym przez Allen i in. (1981) został wzięty pod uwagę wpływ zearalenonu na reprodukcję kur rasy White Leghorn oraz New Hampshire. Przez 8 tygodni kury inseminowano co tydzień 0,05 ml nasienia od samców żywionych paszą zawierającą 800 mg zearalenonu/kg paszy. Zauważono znaczny spadek poziomu cholesterolu, fosforu i fosfatazy alkalicznej w surowicy samców, których pasza zawierała toksynę. Największą śmiertelność zarodków zauważono w jajach zapładnianych nasieniem samców, którym podawano zearalenon w dawce 100 mg/kg paszy, nieco niższa była śmiertelność zarodków przy dawce 800 mg/kg paszy.

Niemiec i in. (2005) badali wpływ ochratoksyny na stada reprodukcyjne wybranych linii tj. Cobb, Hubbard, i Ross. Ptaki w grupie badanej żywione były paszą zawierającą ochratoksyny w ilości 0,5 mg/kg paszy. Jaja ptaków z grupy badanej przeznaczono do wylęgu. Dodatek mykotoksyny nie wpłynął na wylęgowość ani na ilość zapłodnionych jaj w porównaniu do grupy kontrolnej. Dokonano uboju kurcząt po 49 dniach życia. Wyniki z analizy potomstwa rodziców żywionych skażoną paszą były znacznie niższe pod względem masy ciała, wydajności tuszy, uzyskanego mięsa z tuszy, wykorzystania paszy, średnio 0,1 kg paszy mniej na 1 kg przyrostu masy ciała, niż w przypadku kurcząt pochodzących z grupy kontrolnej.

Jak wykazali Huff i Doerr (1981) obecność samej aflatoksyny i ochratoksyny nieznacznie obniżała przyrosty broilerów, natomiast w przypadku wystąpienia obu mykotoksyn jednocześnie dochodziło do znacznego obniżenia przyrostów ptaków. Co więcej oba z wymienionych metabolitów grzybów znacząco zwiększały śmiertelność, a w 3 tyg. życia kurcząt podawanie do paszy aflatoksyny zwiększyło jej pobieranie w przeciwieństwie do ochratoksyny. Podobnie w badaniach Tsiouris i in. (2021) ptaki, którym podawano paszę zawierającą mykotoksyny uzyskiwały znacząco gorsze wyniki produkcyjne oraz gorzej wykorzystywały podawaną paszę. Ponadto wykazano, że ptaki żywione paszą zawierającą mykotoksyny w badaniu surowicy krwi wykazywały dużo gorsze parametry wątrobowe. Co ciekawe wyniki te wykazywały możliwość zwalczania negatywnych skutków mykotoksyn poprzez podawanie specjalistycznych wieloskładnikowych komponentów, które dodatkowo zmniejszały liczebność bakterii *E. coli* w jelitach, jak również ograniczały wzrost odczynu treści jelita czczego i krętego będących sprzyjającym środowiskiem do rozwoju patogenów jelitowych.

5. Podsumowanie

Mykotoksyny są stosunkowo poważnym problemem w produkcji drobiarskiej z uwagi na ich możliwy negatywny wpływ na zdrowotność ptaków. Ponadto obecność mykotoksyn w paszy może być przyczyną spadku produktywności ptaków (osłabienie przyrostów, spadek masy ciała, obniżenie wydajności rzeźnej). Warto zaznaczyć również, że surowce pozyskiwane od drobiu żywionego paszą skażoną mykotoksynami mogą być poważnym zagrożeniem dla konsumentów. Dostępne dane literaturowe sugerują bowiem, że mogą one gromadzić się w mięsie ptaków pobierających skażoną paszę. Spadek zdrowotności, a co za tym idzie produktywności ptaków spowodowany obecnością mykotoksyn może przekładać się w znacznym stopniu na opłacalność produkcji drobiarskiej, dlatego hodowcy drobiu powinni zwracać szczególną uwagę na kontrolę jakości pasz w kierunku występowania w nich substancji szkodliwych.

6. Literatura

- Acosta AY, Rodrigues I, Hofstette U i in. (2011) Mycotoxins in silages: occurrence and prevention. Iranian Journal of Applied Animal Science 1(1): 1-10.
- Allen NK, Mirocha CJ, Aakhus-Allen S i in. (1981) Effect of dietary zearalenone on reproduction of chickens. Poultry Science 60(6): 1165-1174.

- Anjorin TS, Salako EA, Makun HA (2013) Control of toxigenic fungi and mycotoxins with phytochemicals: potentials and challenges. [In:] Makun H (ed.) Mycotoxin and Food Safety in Developing Countries7: 513-514.
- Barabasz W, Pikulicka A, (2017) Mykotoksyny–zagrożenie dla zdrowia ludzi i zwierząt. Część 1. Mykotoksyny–charakterystyka, występowanie, toksyczność dla organizmów. *Journal of Health Study and Medicine* 3: 65-108.
- Chełkowski J (2012) Mikotoksyny, grzyby toksynotwórcze i mikotoksykozy. On line www.cropnet.pl/mycotoxin, dostęp: 31.12.2021.
- Blank R, Rolfs JP, Sudekum K et al.(2003) Effects of chronic ingestion of ochratoxin A on blood vessels and excretion of the mycotoxin in sheep. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 6899-6905.
- Czerwiecki L (1997) Mikotoksyny w żywności jako czynnik zagrożenia zdrowotnego. *Żywność, Żywnienie a Zdrowie* 4(06): 292-300.
- Elissalde MH, Ziprin RL, Huff WE i in. (1994) Effect of ochratoxin A on Salmonella challenged broilers chickens. *Poultry Science* 73: 1241-1248.
- Galvano F, Ritieni A, Piva G i in. (2005) Mycotoxins in the human food chain. *The Mycotoxin Blue Book* 1:187-224.
- Głinski Z (2019) Mikotoksykoza fumonizynowa zwierząt i człowieka. *Życie Weterynaryjne* 94(10): 673-677.
- Huff WE, Doerr JA (1981) Synergism between aflatoxin and ochratoxin A in broiler chickens. *Poultry Science* 60(3): 550-555.
- Huff WE, Kubena LF, Harvey RB i in. (1986) Individual and combined effects of aflatoxin and deoxynivalenol (DON, vomitoxin) in broiler chickens. *Poultry Science* 65(7): 1291-1298.
- Kapturowska AU, Zielińska KJ, Stecka K i in. (2010) Ocena skażenia pasz ochratoksyną a i metody ich dekontaminacji. *Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering* 55(3): 156-163.
- Ławniczek-Wałczyk A, Górny RL, Gołofit-Szymczak M i in. (2014) Zagrożenia biologiczne związane z produkcją zwierzęcą. *Bezpieczeństwo Pracy: Nauka i Praktyka* (4): 14-17.
- Pokrzywa P, Cieslik E, Topolska K, (2007) Ocena zawartości mikotoksyn w wybranych produktach spożywczych. *Żywność Nauka Technologia Jakość*, 14(3).
- Rozewicz M (2019) Produkcja ziarna pszenżyta w Polsce oraz jego wartość paszowa i wykorzystanie w żywieniu drobiu. *Wiadomości Zootechniczne* 57(4): 121-132.
- Miśniakiewicz M (2008) Biologiczne zanieczyszczenia żywności. Mikotoksyny. *Zeszyty Naukowe Uniwersytetu Ekonomicznego w Krakowie* (781): 113-129.
- Mruczyk K, Jeszka J (2013) Ocena poziomu zanieczyszczeń mikotoksynami wybranych produktów spożywczych z terenu województwa lubuskiego. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna* 46(1): 89-95.
- Niemiec J, Stępińska M, Riedel J i in. (2005) The effect of feeding ochratoxin A-contaminated diet to broiler breeding flocks on the chickens performance. *Journal of Animal and Feed Sciences* 14: 471-474.
- Rodricks JV, Hesseltine CW, Mehlman MA (1977) Mycotoxins in human and animal health, [In:] *Proceedings of a Conference at University of Maryland, October 4-8, 1976, Pathotox Publ. Inc., Peoria, Illinois.*
- Rozporządzenie Komisji (WE) NR 856/2005 z dnia 6 czerwca 2005 r. zmieniające Rozporządzenie (WE) nr 466/2001 w odniesieniu do toksyn Fusarium. *Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej* 143/3: 3–8.
- Sauvant C, Silbernagl S, Gekle M (1998) Exposure to ochratoxin A impairs organic anion transport in proximal tubule derived opossum kidney cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 287: 13-20.
- Świdarska-Kiełbik S, Krakowiak A, Wiszniewska i in. (2010) Zagrożenia zdrowotne związane z zawodową ekspozycją na ptaki. *Medycyna Pracy* 61: 213-222.
- Szablewski T, Cegielska-Radziejewska R (2015) Charakterystyka mikroflory grzybowej izolowanej z treści jaj konsumpcyjnych. *Aparatura Badawcza i Dydaktyczna* 20(1): 8-11.

- Tsiouris V, Tassis P, Raj J i in. (2021) Investigation of a novel multicomponent mycotoxin detoxifying agent in amelioration of mycotoxicosis induced by aflatoxin-b1 and ochratoxin a in broiler chicks. *Toxins* 13(6): 367.
- Wróbel B (2014) Zagrożenia zwierząt i ludzi toksynami grzybów pleśniowych zawartych w paszach i żywności. *Woda-Środowisko-Obszary Wiejskie* 14(3): 159-176.

2. Makroelementy - pierwiastki kluczowe dla drobiu

Macroelements - crucial minerals for poultry

Remigiusz Bagrowski⁽¹⁾, Dominika Krakowiak⁽¹⁾, Natalia Kanadys⁽¹⁾, Karol Gomółka⁽¹⁾, Justyna Batkowska⁽²⁾,

⁽¹⁾ Studenckie Koło Naukowe Biologii, Hodowli i Użytkowania Drobiu, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

⁽²⁾ Instytut Biologicznych Podstaw Produkcji Zwierzęcej, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
Opiekunowie SKN: dr hab. Justyna Batkowska prof. UPL, dr inż. Kamil Drabik

Remigiusz Bagrowski: remik.b2@onet.pl

Słowa kluczowe: gospodarka mineralna, niedobory mineralne, osteoporoza, składniki mineralne

Streszczenie

Celem pracy było przybliżenie roli poszczególnych makroskładników (wapnia, fosforu, magnezu, sodu, potasu i chloru) w kształtowaniu statusu fizjologicznego oraz produktywności drobiu. Scharakteryzowano biologiczne role wymienionych pierwiastków, jak również specyficzne dla drobiu skutki ich niedoboru i/lub nadmiaru w diecie, wskazując konieczność doboru dawki w zależności od typu użytkowego, produktywności czy fazy wzrostu ptaków, ze szczególnym uwzględnieniem ich zakresu tolerancji na suplementowane składniki mineralne, a także najczęstszych przyczyn powstawania braków makroskładników zarówno w kontekście składu paszy, jak i fizjologicznej odpowiedzi organizmu.

1. Wstęp

Czynniki środowiskowe, w tym także żywieniowe, podobnie jak uwarunkowania genetyczne i hormonalne, mają istotny wpływ na procesy wzrostu i rozwoju układu kostnego, których prawidłowy przebieg determinuje rozwój i fizjologiczne funkcje całego organizmu zarówno ssaków, jak i ptaków, co przekłada się także bezpośrednio na produktywność zwierząt oraz jakość pozyskiwanych surowców. Do żywieniowych uwarunkowań zdrowotności i produktywności drobiu, oprócz pokrycia podstawowego zapotrzebowania na substancje odżywcze, wpisuje się podaż składników mineralnych, które zarówno w stanie wolnym oraz jako różnorodne składniki związków chemicznych wchodzi w skład komórek i tkanek organizmu, są budulcem i katalizatorami wielu reakcji biochemicznych, a także nieodzownymi składowymi procesów wzrostu, rozwoju, metabolizmu i adaptacji do środowiska. Do makroelementów zaliczamy wapń (Ca), fosfor (P), magnez (Mg), sód (Na), potas (K) i chlor (Cl). Odpowiedzialność za ich dostarczenie do organizmów ptaków zaliczanych do drobiu spada na hodowcę, zatem niezbędna jest wiedza odnośnie możliwości podaży ww. pierwiastków, jak również skutków ich niedoborów.

Celem pracy było przybliżenie roli poszczególnych makroskładników w kształtowaniu statusu fizjologicznego oraz produktywności drobiu.

2. Wapń

Wapń jest jednym z najistotniejszych składników mineralnych w żywieniu drobiu. Jest niezbędny do prawidłowego krzepnięcia krwi (stymuluje uwalnianie tromboplastyny z płytek krwi), jest aktywatorem kilku enzymów (m.in. lipazy trzustkowej, fosfatazy kwaśnej, cholinoesterazy), przez co stymuluje skurcze mięśni (wspomaga zachowanie prawidłowego napięcia mięśniowego i rytmu serca), a także reguluje przekazywanie międzykomórkowych impulsów nerwowych (kontrola sekrecji acetylocholiny). Wapń, w połączeniu z fosfolipidami, odgrywa kluczową rolę w regulacji przepuszczalności błon komórkowych, a w konsekwencji uczestniczy w pobieraniu składników odżywczych przez komórkę, jest także niezbędny do wchłaniania witaminy B12 z przewodu pokarmowego. Największy udział wapnia, jako elementu budulcowego, bo do 99%, skoncentrowany

jest w szkielecie zwierząt, który ma za zadanie utrzymywać postawę oraz ochraniać narządy i tkanki wewnętrzne. Stanowi on także rusztowanie dla mięśni (Foutz i in. 2007)

Wpływ składników mineralnych na produktywność drobiu należy rozpatrywać dwuaspektowo w zależności od kierunku użytkowania (mięsnego lub nieśnego). U ptaków typu mięsnego, z uwagi na bardzo szybkie tempo wzrostu oraz konieczność zapewnienia właściwej wytrzymałości kości, wszelkie zaburzenia poziomu wapnia są szczególnie widoczne. Skutkiem zaburzeń metabolicznych gospodarki wapniowo-fosforanowej oraz przyswajania witaminy D₃ może być krzywica (Pettifor 2004). Jej wynikiem jest nieprawidłowy rozwój kręgosłupa, przez co ptaki nie są w stanie utrzymać się na nogach, a kości ich kończyn stają się łamliwe. Także nieprawidłowy poziom witaminy D₃ sprzyja zaburzeniom odkładania wapnia w kościach. Już suplementacja w niewielkiej ilości (5mg/kg) powoduje odkładanie dodatkowych ilości wapnia w porównaniu do ptaków niesuplementowanych (Newman i Leeson 1999).

Badając wpływ źródła i poziomu wapnia m.in. na wskaźniki produkcyjne kurcząt brojlerów i morfologię ich przewodu pokarmowego (Xing i in. 2020) jako źródła wapnia użyto muszli przegrzebków do produkcji aktywnego fosforanu dwuwapniowego (ADP), oraz sproszkowanych muszli oczyszczonych kwasem octowym (SCAC) oraz wodą destylowaną (SS). Kurczęta brojlery otrzymywały dietę podstawową uzupełnioną 0,95% lub 1,05% dodatku. Najbardziej efektywne okazało się podawanie fosforanu dwuwapniowego z muszli (ADP) w ilości 1,05%. Stwierdzono większy przyrost masy ciała, większy udział mięśni nóg w tuszkach oraz mniejsze odfuszczenie tuszek. Forma dodatku wpłynęła także stymulująco na rozwój przewodu pokarmowego (długość, masa), a także narządów odpowiedzialnych za odporność organizmu (grasica, śledziona, bursa Fabrycjusza).

Wapń to dominujący pierwiastek w strukturze skorupy jaja, dlatego kluczowym dla zdrowia i produktywności niosek jest utrzymanie jego właściwego poziomu w diecie. U drobiu nieśnego schorzenia kości występują głównie w wyniku selekcji ptaków w kierunku poprawy nieśności, co wymaga zwiększenia podaży wapnia z kości w celu wytworzenia skorupy. Szacuje się, że od 20 do 40% wapnia znajdującego się w skorupach jaj może pochodzić z tego źródła (Mueller i in. 1964). Jeśli poziom Ca²⁺ w paszy jest niewystarczający, dochodzi do wystąpienia niedoborów i uruchomienia mechanizmów kompensacyjnych, co prowadzi do strukturalnej demineralizacji kości, a nasilenie tego procesu do osteoporozy. Schorzenie to charakteryzuje się postępującym ubytkiem masy kostnej, osłabieniem struktury tkanki i zwiększoną podatnością na złamania, problem dotyczy głównie chowu ptaków o wysokiej wydajności. Złamania i deformacje szkieletu powstają już w pierwszym okresie nieśności i mogą się pogłębiać. Krytyczna jest końcowa faza nieśności, gdy ptaki są już mocno wyeksploatowane, więc ich chwywanie czy przemieszczanie może prowadzić do wzrostu liczby złamań (Webster 2004). Interakcja Ca²⁺ i estrogenów ma duży wpływ na pojawianie się osteoporozy u kur w późnym okresie produkcji. Wraz z wiekiem zmniejsza się ilość wydzielanego estrogenów odpowiedzialnych za procesy kościotwórcze, co powoduje zachwianie tej równowagi prowadząc do ciągłej resorpcji jonów wapniowych z kości i rozwój osteoporozy. Pod koniec okresu produkcyjnego ponad 95% kur może wykazywać złamania lub pęknięcia kości (Whitehead 2002).

Mayeda i Ernst (2008) wskazują, że stosowanie dodatku wapnia do paszy w okresie przednieśnym może poprawić jakość (m.in. gęstość) kości ptaków podczas całego chowu. Wpływ może mieć też sposób utrzymania kur umożliwiający im większą motorykę, która zapobiega resorpcji składników mineralnych podczas produkcji nieśnej (Casey-Trott i in. 2017). Araujo i in. (2011) badali wpływ różnych poziomów wapnia oraz różnej gramatury kredy pastewnej w diecie niosek kur na ich produktywność. Wykazali oni interakcję obu czynników. Wykorzystano 3 poziomy wapnia (3,92, 4,02 i 4,12%) i 2 wielkości cząstek kredy (0,60 i 1,00 mm). Najbardziej efektywny okazała się dawka 4,12% wapnia w formie gruboziarnistej, przyczynił się on do poprawy nieśności bez wpływu na jakość kości i jaj. Co ciekawe, obserwowano zmianę behawioru ptaków zarówno w zależności od dawki, jaki i formy dodatku, przekładało się to na ilość i częstotliwość pobieranej paszy, co sugeruje, że poziom wapnia w diecie pozostaje w interakcji z dobowym cyklem żerowania.

3. Fosfor

Fosfor jest niezbędnym składnikiem fosfolipidów, kwasów nukleinowych, fosfoprotein (kazeina), wysokoenergetycznych estrów fosforanowych (ATP), fosforanów heksozy, fosforanu kreatyny i kilku kluczowych enzymów. Odgrywa on główną rolę w metabolizmie komórkowym. Fosforany nieorganiczne służą jako bufony regulujące równowagę kwasowo-zasadową płynów ustrojowych (Mongin 1981).

Niedobór fosforu w żywieniu drobiu negatywnie wpływa na metabolizm ptaków, ale i produktywności ptaków, które najlepiej przyswajają fosfor w postaci nieorganicznych fosforanów wapniowych. Jednak w paszach roślinnych występuje on najczęściej w postaci niestrawnych fitynianów (54-83% ogólnej zawartości P). Fityniany, sole kwasu fitynowego, są podstawową rezerwą fosforanową nasion zbóż, roślin oleistych oraz śrut poekstrakcyjnych, czyli podstawowych składników mieszanek paszowych dla drobiu. Głównym efektem antyżywniowego ich działania jest uniemożliwienie ptakom przyswajania fosforu z tych związków z powodu braku enzymu fitazy, hydrolizującego kompleksy fitynianowe. Dodatkowo fityniany wiążą niektóre z mikro- i makroskładników znajdujących się w mieszankach (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Mo^{2+} , Co^{2+}) i zmniejszają ich wykorzystanie przez zwierzęta (Czech 2007). W związku z tym konieczne jest podawanie fosforu w połączeniach nieorganicznych, gdyż jest on najlepiej przyswajalny w formie fosforanów jedno-, dwu- lub trójwapniowych. Jednak w sytuacji suplementacji paszy fosforem nieorganicznym, fosfor fitynianowy jest w większości wydalany i przyczynia się do zanieczyszczenia środowiska. Zwiększenie wykorzystania fosforu fitynianowego, ograniczenie ilości fosforu nieorganicznego dodawanego do paszy i wydalanego przez ptaki można osiągnąć poprzez dodatek do paszy fitazy mikrobiologicznej (Puzio, 1999).

Pierwiastek ten należy do związków mineralnych o największym znaczeniu spośród wchodzących w skład mineralny jaja. Stwierdzono zależność pomiędzy wiekiem stada, a obniżeniem jakości skorup jaj, głównie ich wytrzymałości, co może być spowodowane spadkiem przyswajalności wapnia i fosforu, a także zmianami strukturalnymi skorup (Decuyper i Baerdemaeker, 2006).

4. Magnez

Magnez, niezbędny składnik m.in. kości i chrząstek, jest także aktywatorem kluczowych systemów enzymatycznych, ATPaz mięśniowych oraz enzymów (cholinoesterazy, fosfatazy alkalicznej, enolazy, dehydrogenazy izocytrynowej, arginazy, deoksyrybonukleazy i glutaminazy). Podobnie jak wapń stymuluje kurczliwość mięśni i nerwów, bierze udział w regulacji wewnątrzkomórkowej równowagi kwasowo-zasadowej i odgrywa ważną rolę w metabolizmie węglowodanów, białek i lipidów. Niedobór Mg^{2+} u rosnącego drobiu objawia się spowolnieniem wzrostu, słabym upierzeniem, zmniejszeniem napięcia mięśniowego, brakiem koordynacji, drobnymi, wyczuwalnymi palpacyjnie drgawkami, atakami konwulsji, śpiączką, a nawet śmiercią. U kur nieśnych objawy to przede wszystkim spadek nieśności, zmniejszone pobranie paszy, drżenia nerwowe i napady drgawek (Shastak i Rodehutsord 2015).

Wykazano, że suplementacja magnezu w celu niwelacji wpływu negatywnych skutków stresu cieplnego (m.in. wzrost poziomu triacylogliceroli i cholesterolu w surowicy) stanowi realny sposób ograniczenia strat w produktywności ptaków (przyrosty masy ciała, wykorzystanie paszy), tu przepiórek japońskich (Sahin i in. 2005). Dzięki właściwościom antyoksydacyjnym Mg^{2+} może być także stosowany do poprawy i stabilizacji jakości mięsa kurcząt (Liu i in. 2007). Istnieje też antagonistyczna zależność pomiędzy Ca^{2+} i Mg^{2+} w odniesieniu do integralności szkieletu i jakości skorupy jaj u kur niosek. Co ciekawe zawartość składników mineralnych w tym magnezu w skorupie jaja może zależeć od jej barwy. W skorupkach jaj brązowych stwierdzono istotnie najwyższe zawartości wapnia i magnezu, przy niższych wartościach odnotowanych dla skorup jaj białych i seledynowych (Drabik i in. 2021).

Magnez jest łatwo wchłaniany przez przewód pokarmowy i, podobnie jak w przypadku wapnia i fosforu, jego część zawarta w surowcach roślinnych może występować w postaci fitynianów (sól Ca^{2+} lub Mg^{2+} kwasu fitynowego). Większość surowców stosowanych w mieszankach paszowych dla drobiu zawiera Mg^{2+} w ilości, która sprawia, że jego niedobór w warunkach praktycznych jest

mało prawdopodobny. W związku z tym uzupełnianie Mg^{2+} w dietach dla drobiu nie wydaje się być konieczne.

5. Sód, potas, chlor

Sód i chlor w organizmie występują głównie w płynach ustrojowych, a potas w komórkach. Pełnią one istotną funkcję w kontrolowaniu ciśnienia osmotycznego i równowagi kwasowo-zasadowej. Odgrywają również ważną rolę w metabolizmie wody.

Sód jest głównym jonem płynów pozakomórkowych; jego jony stanowią 93% jonów zasadowych znajdujących się w krwiobiegu. Chociaż główna rola sodu u zwierząt związana jest z regulacją ciśnienia osmotycznego i utrzymaniem równowagi kwasowo-zasadowej, sód ma również wpływ na kurczliwość mięśni i odgrywa specyficzną rolę we wchłanianiu węglowodanów. Co ciekawe zapotrzebowanie na jony sodu i chloru zmienia się wraz z wiekiem ptaków (Murakami i in. 2001). Najczęściej ocenia się wzajemne proporcje i interakcje pomiędzy jonami Na^+ , K^+ i Cl^- pod kątem zachowania równowagi elektrolitowej organizmu. W pracy Murakami i in. (2000) wystarczający poziom Na^+ dla utrzymania maksymalnej masy ciała i wykorzystania paszy kurcząt brojlerów to zaledwie 0,15%. Wyższe poziomy powodowały zawilgocenie ściółki i nie poprawiały wyników produkcyjnych. Testowano dwa źródła sodu, wodorowęglan sodu był równie skuteczny jak chlorek sodu, natomiast obniżenie poziomu chloru (poprzez zastosowanie wodorowęglanu sodu) było nieskuteczne w ograniczaniu rozrzedzenia pomiotu. Autorzy rekomendują zachowanie stosunku ($Na + K$) : Cl na poziomie 200 meq kg (balans elektrolitowy).

Potas jest głównym kationem płynu wewnątrzkomórkowego, reguluje wewnątrzkomórkowe ciśnienie osmotyczne i równowagę kwasowo-zasadową. Podobnie jak sód, potas ma stymulujący wpływ na kurczliwość mięśni. Jest on również niezbędny do syntezy glikogenu i białek oraz metabolicznego rozkładu glukozy. Poziom tego pierwiastka w organizmie także zmienia się wraz z wiekiem ptaków (Rajman i in. 2006). U nowo wyklutych piskląt występuje duża zmienność i wahania poziomu elektrolitów: mają bardzo niski poziom potasu, a bardzo wysoki sodu. Po około 12 dniach proporcje te odwracają się. Stosunkowo stabilne wartości poziomu sodu i potasu w narządach i tkankach ptaków zaobserwowano w wieku od 3 do 4 tygodni (Kravis i Kare 1960). Mieszanki dla brojlerów oparte na składnikach roślinnych zawierają zwykle więcej potasu niż te zawierające produkty uboczne pochodzenia zwierzęcego. Wynika to z wysokiej zawartości K^+ w roślinnych źródłach białka oraz zakazu stosowania mączek mięsnych w żywieniu drobiu. Może to przyczyniać się do zaburzenia równowagi elektrolitowej. Wykazano istotną interakcję pomiędzy poziomem Na^+ i K^+ w diecie kurcząt w przypadku przyrostów masy ciała czy retencji azotu, co sugeruje istnienie wzajemnej zależności pomiędzy tymi elektrolitami w paszy (Koreleski i in. 2010). W badaniu Oliveira i in. (2005) szacowano zapotrzebowanie na potas w diecie samców kurcząt brojlerów w różnym wieku (8 - 21, 22 - 42 i 43 - 53 dni). Brano pod uwagę przyrosty masy ciała oraz pobranie i wykorzystanie paszy. Odnotowano wzrost zapotrzebowania na potas wraz z wiekiem ptaków, rekomendowane dawki pozwalające uzyskać najwyższą masę ciała to odpowiednio 0,628; 0,714 i 0,798% w kolejnych analizowanych podokresach. Należy jednak pamiętać, że ze wzrostem ilości jonów potasu obserwuje się wzrost częstotliwości występowania dyschondroplazji kości udowej u szybko rosnących kurcząt (Oviedo-Rondon i in., 2001).

Anion chlorkowy jest niezbędnym składnikiem dla prawidłowego metabolizmu. Chlor jest głównym anionem płynów pozakomórkowych; jony chloru stanowią około 65% całkowitej ilości anionów osocza krwi i innych płynów pozakomórkowych w organizmie (np. soku żołądkowego). Jest on zatem niezbędny do regulacji ciśnienia osmotycznego i równowagi kwasowo-zasadowej (Baloš i in. 2016). Chlor odgrywa również szczególną rolę w transporcie tlenu i dwutlenku węgla we krwi oraz w utrzymaniu pH soku żołądkowego. Głównym źródłem chloru w diecie, także w paszy dla drobiu jest sól kuchenna, czyli chlorek sodu ($NaCl$). Niedobór chlorku sodu w diecie powoduje zahamowanie wzrostu i ograniczenie wykorzystania paszy u kurcząt. Kurczęta z niedoborem tego związku wykazywały niższą zawartość sodu w osoczu, przerost nadnerczy oraz zmiany histologiczne w nerkach. Podniesiony o ponad 27% w stosunku do grupy kontrolnej poziom hematokrytu może sugerować odwodnienie organizmu. Zapotrzebowanie kurcząt na chlorki jest prawie 50% niższe niż na jony sodu. U ptaków z niedoborem sodu stwierdza się obniżenie pH krwi (Walicka i in., 1979).

Z drugiej zaś strony nadmiar jonów chlorku i sodu np. w wysoko zmineralizowanej wodzie może być dla ptaków toksyczny powodując rozluźnienie pomiotu skutkujące mokrą ściółką i zapaleniem podeszwy stopy, słabymi przyrostami masy ciała i pogorszeniem wykorzystanie paszy (Watkins i in. 2005). Fizjologicznie chlorek sodu ogrywa istotną rolę w procesach trawiennych. Nadmierne stężenie sodu może nasilać antyżywniowe działanie fitynianów, uznawanych za agresorów żywieniowych, hamując działanie egzogennej fitazy (Cowieson i in., 2011). Nadmiar soli (NaCl) w diecie powoduje wodobrzusze u kurcząt i indyków, szczególnie podatne są młode ptaki ponieważ mają one niską osmolarność osocza i nierozwinięte nerki (Julian 1987).

Potas, sól i chlor są łatwo wchłaniane z końcowych odcinków przewodu pokarmowego (Choshniak i in. 1977), dodatkowo jony te są ze sobą w ścisłym powiązaniu, zaś skrajne niedobory któregoś z nich mogą prowadzić do nieodwracalnych skutków dla organizmu i pogorszenia wyników produkcji ptaków.

6. Podsumowanie

Ziarna zbóż, główny składnik mieszanek dla drobiu, są ubogie w składniki mineralne, dlatego do komercyjnych pasz dla drobiu dodaje się suplementy mineralne. Badania sugerują, że obecne komercyjne pasze zarówno dla brojlerów jak i niosek zawierają nadmiar Ca^{2+} i fosfor, których zawartość może być zredukowana bez wpływu na produktywność lub dobrostan ptaków. Wykazano, że brojlery mogą tolerować szeroki zakres stężeń Ca^{2+} w diecie, pod warunkiem, że dieta zawiera odpowiednią ilość fosforu lub, gdy jest uboga w biodostępny fosfor, jest uzupełniona fitazą. Podobne wnioski dotyczą pasz dla niosek. W związku z tym zaleca się rozważenie obniżenia poziomu zarówno fosforu jak i Ca^{2+} w mieszkankach dla ptaków typu mięsnego i nieśnego (Li i in. 2017). Jony wapnia, magnezu i fosforu powinny być dostarczane w diecie w proporcjach i formie odpowiedniej dla danego typu użytkowego. Jest to zwłaszcza istotne w początkowych fazach wzrostu w przypadku ptaków typu mięsnego, bo pozwala im to dobrze rozpocząć odchów. W przypadku niosek, które przez cały okres produkcji zużywają zapasy makroelementów z kości do tworzenia skorup jaj, suplementacja Ca^{2+} , Mg^{2+} i fosforu powinna być intensywna w całym okresie chowu.

7. Literatura

- Araujo JA de, Silva JHV da, Costa FGP i in. (2011) Effect of the levels of calcium and particle size of limestone on laying hens. *Revista Brasileira de Zootecnia* 40(5): 997–1005.
- Baloš MŽ, Jakšić S, Knežević S i in. (2016) Electrolytes–sodium, potassium and chlorides in poultry nutrition. *Archives of Veterinary Medicine*, 9(1), 31-42.
- Casey-Trott TM, Korver DR, Guerin MT i in. (2017) Opportunities for exercise during pullet rearing, Part II: Long-term effects on bone characteristics of adult laying hens at the end-of-lay. *Poultry Science* 96(8): 2518-2527.
- Choshniak I, Munck BG, Skadhauge E (1977) Sodium chloride transport across the chicken coprodeum. Basic characteristics and dependence on sodium chloride intake. *The Journal of Physiology* 271(2): 489-503.
- Cowieson AJ, Bedford MR, Ravindran V i in. (2011) Increased dietary sodium chloride concentrations reduce endogenous amino acid flow and influence the physiological response to the ingestion of phytic acid by broiler chickens. *British Poultry Science* 52(5): 613-624.
- Czech A (2007) Efektywność fitazy w żywieniu zwierząt. *Medycyna Weterynaryjna* 63(9): 1034-1039.
- Decuypere E, Baerdemaeker De J (2006) Monitoring of eggshell breakage and eggshell strength in different production chains of consumption eggs. *Poultry Science* 85: 1670-1677.
- Drabik K, Karwowska M, Wengerska K i in. (2021) The variability of quality traits of table eggs and eggshell mineral composition depending on hens' breed and eggshell color. *Animals* 11(5): 1204.
- Foutz TL, Griffin AK, Halper JT i in. (2007). Effects of increased physical activity on juvenile avian bone. *Transactions of the ASABE* 50(1): 213-219.

- Julian RJ (1987) The effect of increased sodium in the drinking water on right ventricular hypertrophy, right ventricular failure and ascites in broiler chickens. *Avian Pathology* 16(1): 61–71.
- Koreleski J, Świątkiewicz S, Arczewska A (2010) The effect of dietary potassium and sodium on performance, carcass traits, and nitrogen balance and excreta moisture in broiler chicken. *Journal of Animal and Feed Sciences* 19(2): 244-256.
- Kravis EM, Kare MR (1960) Changes with age in tissue levels of sodium and potassium in the fowl. *Poultry Science* 39(1): 13-15.
- Li X, Zhang D, Bryden WL (2017) Calcium and phosphorus metabolism and nutrition of poultry: are current diets formulated in excess? *Animal Production Science* 57(11): 2304-2310.
- Liu YX, Guo YM, Wang Z (2007) Effect of magnesium on reactive oxygen species production in the thigh muscles of broiler chickens. *British Poultry Science* 48: 84-89.
- Mayeda B, Ernst RA (2008) Prevention of fatal cage-layer osteoporosis. *Avian Diseases* 52(3): 544-5.
- Mongin P (1981) Recent advances in dietary anion-cation balance: applications in poultry. *Proceedings of the Nutrition Society* 40(3): 285-294.
- Mueller WJ, Schraer R, Scharer H (1964) Calcium metabolism and skeletal dynamics of laying pullets. *The Journal of Nutrition* 84(1): 20-26.
- Murakami AE, Oviedo-Rondon EO, Martins EN i in. (2001) Sodium and chloride requirements of growing broiler chickens (twenty-one to forty-two days of age) fed corn-soybean diets. *Poultry Science* 80(3): 289-294.
- Murakami AE, Saleh EA, Watkins SE i in. (2000) Sodium source and level in broiler diets with and without high levels of animal protein. *Journal of Applied Poultry Research* 9(1): 53-61.
- Newman S, Leeson S (1999) The effect of dietary supplementation with 1, 25-dihydroxycholecalciferol or vitamin C on the characteristics of the tibia of older laying hens. *Poultry Science* 78: 85–90.
- Oliveira JED, Albino LFT, Rostagno HS i in. (2005) Dietary levels of potassium for broiler chickens. *Brazilian Journal of Poultry Science* 7: 33-37.
- Oviedo-Rondon EO, Murakami AE, Furlan AC i in. (2001) Sodium and chloride requirements of young broiler chickens fed corn-soybean diets (one to twenty-one days of age). *Poultry Science* 80(5): 592-598.
- Pettifor JM (2004) Nutritional rickets: deficiency of vitamin D, calcium, or both? *The American Journal of Clinical Nutrition* 80(6): 1725–1729.
- Puzio I, 1999. Wpływ stosowania fitazy jako dodatku do diety na wzrost, rozwój i mineralizację układu kostnego kurcząt brojlerów. *Medycyna Weterynaryjna* 55(9): 627-630.
- Rajman M, Juráni M, Lamošová D i in. (2006) The effects of feed restriction on plasma biochemistry in growing meat type chickens (*Gallus gallus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 145(3): 363-371.
- Sahin N, Onderci M, Sahin K i in. (2005) Magnesium proteinate is more protective than magnesium oxide in heat-stressed quail. *The Journal of Nutrition* 135(7), 1732-1737.
- Shastak Y, Rodehutsord M (2015) A review of the role of magnesium in poultry nutrition. *World's Poultry Science Journal* 71(1): 125–138.
- Walicka E, Ryś R, Koreleski J i in. (1979) Effect of sodium chloride deficiency on basal metabolism in broiler chickens. *British Journal of Nutrition* 42(3): 547-552.
- Watkins SE, Fritts CA, Yan F i in. (2005) The interaction of sodium chloride levels in poultry drinking water and the diet of broiler chickens. *Journal of Applied Poultry Research* 14(1): 55-59.
- Webster A (2004) Welfare implications of avian osteoporosis. *Poultry Science* 83(2): 184-192.
- Whitehead CC (2002) Bone breakage and osteoporosis in laying hens: causes and solutions, *Proceedings Australian Poultry Science Symposium*: 61-68.
- Xing R, Yang H, Wang X i in. (2020) Effects of calcium source and calcium level on growth performance, immune organ indexes, serum components, intestinal microbiota, and intestinal morphology of broiler chickens. *Journal of Applied Poultry Research* 29(1): 106-120.

3. Wybrane metody zoofizjoterapeutyczne u psów

Selected methods of zoophysiotherapy in dogs

Aleksandra Garbiec

Katedra Etologii Zwierząt i Łowiectwa, Wydział Nauk o zwierzętach i Biogospodarki, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Opiekun naukowy: Dr hab. lek. wet Mirosław Karpiński (miroslaw.karpinski@up.lublin.pl)

Słowa kluczowe: rehabilitacja, bieżnia wodna, laser, masaż, suplementacja

Streszczenie

Celem pracy jest omówienie podstawowych technik stosowanych w fizjoterapii zwierząt. Rehabilitacja zwierząt, jako gałąź medycyny weterynaryjnej z roku na rok staje się coraz bardziej popularna i dostępna, a jej rozwój dynamiczny. Zastosowanie metod fizjoterapeutycznych jest bardzo szerokie m.in. w przypadku zwierząt po zabiegach ortopedycznych, urazach układu mięśniowo-więzadłowego, przy zaburzeniach neurologicznych oraz w chorobie zwyrodnieniowej. Wśród metod wyróżniamy: metody fizykalne, manualne, ćwiczenia bierne i aktywne oraz hydroterapię.

1. Wstęp

Fizjoterapia to ogólna stymulacja lub selektywna terapia pogorszonej funkcji fizjologicznej, wykorzystująca czynniki występujące w przyrodzie (terapia stymulująca, terapia regulująca, terapia adaptacyjna) (Millis and Levine 2013). Wśród wskazań do fizjoterapii należy wymienić: opiekę pooperacyjną, urazy mięśniowo-szkieletowe tj. skręcenia, zapalenia, zaniki mięśniowe, przykurcze, bóle reumatyczne, niedowłady, asymetrie i kulawizny. Ponadto przyspiesza proces gojenie ran, jest pomocna w podnoszeniu wydajności u psów pracujących, przy chorobach oddechowo – krążeniowych oraz jako sposób na kontrolowanie lub redukcję masy ciała. Głównym celem fizjoterapii jest poprawa jakości życia zwierzęcia poprzez redukcję bólu oraz ponoszenie ogólnej wydolności organizmu. Zatem pomaga w zapewnieniu odpowiedniego poziomu dobrostanu zwierzęcia, pomaga ograniczać występowanie zaburzeń zachowania np. wygryzania/wylizywania bolesnej okolicy, agresji, lęku itp. Redukując odczucia bólowe, a tym samym poziom stresu zapobiega immunosupresji (przewlekły stres prowadzi do spadku odporności), co za tym idzie podatności na choroby wirusowe, bakteryjne i grzybicze (Gamba 2021).

2. Opis zagadnienia

Zoo fizjoterapia jest działem medycyny weterynaryjnej zajmującym się oceną stanu fizycznego pacjenta, a następnie doбором specyficznych form terapeutycznych. Można rozpocząć ją dopiero po wnikliwej ocenie i rozpoznaniu problemu. Niezbędne jest zebranie wywiadu od opiekuna czworonoga, jak również dokładna analiza informacji uzyskanych od lekarza weterynarii prowadzącego i kierującego psa na zabieg. Prawidłowy wywiad powinien uwzględniać: dane zwierzęcia (wiek, płeć, rasa), ogólny stan zdrowia, tryb życia, żywienie, profilaktykę, dotychczasowe leczenie, szczegóły obecnej choroby (czas trwania, leczenie) oraz informacje o wykonanych badaniach dodatkowych, rozpoznanie chorobowe oraz zamierzony cel rehabilitacji. Kolejnym etapem jest przeprowadzenie badania klinicznego, badania palpacyjnego okolicy objętej procesem chorobowym, ocena postawy i chodu w pozycji stojącej i w ruchu. Pomocne jest także wykonanie testów dodatkowych, takich jak mierzenie zakresu ruchu w stawach, pomiar masy mięśniowej czy testy oceny grzbietu.

Podstawę fizjoterapii stanowi leczenie ruchem oraz bodźcami fizykalnymi (Kaczor i Grymel-Kulesza 2017). Skierowana jest do wszystkich gatunków zwierząt, które wymagają pomocy ze strony terapeuty. Najczęstszymi wskazaniami do rehabilitacji zwierząt są: choroby zwyrodnieniowe, schorzenia aparatu ruchu np. dysplazja, zaburzenia neurologiczne np. niedowłady, zaburzenia w korekturze chodu, utrata masy mięśniowej, utrudnione gojenie ran i złamań, opieka pooperacyjna oraz urazy i kontuzje u psów sportowych. Coraz popularniejsze staje się wykorzystanie

metod fizjoterapii do ponoszenia kondycji fizycznej zwierząt sportowych w celu podnoszenia sprawności i wydajności organizmu. Wśród przeciwwskazań do zabiegów rehabilitacyjnych należy wymienić: chorobę nowotworową, ciążę, otwarte rany, epilepsję, ciężkie choroby bakteryjne i grzybicze a także choroby układu krążenia.

2.1 Metody zoofizjoterapeutyczne

Rehabilitacje możemy podzielić na zabiegi fizyczne takie jak: laseroterapię, magnetoterapię, elektroterapię, sonoterapię, termoterapię, terapię przy użyciu fali uderzeniowej. Zabiegi manualne obejmują terapię manualną mięśni (masaż), blizn, stawów (ruchy bierne). Natomiast kinezyterapia to ćwiczenia aktywne np. slalom, cavaletti, a hydroterapia jest to terapia przy udziale bieżni wodnej.



Rys. 1. Podstawowe wyposażenie gabinetu do fizjoterapii psów.

Metody fizyczne

Fizykoterapia wykorzystuje w swoim działaniu czynniki fizyczne, takie jak woda, ciepło, zimno, elektryczność, ultradźwięki, promieniowanie laserowe, drgania, czy pole magnetyczne (Jastrzębska i in. 2017). Do najbardziej popularnych metod należą więc hydroterapia, termoterapia, elektroterapia, sonoterapia, laseroterapia, terapia falą uderzeniową i magnetoterapia.

Hydroterapia wykorzystuje naturalne właściwości wody, jakimi są wypór hydrostatyczny, ciśnienie hydrostatyczne i opór. Wypór to siła skierowana ku górze, działająca na ciało zwierzęcia zanurzone w wodzie, dzięki czemu ciało waży mniej. Pies zanurzony w wodzie na głębokość stawu skokowego waży 91% swojej normalnej masy ciała. Stojący w wodzie sięgającej stawu kolanowego - 85%. Natomiast pies, któremu poziom wody sięga stawu biodrowego waży jedynie 38% swojej normalnej masy ciała (Levine i in. 2005). Zjawisko to pozwala na efektywne ćwiczenia przy zmniejszeniu obciążenia stawów ze względu na spadek ciężaru, który zwierzę musi nieść podczas ruchu (Rys. 2). Ponadto woda wywiera nacisk na ciało zwierzęcia, dzięki czemu przyczynia się do zmniejszenia obrzęków i opuchlizn. Natomiast opór jaki stawia woda jest pomocny do wzmacniania siły mięśni oraz poprawy kondycji układu sercowo – naczyniowego (Levine i in. 2005). Hydroterapię stosuje się w reedukacji chodu po zabiegach ortopedycznych i neurologicznych, w dysplazji stawów, zapaleniach kości, stawów i ścięgien, rehabilitacji po urazach i w chorobach zwyrodnieniowych. Ćwiczenia w wodzie pomagają w zanikach mięśniowych u zwierząt starych, w zwiększeniu wydolności i utrzymania kondycji u psów sportowych oraz w redukcji masy ciała u zwierząt otyłych.



Rys. 2. Pies podczas zabiegu hydroterapii .

Termoterapia to zastosowanie w leczeniu ciepła lub zimna. Ciepłolecznictwo stosowana jest najczęściej w przewlekłych chorobach degeneracyjnych i do rozgrzewania ciała. Ciepło znalazło swoje zastosowanie w leczeniu bólu, poprawia krążenie, zwiększa prędkość przewodzenia impulsów, rozluźnia mięśnie, poprawia rozciągliwość tkanek włóknistych i redukuje sztywność stawów. Terapia zimnem polega na oddziaływaniu na tkanki źródłem zimna. Jest najbardziej skuteczna bezpośrednio po urazie, w ostrej fazie zapalenia. Powoduje zwężenie naczyń krwionośnych w leczonej okolicy, zmniejsza metabolizm komórkowy, zmniejsza prędkość przewodzenia impulsów nerwowych, łagodzi nadmierne napięcie mięśniowe i znosi ból (McGowan and Goff 2016). Terapeutycznego działania ciepłem nie powinniśmy wykorzystywać podczas krwawień, zakrzepicy czy otwartych ran, natomiast od terapii zimnem powinna Nas powstrzymać choroba układu krążenia oraz zaburzenia układu neurologicznego.

Elektroterapia (TENS - Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation) jest metodą wykorzystującą prąd stały oraz prądy impulsowe o małej (2-4 Hz) i średniej częstotliwości (100-200 Hz) (Millis i Levine 2013). Obecnie elektrostymulacje wykorzystują się przy deficytach ortopedycznych i neurologicznych, szczególnie tych przebiegających z ostrym i przewlekłym bólem czy atrofią mięśni. Zależnie od rodzaju zastosowanych parametrów, elektroterapia może stymulować włókna czuciowe lub ruchowe. Stymulacja ruchowa ma na celu wzmocnienie mięśni, zmniejszenie przykurczy mięśniowych, pobudzenie krążenia, zapobieganie zrostom i rozciągnięcie tkanki włóknistej. Stymulacja czuciowa ma działać przeciwbólowo poprzez produkcję enkefalin w obrębie rdzenia kręgowego, wytwarzanie endorfin i stymulację szlaków serotoninowych. Do głównych przeciwwskazań do stosowania elektrostymulacji zalicza się obecność zmian nowotworowych, skłonność do krwawień, ostre stany zapalne mięśni i choroby układu krążenia.

Laseroterapia to metoda rehabilitacji z użyciem lasera i zjawiska fotoindukcji, fotorezonansu i fotoaktywacji. Naświetlanie laserem ma na celu pobudzenie procesów tkankowych bez ich uszkodzenia i zalecane jest przede wszystkim w celu ograniczania bólu. Laser jest najczęściej wybierana metodą terapii przy bólu przewlekłym, zmianach zwyrodnieniowych kręgosłupa i w chorobach pochodzenia neurologicznego ze skurczowymi stanami mięśni (Gamba 2021). Zabiegi z użyciem lasera można stosować na skórę zarówno przy zachowanej ciągłości powłok, jak i na rany, owrzodzenia oraz inne zmiany chorobowe. Bezwzględny przeciwwskazaniem do stosowania

laseroterapii jest choroba nowotworowa, ze względu na ryzyko zaostrzenia procesu chorobowego. Nie należy stosować naświetlań laserem na okolice, w których może grozić krwawienie oraz na znamiona, węzły chłonne i gruczoły wydzielania wewnętrznego (Michajłow i in. 2011). Podczas wykonywania zabiegów z użyciem lasera, osoba przeprowadzająca zabieg i pozostałe osoby obecne przy zabiegu powinny chronić oczy przy użyciu specjalnych okularów.



Rys. 3. Elektrostymulator.



Rys. 4. Pies podczas zabiegu laseroterapii.

Terapia manualna

Terapia manualna odbywa się za pomocą masażu wykonywanego przez fizjoterapeutę. Wśród wskazań do masażu należy wymienić: zmienione napięcie mięśniowe, atrofia, blizny i zrosty tkanek miękkich, obrzęki, przewlekłe choroby aparatu ruchu, zaleganie, częściowe lub zupełne ograniczenie ruchu, nadmierny stres zwierzęcia, a także przygotowanie przed wystawowe, przed treningowe. Do najczęstszych przeciwwskazań zaliczamy: gorączka, ostry stan zapalny w okolicy terapii, ból w fazie ostrej, przerwanie ciągłości skóry i jej choroby, przeczulica, zaburzenia krzepnięcia krwi, epilepsja, choroba nowotworowa, zerwanie ścięgna, zrost kostny oraz łamliwość kości. Do najczęściej wykonywanych masaż zalicza się masaż klasyczny, sportowy czy relaksacyjny (Robertson i Mead 2013). Do bardziej specjalistycznych masaż należy zaliczyć masaż punktowy oraz mięśniowo – powięziowy. Odpowiednio dobrany masaż sprzyja regeneracji tkanek mięśniowych i ścięgien. Przerywa on błędne koło bólu i nadmiernego napięcia mięśniowego, stymuluje uwalnianie endogennych endorfin przynosząc ulgę w bólu. Ponadto poprawia krążenie i uwalnia zrosty. Prawidłowo wykonany masaż nie powoduje nieprzyjemnych doznań u psa, a po jego zakończeniu zwierzę powinno być rozluźnione. Wpływa korzystnie na stan psychiczny pacjenta i wzmacnia więź między właścicielem a zwierzęciem (Bockstahler 2004).

Ćwiczenia bierne i aktywne

Ćwiczenia biernego zakresu ruchu polegają na delikatnym zgięciu i prostowaniu lub odwodzeniu i przywodzeniu kończyny dysfunkcyjnej zgodnie w aktualnym zakresie ruchomości w stawach. Stawy należy zginać i prostować do momentu poczucia oporu. Należy unikać oznak dyskomfortu i bólu zwierzęcia. Ćwiczenia bierne mają na celu zachowanie i poprawę zginania i prostowania w stawach, uelastycznienie mięśni, ścięgien i więzadeł oraz poprawa funkcjonowania układu nerwowego. Najbardziej pożądane przy rekonwalescencji, zaburzeniach neurologicznych, przepuklin krążka międzykręgowego, poważnych urazach kostno-mięśniowych np. uraz miednicy (Sharp 2008).

Ćwiczenia aktywne wykonywane są przy udziale siły mięśni pacjenta. Rodzaj ćwiczeń, ich częstotliwość oraz czas trwania musi być dopasowany indywidualnie do możliwości pacjenta. Do najczęstszych ćwiczeń aktywnych zaliczamy: powolne spacer, spacer na bieżni, wchodzenie po schodach, siad-wstań, taczka, taniec, jogging, cavaletti, slalom, podaj łapę czy kontrolowana zabawa piłką (Rys. 5). Ćwiczenia aktywne mają na celu poprawę wydajności organizmu, wzmocnienie masy mięśniowej, zachowanie prawidłowej postawy ciała i koordynacji ruchowej.



Rys. 5. Pies podczas ćwiczeń aktywnych na cavaletti.

2.2 Oczekiwane cele rehabilitacji

Głównym celem fizjoterapii u zwierząt jest poprawa jakości życia zwierzęcia poprzez redukcję bólu, a tym samym stopniowe ograniczanie stosowanych leków przeciwbólowych, mających niekorzystny długofalowy wpływ na organizm. Korzystny wpływ na proces gojenia się ran, niwelowanie/zapobieganie obrzękom poprzez zwiększenie ukrwienia tkanek. Poprawa ogólnej wydajności organizmu poprzez wdrożenie aktywności fizycznej dostosowanej do możliwości indywidualnej pacjenta. Z behawioralnego punktu widzenia rehabilitacja będzie pomocna w ograniczeniu występowania zaburzeń zachowania np. wygryzania/wylizywania bolesnej okolicy, agresji czy lęku. Dzięki niwelowaniu przewlekłego bólu, zapobieganie immunosupresji i podatności na inne choroby np. wirusowe czy bakteryjne. Redukowanie zaników mięśniowych, przykurczy na skutek nieużywania dysfunkcyjnej kończyny/części ciała.

2.3 Suplementacja

Suplementacja ma na celu wyeliminowanie niedoborów witaminowych, mikro i makroelementów oraz innych substancji budulcowych niezbędnych w organizmie do prawidłowego funkcjonowania układu kostnego. Suplementacja powinna być dopasowywana do aktualnego stanu fizjologicznego w jakim znajduje się zwierzę. Do składników budulcowych zaliczamy: siarczan chondroityny, siarczan glukozaminy, kolagen oraz kwas hialuronowy. Wśród witamin najważniejsze z punktu widzenia układu ruchu są: witaminy z gr. B, witamina E i witamina C, witamina D oraz A. Mikro i makroelementy: Fe, Mn, Mg, Ca, K, Na, S, Si, Zn, Sn, Cu, Se oraz aminokwasy: arginina, leucyna, prolina, histydyna. Do najczęściej suplementowanych składników należą:

- a) Glukozamina sprzyja regeneracji chrząstek i prawidłowemu funkcjonowaniu stawów, zwiększenia ilość mazi w torebce stawowej, co znacznie ogranicza dolegliwości bólowe i ułatwia poruszanie się.
- b) Kwas hialuronowy zapewnia prawidłową lepkość i sprężystość płynu maziowego w torebce stawowej, dzięki czemu zwiększa elastyczność stawu i poprawia sprawność ruchową.
- c) Witamina C – niezbędna do syntezy kolagenu
- d) Chondroityna – jest jednym ze składników budulcowych chrząstek stawowych, sprzyja odbudowie chrząstek stawowych i likwiduje tarcia pomiędzy stykającymi się, ruchomymi elementami stawów (Mateuszuk i Biel 2020).

3. Podsumowanie i wnioski

Decydując się na zastosowanie fizjoterapii, należy pamiętać, że ćwiczenia powinny być odpowiednio dobrane dla danego zwierzęcia na podstawie postawionej diagnozy lekarskiej. Aby wdrożone metody rehabilitacji przyniosły oczekiwane skutki należy wykonywać je zgodnie w instruktażem dyplomowanego zoo fizjoterapeuty, a także pamiętać o ich systematyczności. W przeciwieństwie do metod farmakologicznych, na efekty metod fizykalnych należy poczekać. Idealnym schematem postępowania jest połączenie metod farmakologicznych i rehabilitacyjnych oraz pozostawać pod opieką lekarza weterynarii oraz zoo fizjoterapeuty dla pełnego i zadowalającego efektu leczenia zwierzęcia.

4. Literatura

- Bockstahler B, Levine D, Millis DL, i in. (2004) Essential facts of physiotherapy in dogs and cats. BE Vet Verlag.
- Gamba D (2021) Diagnostyka i leczenie bólu u psów. Edra Urban & Partner.
- Kaczor D, Grymel-Kulesza E (2017) Analiza porównawcza w prowadzeniu fizjoterapii u ludzi i zwierząt [w:] Podgórska M. Choroby XXI wieku – wyzwania w pracy fizjoterapeuty. Wydawnictwo Wyższej Szkoły Zarządzania, Gdańsk
- Levine D, Millis DL, Marcellin-Little DJ, i in. (2005) Rehabilitation and physical therapy. Veterinary Clinics: Small Animal Practice 35(6).

- Mateuszuk K, Biel W (2020). Związki o działaniu chondroprotecyjnym [w:] Siódme Warsztaty Kynologiczne. Pies w sporcie i rekreacji, 42. Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny W Szczecinie.
- McGowan C, Goff L (2016) Animal physiotherapy: assessment, treatment and rehabilitation of animals. John Wiley & Sons.
- Michajłow M, Aniołek O, Nowicka K (2011) Zastosowanie laseroterapii w weterynarii. Magazyn Weterynaryjny, 10.
- Millis D, Levine D (2013). Canine rehabilitation and physical therapy. Elsevier Health Sciences.
- Robertson J, Mead A (2013) Fizjoterapia i masaż psów. Wydawnictwo Galaktyka
- Sharp B (2008) Physiotherapy in small animal practice. In practice 30(4), 190-199.

4. Wybrane metody terapii z udziałem zwierząt

Animal therapy

Aleksandra Garbiec⁽¹⁾, Joanna Kapustka⁽¹⁾, Paweł Niedzielski⁽²⁾

⁽¹⁾Katedra Etologii Zwierząt i Łowiectwa, Wydział Nauk o zwierzętach i Biogospodarki, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

⁽²⁾Felinologiczne Studenckie Koło Naukowe, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Opiekun naukowy: Dr hab. lek. wet Mirosław Karpiński (profesor uczelni)

(miroslaw.karpinski@up.lublin.pl)

Słowa kluczowe: animaloterapia, dogoterapia, felinoterapia, alpakoterapia, hipoterapia, onoterapia

Streszczenie

Celem pracy jest przedstawienie najczęstszych form terapii z udziałem różnych gatunków zwierząt. Animaloterapia z biegiem czasu zyskała na popularności, a wśród najczęściej stosowanych wyróżniamy dogoterapię, felinoterapię, hipoterapię, alpakoterapię, onoterapię czy delifinoterapię. Zwierzęta do celów terapeutycznych znalazły szerokie zastosowanie w pracy z dziećmi i osobami dorosłymi z niepełnosprawnościami ruchowymi i umysłowymi.

1. Wstęp

Posiadanie zwierząt wpływa bardzo pozytywnie na nasz stan emocjonalny. Zwierzęta aktywują w naszym organizmie hormon, dający odczucie szczęścia. Hormonem tym jest oksytocyna, produkowana przez podwzgórze, a uwalniana do krwi przez przysadkę mózgową np. podczas głaskania psa, słuchania mruczenia kota czy jazdy konnej. Badania naukowe wykazały, że uwalnianie oksytocyny ma wpływ na obniżenie poziomu stresu, zarówno u człowieka jak i zwierzęcia (Magiera 2018). Zjawisko to zostało dokładnie zbadane oraz szeroko wykorzystane jako forma terapii dla dzieci i dorosłych borykających się z problemami natury fizycznej i psychicznej. Ze względu na rodzaj terapii, jej cel i zastosowanie została podzielona na odrębne grupy (Baro 2004).

Wyróżniamy następujące grupy zooterapii:

- a) zajęcia z udziałem zwierząt animal-assisted activities (AAA)
- b) terapię z udziałem zwierząt animal-assisted therapy (AAT)
- c) edukacja z udziałem zwierząt animal-assisted education (AAE)

2. Opis zagadnienia

Animaloterapia jest metodą wspomagającą leczenie oraz rehabilitację osób z niepełnosprawnością, polegająca na bliskim i niewymuszonym kontakcie ze zwierzętami, pozostających pod ścisłą kontrolą animaloterapeuty. Najczęstszymi odbiorcami tego typu terapii są dzieci z mózgowym porażeniem dziecięcym, zespołem Downa, porażeniem kończyn, zanikiem mięśni, zaburzeniami uwagi, autyzmem oraz osób dorosłych z opóźnieniami w rozwoju intelektualnym, motorycznym oraz osób niewidomych. Interakcje ze zwierzętami okazują się pomocne w leczeniu depresji, zaburzeń lękowych czy schizofrenii, a także mają pozytywny wpływ na funkcjonowanie osób w wieku podeszłym ze spektrum demencji. Mechanizmy działania zooterapii polegają na wytwarzaniu uczuć pomiędzy człowiekiem a zwierzęciem, stymulującej interakcji ze zwierzęciem, terapii za pośrednictwem aktywności fizycznej ze zwierzęciem (jazda konna, pływanie, spacer czy wspólna zabawa) (Girczys – Poedniok i in. 2014).

2.1 Dogoterapia

Dogoterapia jest najpopularniejszą metodą terapii z udziałem specjalnie wyszkolonego psa i jego przewodnika. Pies terapeutyczny powinien być odpowiednio dobrany pod względem cech temperamentu tj. zrównoważony, społeczny, przewidywalny i posłuszny. Do najczęściej wybieranych ras psów należą: golden retriever, labrador retriever oraz cavalier king charles spaniel (Rys. 1). Psy znalazły szerokie zastosowanie w terapii i rehabilitacji dzieci i dorosłych

z niepełnosprawnościami oraz osób, u których występują problemy z przystosowaniem do życia społecznego. Zajęcia z psami poprawiają koncentrację, mają pozytywny wpływ na rozwój mowy, pobudzają podstawowe zmysły do działania (dotyk, węch) (Bednarczyk 2016). Niewerbalny kontakt ze zwierzęciem uczy lepszej komunikacji z otoczeniem, podnosi poczucie własnej wartości i pozwala na nawiązanie nowej relacji, które może sprzyjać nawiązywaniu interakcji z innymi osobami w przyszłości. Ponadto, rozwijają się funkcje motoryczne, poprzez aktywność fizyczną w formie zabawy czy spaceru z psem. Interakcje z psami powodują redukcję stężenia kortyzolu w surowicy krwi, a stymulują wzrost poziomu oksytocyny. Wzmożona sekrecja oksytocyny odgrywa rolę w tworzeniu trwałych więzi i wyrażaniu uczuć, dzięki czemu może stanowić pomocne narzędzie w walce z depresją (Cirulli i in. 2011). Dogoterapia może być przydatnym narzędziem w resocjalizacji pacjentów z nadmierną agresją oraz w radzeniu sobie z trudnymi emocjami tj. niekontrolowane wybuchy złości. Pierwsze efekty terapii możemy zauważyć po dwóch miesiącach regularnej pracy z psem terapeutycznym.



Rys. 1. Pies terapeutyczny rasy Golden retriever (autor A. Garbiec).

2.2 Felinoterapia

Alternatywą dla dogoterapii może być felinoterapia, która wykorzystuje kota jako zwierzę użytkowane w zajęciach terapeutycznych (Goleman i in. 2012) (Rys. 2). Felinoterapia wpływa głównie na poprawę kondycji psychicznej i fizycznej pacjenta. Kontakt z kotem oraz jego obserwacja i przebywanie w jego towarzystwie może mieć bardzo pozytywne skutki. Obecność kota zmniejsza poczucie samotności, mobilizuje do działania i podejmowania aktywności. Kontakt fizyczny (np. poprzez głaskanie) skutkuje wydzielaniem endorfin, obniża ciśnienie krwi, stymuluje układ odpornościowy. Obok kotów wielorasowych, szczególnie popularnymi w felinoterapii są koty rasy Ragdoll, Maine Coon, koty perskie oraz brytyjskie (Horoszewicz i in. 2017). Mruczenie kota, czyli dźwięki o charakterystycznej częstotliwości (25 do 150 Hz), łagodzi stres, zmniejsza do 40% ryzyko wystąpienia zawału mięśnia sercowego, obniża ciśnienie tętnicze krwi, pomaga leczyć infekcje i obrzęki, przyspiesza zrastanie się kości po urazach, usprawnia działanie mięśni, ścięgien i więzadeł

po kontuzjach. Głaskanie kotów może również usprawnić zniekształcone kończyny dzieci z porażeniem mózgowym oraz starszych osób cierpiących na artretyzm. Temperatura ciała kotów wynosi od 38,1°C do 39,2°C (Harkin 2018) przez co kot swoim dotykiem wykonuje terapię ciepłem, np. poprzez rozgrzewanie bolących miejsc (Bednarczyk 2017). Pacjenci biorący udział w zajęciach z felinoterapii oceniają ją bardzo dobrze i chętnie przystępują do tego rodzaju terapii. Zgodnie przyznają, że przynosi ona pożądane rezultaty, działa uspokajająco. Większość pacjentów stwierdza, że między nimi a kotem wytwarza się więź (Sawaryn 2013).



Rys. 3. Kot terapeutyczny rasy Norweski leśny (autor P. Niedzielski).

2.3 Hipoterapia

Hipoterapia jest metodą rehabilitacji psycho - ruchowej prowadzona przy udziale konia oraz jego opiekuna (hipoterapeuty). Koń do terapii powinien być spokojny, posłuszny o odpowiedniej budowie ciała. Jedną z najpopularniejszych ras koni stosowanych w Polsce do hipoterapii są konie rasy huculskiej (Rys.3). Hipoterapeuta pełni rolę asekurującą/zapewnia bezpieczeństwo podczas zajęć ruchowym ze zwierzęciem (kontrolowana jazda konna) oraz oprowadza konia np. na lonży. Tego typu zajęcia znalazły zastosowanie dla osób zwłaszcza dzieci, cierpiących na zaburzenia psychomotoryczne, wady postawy czy uszkodzenia narządów zmysłów tj. wzrok czy słuch (Bednarczyk 2015). Co więcej metoda ta ma pozytywny wpływ dla ludzi z upośledzeniem umysłowym i zaburzeniami emocjonalnymi takimi jak zachowania aspołeczne, lękliwość czy agresja. W sytuacji kiedy występują przeciwwskazania do ćwiczeń ruchowych stosuje się bierny kontakt, mający na celu wytworzenie więzi emocjonalnej ze zwierzęciem (Ciechanowicz 2018). Innym szczególnym zastosowaniem hipoterapii jest możliwości pracy z dziećmi autystycznymi lub ze spektrum autyzmu, ponieważ, zostało udowodnione, że zarówno osoby autystyczne jak konie wykazują wiele podobieństw w postrzeganiu, reagowaniu i porozumiewaniu się ze światem (Raczkowska 2009).



Rys. 3 Koń terapeutyczny rasy huculskiej (autor A. Ziemiańska)

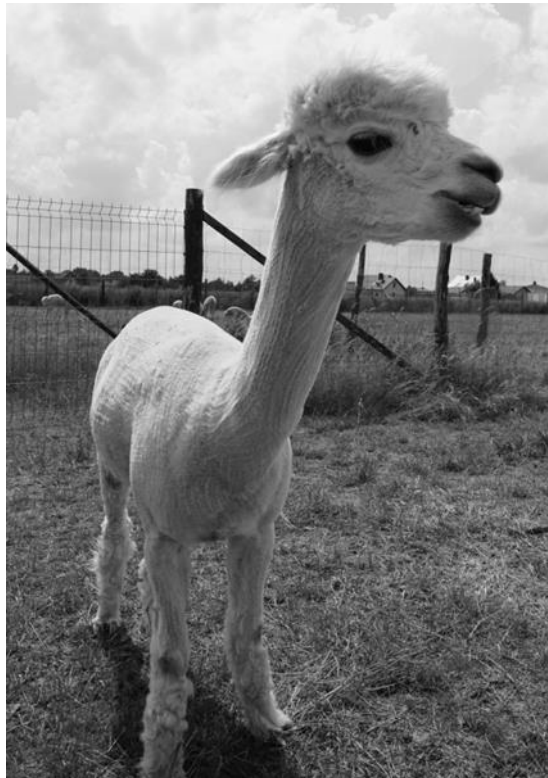
2.4 Onoterapia

Terapia z udziałem osłów, jest nieco mniej rozpowszechniona niż hipoterapia czy dogoterapia, ale również zyskuje swoich zwolenników. Onoterapia jest podobna do hipoterapii, dzięki czemu może być alternatywą dla niej (Borini i in. 2012). Osły charakteryzują się miękkim chodem, co jest szczególnie istotne podczas rehabilitacji (Camillo i in. 2018). Zaletą osłów jest również ich niższa pobudliwość na bodźce oraz łagodniejsza reakcja na nie (Gonzalez De Cara i in. 2016), dodatkowo niechętnie przechodzą na wyższe chody jak kłus czy galop, co jest bezpieczne dla pacjenta (Dziurka i Długosz 2016). Wbrew ogólnej opinii osły są zwierzętami chętnie współpracującymi z człowiekiem, pod warunkiem prawidłowego podejścia (González i in. 2019). Onoterapia jest stosowana w terapii osób z zaburzeniami psychicznymi (Tropia i in. 2017), rehabilitacji dzieci z niepełnosprawnością ruchową (De Rose i in. 2011), intelektualną czy autyzmem (Gonzalez-De Cara i in. 2016). Obecnie brak jest danych dotyczących tego, jakie rasy osłów są szczególnie predysponowane do onoterapii (Camillo i in. 2018), ważne jest jednak, by posiadał on predyspozycje do tego typu pracy zarówno pod kątem pokroju (Dziurka i Długosz 2016) jak i cech psychicznych (Gonzalez De Cara i in. 2016).

2.5 Alpakoterapia

Obecnie jedną z bardzo intensywnie rozwijających się w Polsce dziedzin animaloterapii, jest alpakoterapia. Kokocińska (2017) podaje, że głównymi zaletami alpaki są: nietypowy i przyjazny wygląd, łagodny temperament, oraz łatwość szkolenia. Łatwość szkolenia alpaki pod kątem przygotowania do pracy m.in. w alpakoterapii (nauka chodzenia na uwiązaniu, transportu w przyczepie) badały Kapustka i Budzyńska (2020¹). Niezwykle ważne jest także odwrócenie poszczególnych części ciała zwierzęcia, zwłaszcza tylnych kończyn, co zmniejsza ryzyko kopania przez alpakę (Kapustka i Budzyńska 2020²). Jeden z autorów zwraca także uwagę na inne cechy ważne przy selekcji i treningu zwierzęcia, jak delikatność pobierania pokarmu z ręki (alpaka powinna pobierać pokarm wargami, łapczywie pobierające pokarm zwierzęta czasem szczypią zębami dłoń, co może być nieprzyjemne zwłaszcza dla dzieci), neutralną reakcją na dotyk obcych ludzi (część alpaki nie toleruje ludzkiego dotyku i odsuwa głowę i szyję w reakcji na zbliżającą się dłoń), czy poziom ciekawości (ciekawskie zwierzęta są bardziej odważne, szybciej podejmują interakcję z nowymi bodźcami, łatwiej adaptują się w nowym środowisku np. placówce w której odbywają się zajęcia). Alpaki ze względu na bardzo silny instynkt stadny zawsze pracują minimum w parach (Kapustka i Budzyńska 2020²), ważne również, by zwierzęta pracujące razem łączyły pozytywne relacje, w przeciwnym razie podczas transportu czy w czasie trwania zajęć będzie dochodzić do częstych konfliktów i tym samym plucia. Nie ma obecnie danych dotyczących tego, która z ras alpaki (Huacaya

lub Suri) ma większe predyspozycje do użytkowania w alpakoterapii. Jeden z autorów z własnego doświadczenia może stwierdzić że Huacaya mają bardziej zrównoważoną reakcję na bodźce w porównaniu do Suri, które są bardziej płochliwe. Również w praktyce częściej spotyka się Huacaya niż Suri, ale może to mieć również związek z faktem, że tej rasy jest znacznie więcej w populacji (około 85%), więc jest większe prawdopodobieństwo, że przyszły alpakoterapeuta zdecyduje się właśnie na nią. Znacznie częściej spotyka się również samce w porównaniu u samic (Kapustka i Budzyńska 2020²). Alpakoterapia może być stosowana w terapii osób z depresją, nerwicą, zaburzeniami lękowymi, chorobami psychicznymi, ADHD, autyzmem czy porażeniem mózgowym (Kokocińska 2017). Alpaki ze względu na swoją przyjazną aparycję jak i zdolności poznawcze z powodzeniem mogą być użytkowane w terapii z udziałem zwierząt.



Rys. 4. Alpaka rasy huacaya (autor J. Kapustka).

2.6 Delfinoterapia

Jest to terapia przy udziale delfinów, polegająca na bliskim kontakcie osoby rehabilitowanej (wspólne pływanie, przebywanie w wodzie i zabawa/ćwiczenia ruchowe) z delfinami pod okiem delfinoterapeuty. Oprócz ćwiczeń ruchowych w formie hydroterapii na człowieka oddziałują ultradźwięki wydawane przez delfiny. Naukowcy udowodnili, że ultradźwięki mogą przyczynić się do pozytywnych zmiany w zniszczonych/zmienionych komórkach ciała (Buchnat 2013). Dzięki kontaktowi z ciekawskimi i towarzyskimi delfinami dochodzi do wytwarzania endorfin, które zmniejszają odczucie bólu, dyskomfortu, a także ułatwiają oddychanie i sprawność ruchową w dysfunkcyjnych częściach ciała (np. przy zjawisku bólu fantomowego). Duża chęć zabawy i atrakcyjność tej formy terapii cieszy się duży zainteresowaniem wśród dzieci chorujących na autyzm. Ta metoda terapii nie może być stosowana u dzieci i dorosłych z epilepsją, nadmiernym lękiem przed wodą, a także agresją i niekontrolowanymi wybuchami agresji (Fiksdal 2012). Delfinoterapia budzi wiele pozytywnych, ale także i negatywnych emocji np. związanych z dobrostanem zwierząt, które nie przywykły do kontaktu z człowiekiem w naturalnym środowisku. Delfinoterapia mimo swoich wielu zalet nadal jest jedną z najmniej dostępnych form animaloterapii.

3. Korzyści płynące z animaloterapii

Udowodniono, że bezpośredni kontakt człowieka ze zwierzęciem terapeutycznym przyczynia się do obniżenia poziomu stresu i bólu u osób z zespołem pourazowym. Pozwala na wzmocnienie układu odpornościowego naszego organizmu oraz obniżenie ciśnienia u osób z nadciśnieniem. Ponadto podnosi poziom samooceny i empatii u osób cierpiących na zaburzenia osobowości tj. nadmierna łękliwość, depresja czy myśli samobójcze. Pomagają pobudzać do życia osoby starsze u których występuje otępienie starcze, zaawansowana/nieuleczalna choroba, a tym samym niechęć do kontaktu z otoczeniem (Jagielski i in. 2014). Według przeanalizowanych publikacji do najczęściej uzyskiwanych efektów animaloterapii należą usprawnienie motoryczne tj. poprawa równowagi, postawy oraz poprawa komunikacji i percepcji społecznej (Ciechanowicz i Lubkowska 2018), a także usprawnienie koordynacji wzrokowo – ruchowej, rozwijanie percepcji słuchowej, wzbogacenie zasobów słownictwa, wyrównywanie dysproporcji rozwojowych oraz doskonalenie nabytych wcześniej umiejętności (Franczyk i in. 2012).

4. Podsumowanie i wnioski

Zwierzęta, dzięki swoim naturalnym cechom oraz procesowi domestykacji budzą zainteresowanie człowieka i stymulują liczne funkcje sensoryczne. Ludzie pragną kontaktu ze zwierzęciem, możliwość fizycznego kontaktu poprzez np. głaskanie psa budzi wiele pozytywnych emocji. Nawiązywanie kontaktu niewerbalnego pozwala na zrozumienie i ujawnienie swoich emocji. Całość zmian w wyniku obcowania ze zwierzętami prowadzi do poprawy jakości życia człowieka. W drugą stronę zwierzęta potrzebują kontaktu z człowiekiem, ponieważ czują się bezpieczne ze względu na to, że człowiek daje im jedzenie i schronienie. Z prawidłowo prowadzonej animaloterapii powinna płynąć obopólna korzyść dla człowieka i zwierzęcia.

5. Literatura

- Baro E (2004) Czworonożni „Terapeuci”. Współczesny model stosowania zwierząt w terapii – dojrzałe koncepcje i profesjonalizm. *Wspólne Tematy* (7/8).
- Bednarczyk M (2015) Hipoterapia jako forma rehabilitacji i wsparcia włączania społecznego osób niepełnosprawnych.
- Bednarczyk M (2016) Dogoterapia jako forma rehabilitacji osób niepełnosprawnych.
- Bednarczyk M (2017) Felinoterapia jako forma wsparcia włączenia społecznego i rehabilitacji osób niepełnosprawnych.
- Buchnat M, Rzepka M (2013) Delfinoterapia w usprawnianiu dzieci z zaburzeniami w rozwoju – dylematy i kontrowersje. *Interdyscyplinarne Konteksty Pedagogiki Specjalnej* (1), 73-85.
- Camillo F, Rota A, Biagini L i in. (2018) The Current Situation and Trend of Donkey Industry in Europe. *J. Equine Vet. Sci.* 65, 44–49.
- Chmiel K, Kubińska Z, Derewiecki T (2014) Terapie z udziałem zwierząt w rehabilitacji różnych form niepełnosprawności. *Probl Hig Epidemiol* 95(3), 591-595.
- Ciechanowicz I, Lubkowska A (2018) Efekty hipoterapii. *Przegląd aktualnych doniesień* (2013–2017). *Pomeranian Journal of Life Sciences* 64(3), 143-146.
- Cirulli F, Borgi M, Berry A, i in. (2011) Animal-assisted interventions as innovative tools for mental health. *Annali dell’ Istituto superiore di sanita* 47: 341–348.
- De Rose P, Cannas E, Reinger Cantiello P (2011) Donkeyassisted rehabilitation program for children: a pilot study. *Ann. Ist. Super. Sanita* 47(4), 391–396.
- Dziurka D, Długosz B (2016) Sposoby użytkowania osłów. *Wiadomości Zootechniczne LIV* (3), 77-87.
- Fiksdal BL, Houlihan D, Barnes AC (2012) Dolphin-assisted therapy: claims versus evidence. *Autism research and treatment*.
- Franczyk A., Krajewska K., Skorupa J (2012) *Baw się poprzez animaloterapię*. Oficyna Wydawnicza Impuls.

- Girczys-Poedniok K, Pudło R, Szymlak A, i in. (2014) Zastosowanie terapii z udziałem zwierząt w praktyce psychiatrycznej. *Psychiatria* 11(3), 171-176.
- Goleman M, Drozd L, Karpiński M, Czyżowski P (2012) Felinoterapia jako alternatywna forma terapii z udziałem zwierząt. *Medycyna Weterynaryjna* 68(12), 732-735.
- González FJN, Vidal JJ, Jurado JML i in. (2019). Dumb or smart asses? Donkey's (Equus asinus) cognitive capabilities share the heritability and variation patterns of human's (Homo sapiens) cognitive capabilities. *J. Vet. Behav.* 33, 63–74.
- Gonzalez-De Cara CA, Perez-Ecija A, Aguilera-Aguilera R I in. (2016) Temperament test for donkeys to be used in assisted therapy. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 186, 64–71.
- Harkin KR 2018. Jak ustalić przyczynę gorączki u kotów? *Weterynaria po Dyplomie* nr. 1 t. 19, str. 14-21,24.
- Horoszewicz E, Tomczak E, Niedziolka R (2017) Zwierzę terapeutyczne-kot. *Wiadomości Zootechniczne* 55(4).
- Jagielski D, Jagielska A, Pyszora A (2014) Dogoterapia—historia, założenia, cele. Propozycja zastosowania w opiece paliatywnej. *Medycyna Paliatywna w Praktyce* 8(4), 163-167.
- Kapustka J, Budzyńska M (2020²) The use of various animal species for therapeutic purposes in Poland: current perspectives. *Acta Scientiarum Polonorum Zootechnica* 19(2), 3-10.
- Kapustka J, Budzyńska M (2020¹) Reaktywność behawioralna alpaka podczas zabiegów pielęgnacyjnych i szkolenia. *Medycyna Weterynaryjna* 76(2), 107–110.
- Kokocińska AM (2017) Zooterapia z elementami etologii, *Impuls*, Kraków.
- Magiera A, Klocek C, Penar W (2018) Animaloterapia jako współczesne narzędzie poprawy zdrowia człowieka. *Sztuka Leczenia* nr 2, s. 85–90.
- Nawrocka-Rohnka J (2010) Dogoterapia jako metoda wspomagania rehabilitacji dziecka z zaburzeniami rozwoju. *Nowiny Lekarskie* 79(4), 304-310.
- Rackowska A (2009) Koń-wspaniały terapeuta. *Koń Polski* 44(07).
- Sawaryn D (2013) Felinoterapia w usprawnianiu pacjentów onkologicznych. *Medycyna Rodzinna* 4 str. 123-128.

5. Leptospiroza u psów jako choroba wielowątkowa, patogenez, objawy, leczenie i zapobieganie

Leptospirosis in dogs as a multisystem disease, pathogenesis, symptoms, treatment and prevention

Adrianna Michniewicz

Katedra Fizjologii Klinicznej, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Opiekun naukowy: prof., dr hab. Jarosław Całka

Adrianna Michniewicz: michniewiczada@gmail.com

Słowa kluczowe: Krętki, choroba Weila, szczepionka, niewydolność nerek

Streszczenie

Leptospiroza to groźna choroba bakteryjna, występująca praktycznie na całym świecie, chorują na nią zwierzęta oraz ludzie. Leptospiry są krętkami, występującymi w wielu odmianach, różnią się między sobą budową i patogennością. Wiele z nich, jest wysoce patogenna a zakażenie nią powoduje wystąpienie objawów chorobowych. Psy są gatunkiem zagrożonym zarażeniem Leptospirami, między innymi przez mocz innych zwierząt, czy kąpiel w wodzie zawierającej patogenne krętki. Przebieg choroby u psa, może być różny, na co wpływa wiele czynników w najgorszym przypadku choroba może spowodować nawet śmierć zwierzęcia. Obecnie w praktyce weterynaryjnej dostępne są środki, które umożliwiają zapobieganie zarażeniu a przy ewentualnym zarażeniu złagodzenie przebiegu schorzenia. Należy zaznaczyć również, że leptospiroza jest zoonozą, co potencjalnie oznacza, że krętki ze zwierząt takich jak psy, mogą przechodzić na ludzi i powodować u nich objawy chorobowe, stąd tak ważna jest wiedza na temat tej choroby.

1. Wstęp

Czynnikiem wywołującym chorobę są krętki z rodziny **Leptospira**. Schorzenie to jest nazywane również chorobą Weila lub chorobą Stuttgardzką. Leptospiry przenoszone są bezpośrednio poprzez mocz nosiciela, do zakażenia może także dojść w sposób pośredni – przez zanieczyszczoną wodę lub glebę uprzednio zanieczyszczoną moczem przewlekle zakażonych zwierząt. Bakterie te mogą wnikać do organizmu przez uszkodzoną skórę lub przez nieuszkodzoną błonę śluzową (np. wyściełającą jamę ustną). Gatunki pasożytnicze wywołują leptospirozy, w których dochodzi do przerwania ciągłości śródbłonna naczyń włosowatych i w rezultacie do uszkodzenia płuc, serca, nerek i rzadziej innych narządów, Do gatunków najczęściej występujących u psów zaliczamy m.in. *L. Pomona*, *L. Grippotyphosa*, *L. Canicola*, *L. Icterohaemorrhagiae*, *L. Tarassovi*, *L. Ballum*, *L. Bratislava*. Leptospirozy odzwierzęce są niebezpiecznymi zoonozami. Zachorowania na leptospirozę u ludzi mają najczęściej związek z wykonywanym zawodem, pracą w rolnictwie, weterynarii, rybactwie i rybołówstwie, uboju zwierząt, robotach melioracyjnych, górnictwie, a także służbą zawodową w wojsku.

2. Opis zagadnienia

Leptospiroza to choroba, która po raz pierwszy została opisana w 1886 roku przez Weila a charakteryzowało ją nagłe wystąpienie gorączki oraz rozwój zmian wątrobowo-nerkowo-płucnych. Leptospiroza jest chorobą bakteryjną występującą na całym świecie, wywołowaną przez bakterie *Leptospira*. Drobnoustroje te występują na całym świecie w glebie, wodzie oraz moczu zarażonych zwierząt (Inada i Ido i Hoki 1916). Istnieje wiele szczepów bakterii *Leptospira*, które charakteryzują się chorobotwórczością. Bakterie do organizmu dostają się przez błony śluzowe, powodując uszkodzenie śródbłonna i uszkodzenie narządów, takich jak wątroba i nerki. Zakażenie krętkami *Leptospira spp.* może powodować bardzo szeroki wachlarz objawów chorobowych od grypopodobnych z łagodnymi zaburzeniami czynności wątroby i nerek do bardzo ciężkich uszkodzeń

nerek, wątroby, płuc, serca, mózgu i oczu, często kończących się śmiercią chorego (Inada i Ido i Hoki 1916). Objawy kliniczne i zmiany anatomopatologiczne są niespecyficzne. Obecnie badania opierają się w dużej mierze na serologii i testach PCR. W leczeniu leptospirozy stosuje się antybiotykoterapię oraz leczenie objawowe. Ważnym czynnikiem jest profilaktyka obejmująca działania środowiskowe i coroczne szczepienia zagrożonych psów.

3. Przegląd literatury

3.1 Etiologia

Czynnikiem etiologicznym wywołującym leptospirozę, są krętki *Leptospira* należące do bakterii Gram-ujemnych. Są to długie, ale wąskie krętki posiadające w swojej budowie dwie rzęski na obu końcach, dzięki którym mają możliwość poruszania się. Leptospiry są bakteriami tlenowymi, rosną na wzbogaconych podłożach (Bharti i Nally i Ricaldi 2003). Bakterie te są odporne na niskie temperatury, ale bardzo wrażliwe na wysychanie i promieniowanie UV, dlatego szybko giną poza zarażonym organizmem. Są również wrażliwe na działanie wielu czynników fizykochemicznych. Tylko w wodzie i wilgotnej ziemi mogą przeżywać, zachowując właściwości chorobotwórcze ponad 20 dni. Z tego względu szczególną rolę w rozprzestrzenianiu leptospiroz odgrywa zanieczyszczona bakteriami woda. Ich nosicielami są zwierzęta, najczęściej gryzonie lub inne ssaki (Bharti i Nally i Ricaldi 2003). Bakterie po wnikięciu do organizmu poprzez błony śluzowe wnikają do światła naczyń krwionośnych a następnie za pośrednictwem krwi roznoszone są po całym organizmie miejscem predyalekcyjnym są narządy mięszone, głównie wątroby, gdzie się osiedlają i namnażają. Konsekwencją tego jest rozwijająca się posocznica, a uwalniane z *Leptospira* hemotoksyny uszkadzają naczynia krwionośne wywołują hemolizę erytrocytów, doprowadzając do rozwoju żółtaczk i niedokrwistość (Reagan i Sykes 2019). Przebieg choroby z towarzyszącą żółtaczką jest nazywany zespołem Weila. Po kilku dniach od zakażenia bakterie pojawiają się w moczu co przyczynia się do rozprzestrzeniania ich w środowisku. Leptospiroza to bakteryjna choroba groźna dla wielu zwierząt, szczególnie dla psów oraz ludzi. Dotychczas określana była jako „egzotyczna”, gdyż występowała w krajach o wilgotnym i ciepłym klimacie (Reagan i Sykes 2019). Obecnie coraz częściej w pojawia się w strefie klimatu umiarkowanego szczególnie w miesiącach deszczowych, stąd jej obecność obserwowana jest w Polsce głównie wiosną i jesienią.

3.2 Patogeneza

Patogenne leptospiry są bardzo ruchliwymi i inwazyjnymi bakteriami, dla których wrotami zakażenia są rany skóry i błon śluzowych, skąd szybko, dzięki własnemu ruchowi, rozprzestrzeniają się w organizmie i osiągają narządy docelowe. (Barocchi. i Ko i Reis 2002). Za chorobotwórczość leptospiir odpowiada wiele czynników, które umożliwiają im wnikięcie do organizmu, rozprzestrzenienie się, adhezję do komórek i białek macierzy zewnątrzkomórkowej gospodarza (Thomas i Higbie 1990). Jednymi z ważniejszych czynników patogenności, dzięki któremu możliwa jest adhezja leptospiir do komórek zakażonego organizmu, jest białko błony komórkowej OmpL1, lipoproteiny LipL41, LipL32, peryferyjne białko błonowe P32 i białko LigA. Ich ekspresja ma miejsce w podczas zakażenia (Haake 2000). Zakażenie wywołuje ostrą gorączkę (wczesna faza), a następnie powoduje poważne objawy wielonarządowe (faza późna). Dochodzi do zaburzeń czynności wątroby i rozwoju żółtaczk, ostrej niewydolności nerek, licznych krwotoków w płucach, zapalenia mięśnia sercowego oraz zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych i mózgu (Reagan i Sykes 2019). W większości przypadków zakażeń, układ immunologiczny eliminuje bakterie, jednak czasami zakażenie nie jest zlikwidowane do końca, a krętki mogą utrzymywać się przez dłuższy czas w organizmie, w immunologicznie uprzywilejowanych dla drobnoustrojów miejscach. Do miejsc tych zalicza się komorę przednią, ciało szkliste oka oraz kanaliki nerkowe, czego następstwem jest nosicielstwo i siewstwo zarazka wraz z moczem. (Bharti i Vinetz 2003).

3.3 Objawy

Objawy kliniczne są różnorodne nie mają charakteru patognomicznego. Leptospiroza może manifestować się wieloma różnymi symptomami i przypominać w przebiegu inne choroby zakaźne (Schuller i Francey i Hartmann 2015). Leptospiroza jest poważną chorobą przede wszystkim psów,

u których występuje jawna postać choroby, nazywana tyfusem psim. Objawy u psów mogą mieć różne nasilenie, od bardzo łagodnych lub nawet bezobjawowych do ciężkich, szybko pogłębiających się, wówczas to choroba może zakończyć się śmiercią. Leptospiroza psów występuje w trzech postaciach, tj. ostrej, podostrej i przewlekłej, przebieg i objawy leptospirozy u psów różnią się w zależności od serowaru, a niekiedy i szczepu bakterii, wieku psów i stanu odporności oraz płci. Częściej bowiem chorują zwierzęta dorosłe, samice i psy dużych ras u których zakażenie ma charakter przewlekły (Schuller i Francey i Hartmann 2015). Głównymi objawami leptospirozy są zmęczenie, utrata słuchu, zapalenie opon mózgowych i martwica kanalików nerkowych, prowadząca do niewydolności nerek. U ciężarnych samic występują roniecia oraz nieplodność. W postaci ostrej i podostrej, która występuje najczęściej u szczeniąt oraz zwierząt młodych, występuje brak apetytu, wymioty, niekiedy biegunka z domieszką krwi w kale oraz bóle mięśniowe manifestujące się tkliwością przy omacywaniu oraz niechęcią do ruchu lub sztywnym, nienaturalnym chodem, występuje również silne posmutnienie i utrata sił, prowadzące do śpiączki (Schuller i Francey i Hartmann 2015). Przez rozpad czerwonych krwinek i uszkodzenie naczyń krwionośnych u psa dotkniętego leptospirozą dochodzić może do anemii, krwotoku do przewodu pokarmowego oraz układu oddechowego. Uszkodzenie miąższu wątroby często doprowadza do żółtaczki oraz upośledzonej produkcji czynników krzepliwości krwi. Uszkodzenie struktury nefronów skutkuje zaburzeniami w produkcji i oddawaniu moczu takimi jak bezmocz, wielomocz, krwimocz oraz wzrostem toksyn we krwi co może powodować wymioty. Gorączka, wybroczyny na błonach śluzowych, niedokrwistość, żółtaczka są typowymi objawami dla zakażenia *L. Icterohaemorrhagiae*. Ostra niewydolność nerek, łącznie z przewlekłym zapaleniem wątroby lub samo zapalenie wątroby, charakteryzuje zakażenie wywołane przez *L. Grippotyphosa*. Zakażenie serowarem *L. Pomona* często ma bezobjawowy przebieg, przy czym psy są długotrwałymi siewcami leptospir (Goldstein i Lin Langston 2006). Natomiast efektem zakażenia przez *L. Canicola* jest przewlekłe śródmiąższowe zapalenie nerek. U ozdowieńców często rozwija się przewlekłe śródmiąższowe zapalenie nerek, którego następstwem jest mocznica. Postać przewlekła leptospirozy manifestuje się objawami różnego stopnia uszkodzenia nerek. Leptospirozę o nadostrym przebiegu cechują nagłe padnięcia. (Goldstein i Lin Langston 2006).

3.4 Rozpoznanie

Niestety nie ma szybkiego testu, który jednoznacznie stwierdziłby zakażenie leptospirą. Diagnostyka polega na wykonaniu badań laboratoryjnych krwi, moczu, badań bakteriologicznych oraz przede wszystkim na określaniu miana przeciwciał. Rozpoznanie leptospirozy psów na podstawie objawów klinicznych i badań laboratoryjnych jest bardzo trudne. Metodami stosowanymi w diagnostyce laboratoryjnej leptospirozy są: posiew bezpośredni z krwi i moczu, test aglutynacji mikroskopowej (MAT), test immunoenzymatyczny ELISA, test immunofluorescencyjny (IFA) a także PCR. Leptospiemia występuje w pierwszym etapie leptospirozy, przed wystąpieniem objawów i zwykle kończy się pod koniec pierwszego tygodnia ostrej fazy. Należy brać pod uwagę również fakt, że u psów z ostro przebiegającą chorobą, trwającą poniżej 10 dni, wynik badania serologicznego może być ujemny, bo nie zdąży dojść do wzrostu miana. Dlatego zasadą jest wykonywanie dwóch badań serologicznych tego samego pacjenta w odstępie 7-14 dni (tzw. badanie par surowic). Przynajmniej czterokrotny wzrost miana świadczy o ostrej leptospirozie (Barr i McDonough 2005).

3.5 Leczenie i zapobieganie

Postępowanie lecznicze polega na podawaniu surowic odpornościowych, antybiotyków oraz leczenia objawowego, a w ciężkich przypadkach wymaga przeprowadzenia transfuzji krwi. Leptospirozy są wrażliwe na ogólnie dostępne antybiotyki, ale problemem jest szybkie postawienie właściwej diagnozy i rozpoczęcie odpowiedniego leczenia, które zależy od przebiegu choroby i stopnia zaawansowania niewydolności nerek (Murphy 2018). Psose z stwierdzoną leptospirozą podaje się najczęściej kroplówki, leki przeciwwymiotne i antybiotyki, gdzie lekiem z wyboru jest penicylina lub tetracyklina podawana w wysokich dawkach przez 7-10 dni. W ostro i podostro przebiegających przypadkach leptospirozy skuteczność terapii zależy od wdrożenia intensywnego leczenia objawowego i przyczynowego. Leczenie objawowe jest często intensywne i wymaga

działania wielokierunkowego. W przebiegu ostrym u wielu pacjentów wymagane jest postępowanie przeciwwstrząsowe oraz wyrównanie odwodnienia i leczenie kwasicy metabolicznej (Murphy 2018). Celem leczenia przyczynowego jest zarówno likwidacja bakteriemii, jak i ograniczenie nosicielstwa i siewstwa. Zastosowanie antybiotyków skutkuje zwykle szybkim spadkiem gorączki i ograniczeniem liczby leptospor w krwi. Rokowanie u psów, u których nie doszło do powikłań w postaci krwawienia do płuc i udało się podtrzymać diurezę, jest na ogół dobre. U psów z ostrą niewydolnością nerek ze skąpomoczem leczenie objawowe koncentruje się przede wszystkim na podtrzymaniu i utrzymaniu właściwej diurezy (Murcia i Astudillo i Romero 2020). W celu precyzyjnego monitorowania ilości produkowanego moczu niezbędne jest założenie cewnika do pęcherza moczowego. Leczenie rozpoczyna się od wyrównania odwodnienia za pomocą izotonicznego lub roztworu chlorku sodu z glukozą, podanych we wlewie dożylnym. Jeżeli samo wyrównanie zaburzeń wodno-elektrolitowych nie skutkuje przywróceniem właściwej czynności nerek, podaje się dożylnie diuretyki osmotyczne, takie jak mannitol czy glukoza. Podanie diuretyków pętlowych zaleca się dopiero wtedy, gdy uda się przywrócić filtrację kłębuszkową za pomocą leków o działaniu osmotycznym. W przypadku braku skuteczności leczenia, zaleca się podanie dopaminy w celu zwiększenia stopnia filtracji nerkowej, chociaż skuteczność jej stosowania w ostrej niewydolności nerek pozostaje sprawą dyskusyjną (Murcia i Astudillo i Romero 2020). Jeśli pomimo leczenia nie uda się przywrócić właściwej diurezy, należy rozważyć przeprowadzenie dializy otrzewnowej lub hemodializy (Adin i Cowgill 2000). Sprawdzonym oraz rekomendowanym sposobem ochrony przed leptospirozą u psów jest szczepienie (Murcia i Astudillo i Romero 2020). Nie daje ono 100% ochrony przed bakteriami jednakże może znacznie złagodzić jej przebieg. Zalecane jest użycie szczepionki z 4 serowarami leptospor, aby organizm mógł wytworzyć odporność na możliwie jak największą ilość gatunków. Światło i temperatury powyżej 20°C szybko niszczą te drobnoustroje, dlatego w pełnym słońcu nie są one zdolne przetrwać przez dłuższy czas. Zwykle jednak występują w wodzie, więc podczas spacerów z psami zaleca się unikanie wód stojących na terenach zacienionych oraz unikania kąpeli w tych wodach. Należy również pamiętać o okresowym zabezpieczaniu zwierząt przed pasożytami zewnętrznymi, które jako bierni przenosiciele biologiczni różnych mikroorganizmów odgrywają także pewną rolę w szerzeniu się leptospirozy (Murphy 2018).

3.6 Leptospiroza jako zoonoza

Leptospiroza jest najpowszechniej występującą na świecie zoonozą i stanowi ogromny problem zdrowotny, zwłaszcza w krajach rozwijających się. Corocznie choruje około 10 mln ludzi. Najczęstszymi serotypami wywołującymi leptospirozę u ludzi są: *L. Icterohaemorrhagiae*, *L. Grippityphosa*, *L. Pomona*, *L. Canicola*, *L. Sejroe*, *L. Tarassovi* i *L. Saxkoebing*. (Levett 2001). Do zakażenia człowieka dochodzi w sposób przypadkowy przez błony śluzowe lub uszkodzoną skórę narażoną na kontakt z płynami ustrojowymi zwierzęcia z ostrą leptospirozą lub poprzez ekspozycję na wodę lub glebę zanieczyszczoną moczem zakażonych zwierząt. Do zakażenia może też dojść w wyniku pogryzienia przez zwierzęta, drogą inhalacyjną oraz przezłożyskowo w trakcie ciąży (Bharti i Nally i Ricaldi 2003). Zachorowania na leptospirozę mają najczęściej związek z wykonywanym zawodem. Występujące u psów serowary leptospor mogą powodować zakażenie człowieka, dlatego lekarze weterynarii powinni zachować daleko idącą ostrożność podczas obsługi zwierząt z rozwijającą się gwałtownie ostrą niewydolnością nerek, ostrym zapaleniem wątroby i żółtaczką, jako potencjalnie zakażonych drobnoustrojami z rodzaju *Leptospira*. Przeniesieniu choroby zapobiega przestrzeganie zasad higieny w trakcie kontaktu ze zwierzęciem podejrzanym o chorobę oraz z jego krwią i wydalinami, w szczególności moczem (Brod i Aleixo i Jouglard 2005). U większości chorych (90%) leptospiroza może przebiegać jako łagodna, samoograniczająca się choroba o nagłym początku z objawami grypopodobnymi: bólami głowy, gorączką, dreszczami, kaszlem, bólami gardła, zapaleniem spojówek, bólami mięśniowymi, którym towarzyszyć mogą nudności, wymioty, utrata apetytu, biegunka oraz zmiany skórne w postaci wysypki. Postać ostra, zwana inaczej chorobą Weila przebiega z niewydolnością wątroby i nerek, a czasem niewydolnością wielonarządową. Objawy kliniczne tej postaci choroby obejmują gorączkę, żółtaczkę, niewydolność nerek, krwawienia i masywne krwotoki, niewydolność oddechową, wysypkę skórą. Najczęstszym powikłaniem ocznym leptospirozy, niezależnie od fazy

choroby, są zaczerwienione spojówki oczu oraz zapalenie siatkówki i naczyniówki oka. W chorobie o łagodnym przebiegu zazwyczaj leczenie jest objawowe. W leczeniu leptospirozy o cięższym przebiegu stosuje się określone antybiotyki w warunkach szpitalnych. Z uwagi na długi czas oczekiwania na wyniki hodowli bakterii, antybiotykoterapię włącza się na podstawie wywiadu dotyczącego narażenia na krętki *Leptospira* i charakterystycznych objawów. Pacjent z powikłaną chorobą zazwyczaj wymaga leczenia wspomagającego funkcję wątroby i nerek (Reagan i Sykes 2019).

4. Podsumowanie i wnioski

Leptospirozy spotykane są na całym świecie, z wyjątkiem regionów polarnych i subpolarnych. Najczęściej występują w klimacie ciepłym i wilgotnym. Choroba przenoszona jest przez bydło, konie, świnie, zwierzęta domowe i dzikie oraz psy. Krętki *Leptospira* poza ustrojem szybko giną, są bardzo wrażliwe na wysychanie i ogólnodostępne środki dezynfekcyjne. Z kolei bardzo dobrze funkcjonują w niskiej temperaturze i podczas ich zamrażania. W wodzie stojącej czy wilgotnej glebie krętki mogą przetrwać wiele tygodni. Systematyka krętków jest bardzo trudna, ponieważ odkryte gatunki zostały podzielone na 25 serogrup oraz około 200 serotypów. Bakterie te wnikają do organizmu przez błony śluzowe lub uszkodzoną skórę. Dzięki temu, że potrafią się samodzielnie poruszać bardzo szybko rozprzestrzeniają się drogą krwionośną po organizmie, docierając do narządów. Mają zdolność do równie szybkiego pokonywania barier komórkowych dzięki specjalnym białkom na swojej powierzchni. Namnażając się, uszkadzają struktury narządów, w których się znajdują oraz śródbłonek naczyń krwionośnych doprowadzając do krwotoków najczęściej z płuc, wątroby i nerek. Po kilku dniach od zakażenia pojawiają się w moczu co przyczynia się do rozprzestrzeniania ich w środowisku. Objawy są bardzo różnorodne i często zależą od gatunku leptospiry, jaki dominuje w zakażeniu. Niektóre zwierzęta przechodzą ją bardzo łagodnie lub w bezobjawowej postaci. Są również przypadki bardzo ciężkiego i nagłego zakażenia, które kończy się śmiercią. Co więcej, Leptospiry które atakują nasze zwierzęta, mogą przejść na człowieka i wywołać równie groźne objawy chorobowe. Stąd niezwykle ważna jest profilaktyka, dbanie o swoje zwierzę, regularne odrobaczanie umożliwi, pozbycie się potencjalnych mechanicznych nosicieli krętek, a szczepionka może ochronić naszego psa przed zakażeniem, bądź złagodzić przebieg choroby. Dzięki szczepieniom i profilaktyce, możemy uchronić siebie i swojego psa przed zakażeniem. Mimo tak licznych objawów, czasem niespecyficznych dla tej jednostki chorobowej, rokowanie jest z reguły pomyślne. Warunkiem jest szybkie rozpoznanie i podjęcie leczenia. Należy jednak pamiętać, że szanse na wyzdrowienie zależą od statusu immunologicznego zwierzęcia, wieku i kondycji psa.

5. Literatura

- Adin CA, Cowgill LD (2000) et al. Treatment and outcome of dogs with leptospirosis: 36 cases. *J Am Vet Med Assoc* 216: 371-375.
- Barocchi MA, Ko AI, Reis MG (2002) et al. Rapid translocation of polarized MDCK cell monolayers by *Leptospira interrogans*, an invasive but nonintracellular pathogen. *Infect Immun* 70: 69266932.
- Barr SC, McDonough PL, Scipioni-Ball RL (2005) et al. Serologic responses of dogs given a commercial vaccine against *Leptospira interrogans* serovar pomona and *Leptospira kirschneri* serovar grippotyphosa. *Am J Vet Res* 66: 1780-1784.
- Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN (2003) et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis*, 3(12):757–71.
- Brod CS, Aleixo JA, Jouglaard SD, i. in. (2005) et al. Evidence of dog as a reservoir for human leptospirosis: a serovar isolation, molecular characterization and its use in a serological survey. *Rev Soc Bras Med Trop* 38: 294-300.
- Goldstein RE, Lin RC (2006) et al. Influence of infecting serogroup on clinical features of leptospirosis in dogs. *Vet. Intern. Med.* 20: 489-494.
- Haake DA (2000) et al. Spirochetal lipoproteins and pathogenesis. *Microbiology* 146: 14911504.

- Inada R, Ido Y, Hoki R (1916) et al. The etiology, mode of infection, and specific therapy of Weil's disease (Spirochaetosis Icterohaemorrhagica) J. Exp. Med. 23:377–402.
- Levett PN (2001) et al. Leptospirosis. Clin. Microbiol. Rev 14: 296326.
- Murcia C, Astudillo M, Romero M (2020) et.al. Prevalence of leptospirosis in vaccinated working dogs and humans with occupational risk. Biomedica 40 (Supl. 1):62-75.
- Murphy K (2018) et.al. Dealing with leptospirosis in dogs. Vet. Rec 183(12):384-385.
- Reagan K, Sykes J (2019) et. al. Diagnosis of Canine Leptospirosis. Vet Clin North Am Small Anim Pract 49(4):719-731.
- Schuller S, Francey T, Hartmann K (2015) et.al European consensus statement on leptospirosis in dogs and cats. J Small Anim Pract 56(3):159-79.
- Thomas DD, Higbie LM (1990) et al. In vitro association of leptospire with host cells. Infect. Immun 58:581585.

6. Rośliny domowe jako potencjalne niebezpieczeństwo dla kotów

Houseplants as a potential danger to cats

Adrianna Michniewicz

Katedra Fizjologii Klinicznej, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Opiekun naukowy: prof. dr hab. Jarosław Całka

Adrianna Michniewicz: michniewiczada@gmail.com

Słowa kluczowe: toksyny, zwierzęta domowe, zatrucia, glikozydy

Streszczenie

Hodowla i pielęgnacja roślin jest powszechna w wielu domach. Ludzie często kupują nowe rośliny bez dokładniejszej wiedzy dotyczącej gatunku, sposobu pielęgnacji, podlewania, czy toksyczności danej rośliny szczególnie w odniesieniu do zwierząt. Toksyczność roślin jest spowodowana dużą różnorodnością związków chemicznych, do których należą alkaloidy, glikozydy, białka, aminokwasy i wiele innych. Wiele roślin może powodować negatywne skutki w przypadku spożycia przez zwierzęta, w szczególności przez koty. Stąd każdy właściciel kota, posiadający rośliny w domu, powinien wiedzieć, które z nich są bezpieczne oraz znać postępowanie w przypadku ewentualnego zatrucia.

1. Wstęp

Z powodu specyficznej fizjologii koty są szczególnie wrażliwe na pewne substancje i związki chemiczne, których ich organizm nie potrafi prawidłowo metabolizować, co może prowadzić do zatrucia, a nawet śmierci. Koty kierują się głównie zmysłem węchu oraz dotyku. Nieprawdą jest powszechne przekonanie, że zwierzę zawsze wyczuwa substancje toksyczne, zawarte w roślinach i wystrzega się ich zjadania. Koty wychodzące często podgryzają źdźbła trawy, a te trzymane w domach i mieszkaniach, często interesują się roślinami doniczkowymi. Niektóre koty robią to sporadycznie, inne z entuzjazmem podgryzają każdą nową roślinę w domu, czy w ogrodzie. W celu utrzymania prawidłowej funkcji przewodu pokarmowego koty często zjadają roślin w celu ułatwienia usunięcia z przewodu pokarmowego m.in. zalegającej sierści. Dlatego warto znać rośliny, które posiadamy w swoim domu i pamiętać że rośliny nie działają na koty wyłącznie wabiąco, oszłamiająco i relaksująco. Istnieją też takie rośliny, które wywołują u tych zwierząt ciężkie dolegliwości, a w najgorszym przypadku zatrucie nimi może spowodować śmierć zwierzęcia (Peterson i Talcott 2001).

2. Opis zagadnienia

Toksyczność roślin, często zależy od ich gatunku. Często wpływ na zatrucie ma również, stan immunologiczny samego kota, zwierzęta o wyższej odporności, które spożyje kwiat o niskim stopniu szkodliwości mogą nie mieć żadnych objawów zatrucia, lub przejść je łagodnie, natomiast w przypadku zjedzenia tej samej nisko toksycznej rośliny przez kota z osłabioną odpornością efekt toksyczny będzie silniej wyrażony. Oczywiście istnieją również rośliny, które charakteryzują się wysoką toksycznością niezależnie od odporności kota, właściciele kotów powinni unikać hodowli takich roślin w domu. Toksyczność niektórych roślin wynika z ich mechanizmów obronnych. Niektóre rośliny zawierają substancje chemiczne, które w naturze chronią je przed zjedzeniem. Spożycie przez kota rośliny trującej może mieć katastrofalne skutki dla jego zdrowia, a nawet życia. Szczególnie niebezpieczne rośliny dla kota, to te, które zawierają związki takie jak: glikozydy, saponiny, alkaloidy, szczawiany wapnia i żywice. Co ważne, związki toksyczne dla zwierząt zwykle znajdują się w całej roślinie, czyli w łodydze, cebulach, korzeniach, liściach i kwiatach. Symptomy zatrucia często są niejednoznaczne i nietypowe, mogą być mylone z wieloma innymi schorzeniami. Jednak najczęściej początkowo występują objawy ze strony układu pokarmowego takie jak wymioty, biegunki, odwodnienie, zmniejszone łaknienie, bądź ślinotok. Innymi z objawów które mogą

występować w efekcie zatrucia roślinami, są objawy ze strony układu nerwowego takie jak nieskoordynowane ruchy zwierzęcia, zaburzenia równowagi, dezorientacja, drgawki, zaburzenia rytmu serca, czy niekontrolowane oddawanie kału lub moczu. Istnieje jeszcze wiele innych objawów zatrucia takich, jak bladeść błon śluzowych i języka, zwiotczenie mięśni problemy z połykaniem, nadmierne powiększenie źrenic lub ich zmniejszenie, duszności, nadmierna wokalizacja. Często kot z objawami zatrucia, staje się wycofany, szuka swojego miejsca z dala od domowników, dodatkowo przestaje jeść i pić, co tylko nasila objawy chorobowe. W ciężkich przypadkach wystąpić mogą problemy związane z niewydolnością wątroby i nerek. Charakterystyczne w przypadku zatruc jest mnogość i szybkość występowania objawów, w krótkim czasie zwierzę bez objawów chorobowych, zaczyna wykazywać znaczne pogorszenie stanu zdrowia. Jeśli kot, z dnia na dzień bez wyraźnej przyczyny staje się apatyczny, osowiały, odmawia posiłków, bądź występują inne z wyżej wymienionych objawów, można podejrzewać zatrucie i należy pilnie skonsultować się z lekarzem weterynarii.

3. Przegląd literatury

3.1 Działania toksyczne wywierane przez rośliny

Poziom toksyczności i nasilenie objawów, jak już wspomniano może być różne, a na jej wpływ ma wiele czynników. Główne działania toksyczne roślin to ich nefrotoksyczność, która prowadzi może do niewydolności nerek, hepatotoksyczność, która również może prowadzić do niewydolności narządu, kardiotoxyczności, objawiającej się zaburzeniami rytmu serca, hematotoksyczność wpływająca na hemopoezę i układ krążenia, neurotoksyczność i rzadziej występująca ototoksyczność. Pod względem chemicznym związki te są zaliczane do glikozydów to właśnie ta grupa substancji charakteryzuje się największą toksycznością dla kotów. Duża ich ilość znajduje się między innymi w aloesie (*Aloe*) czy oleandrze (*Nerium oleander*). Spożycie przez kota fragmentów wyżej wymienionych roślin, może spowodować ciężkie objawy zatrucia szczególnie ze strony przewodu pokarmowego (biegunka, wymioty), które nie leczone mogą doprowadzić nawet śmierć zwierzęcia (Peterson i Talcott 2001). Inne związki o właściwościach podobnych do glikozydów występujące w roślinach doniczkowych to saponiny, dodatkowo posiadające one silnie właściwości pieniące. Występują one między innymi w dracenie (*Dracaena*). W przypadku zatrucia tą rośliną, również mogą pojawić się objawy ze strony układu pokarmowego, a dodatkowo też zaburzenia rytmu serca, objawy nerwowe jak drgawki i śpiączka (Peterson i Talcott 2001). Toksyczne dla kotów są również szczawiany wapnia, występujące w roślinach w postaci nierozpuszczalnych kryształków. Można je odnaleźć między innymi w skrzydłokwiecie (*Spathiphyllum*), czy monsterze (*Monstera*). Same w sobie nie są toksyczne, jednak wywołują silne reakcje alergiczne, dodatkowo obciążają nerki, mogą prowadzić do ich przewlekłej niewydolności. Również żywice produkowane przez wiele gatunków roślin, między innymi popularną gwiazdę betlejemską (*Euphorbia pulcherrima*), działają drażniąco na układ pokarmowy i skórę (Peterson i Talcott 2001).

3.2 Doniczkowe rośliny toksyczne

Często rośliny, które hodujemy w mieszkaniu ze względu na ich walory estetyczne, czy właściwości oczyszczające powietrze, a nawet zdrowotne, okazują się niebezpieczne dla zwierząt (Mynett i Startek 2003). Aby zapobiec niekorzystnym zatruciom powinniśmy, upewnić się że rośliny które posiadamy w domu nie stanowią niebezpieczeństwa dla zwierząt. W niniejszej pracy zaprezentowane będzie kilka gatunków roślin doniczkowych toksycznych dla kotów.

Dracena

Dracena (*Dracaena*) to ogólna nazwa roślin w obrębie których możemy wyróżnić ponad 40 gatunków, należących do gromady roślin okrytonasiennych, klasy jednoliściennych, rodziny ruszczykowatych (*Ruscaceae*). W naturalnych warunkach (tropikalne i subtropikalne rejony Azji, Afryki i Wysp Kanaryjskich) dracena rośnie jako drzewo bądź duży krzew. W Polsce w warunkach domowych uprawia się głównie gatunki niskie (Peterson i Talcott 2001). Ich kwiaty są kremowe lub zielono-białe, zebrane w kwiatostany w typie baldachu lub kłosa. Słabo pachną, a w domu niemal nigdy nie kwitają. W Polsce najbardziej popularna jest dracena wonna (*Dracaena fragrans*). Główną

substancją biologicznie czynną o znacznej toksyczności są znajdujące się w liściach draceny saponiny o masie cząsteczkowej 600-1500 kDa. Obgryzanie liści przez kota zwykle prowadzi do zatrucia. Zwierzę zaczyna silnie się ślinić, ma rozszerzone źrenice, wymiotuje niekiedy z domieszką krwi (Adaszek i Garbal i in.2009). Roślina ta u kotów może wywołać biegunkę i poważne schorzenia nerek. Przyjęta w bardzo dużych dawkach może doprowadzić do porażenia mózgu i rdzenia, a także do uszkodzenia układu oddechowego i układu krążenia (Adaszek i Garbal i in. 2009). Kotów nie da się zniechęcić do obgryzania liści, dlatego dracenę trzeba usunąć z miejsc dla niego dostępnych, a w przyszłości nie kupować tego kwiatu do domu w którym mieszka kot.

Skrzydłokwiat

Skrzydłokwiat (*Spathiphyllum*) to roślina z rodziny obrazkowatych, która w naturze występuje w Ameryce Południowej i Środkowej (Meksyk, Brazylia, Kolumbia, Wenezuela, Peru), a także w Azji Południowo-Wschodniej i w zachodniej części Oceanii. Środowiskiem naturalnym skrzydłokwiatów są wilgotne lasy równikowe. Rodzaj ten obejmuje 49 gatunków, z czego dwa gatunki wykorzystywane są jako rośliny ozdobne w Polsce tj. skrzydłokwiat kwiecisty, inaczej bukietowy (*Spathiphyllum floribundum*) i skrzydłokwiat Wallisa (*Spathiphyllum wallisi*). Bywa nazywany lilią domową, określenie to zawdzięcza swoim pięknym, śnieżnobiałym kwiatom. Ma niewielkie wymagania, jest długowieczna i bardzo dekoracyjna. Znany ze swoich właściwości oczyszczających powietrze, przeprowadzone przez NASA badania udowodniły, że liście i kwiaty skrzydłokwiatu wchłaniają groźne dla ludzi i zwierząt związki chemiczne, w tym te, które mogą znajdować się w smogu, przede wszystkim benzen, formaldehyd, ksylen, tlenek węgla i trichloroeten (Peterson i Talcott 2001). Ponieważ częściowo oddaje wilgoć do otoczenia, może też delikatnie nawilżać powietrze w pokoju, co przydaje się szczególnie w okresie grzewczym. Z jednej strony jego właściwości są cenne dla ludzi i zwierząt, z drugiej jednak mogą poważnie im zaszkodzić (Kucharczak 2020). Liście i kwiaty tej rośliny zawierają alkaloidy i szczawiany wapnia, pogryzione przez koty mogą podrażnić skórę wokół ust i błonę śluzową jamy ustnej oraz gardła i przełyku. Jednym z objawów jest wówczas silne pieczenie i zaczerwienienie tych okolic. Połknięte, doprowadzają do wymiotów, a nawet do zaburzeń rytmu serca. Dlatego roślina ta zawsze powinna znajdować się poza zasięgiem kotów (Sulborska i Haratym i in. 2016).

Poinsecja

Wilczomlec nadobny, wilczomlec piękny, poinsecja nadobna, poinsecja, gwiazda betlejemka (*Euphorbia pulcherrima*) tę nazwę roślina zawdzięcza szczytowym liściom, zwanym przykwiatkami, które wspaniale się przebarwiają, kontrastując z niżej położonymi liśćmi o barwie zielonej. Kojarząca się z Bożym Narodzeniem poinsecja coraz częściej gości jako świąteczna ozdoba w naszych domach. Wilczomlecze zawierają we wszystkich swoich tkankach to jest korzeniach, liściach i łodygach, trujący biały sok mleczny zawierający lateks, który w kontakcie z błonami śluzowymi zwierzęcia może powodować silne podrażnienie i ból, co da się zauważyć poprzez ich zaczerwienienie, ślinienie, obrzęk, swędzenie i łzawienie. Warto pamiętać też, że sok w kontakcie z okiem może spowodować zapalenie spojówek, a nawet tymczasową ślepotę. Jeśli poinsecja zostanie połknięta przez kota, może wystąpić gorączka, biegunka i wymioty, czego skutkiem może być odwodnienie. Z rzadka występują objawy neurologiczne takie jak zaburzenia równowagi (Kucharczak 2020).

Zamiokulkas

Zamiokulkas zamiolistny (*Zamioculcas zamiifolia*) to wieloletnia roślina zielna należąca do rodziny obrazkowatych (Araceae). Roślina wytwarza krótkie, zdrewniałe kłącza średnicy do 4 cm. Roślina zbudowana jest z wielu wzniesionych liści właściwych. Podłużno-eliptyczne, ciemnozielone, skórzaste, zgrubiałe pojedyncze listki osiągają do 10cm długości. Roślinę wyróżniają mięsiste ogonki liściowe, które zwężają się w stronę wierzchołka. Wybieramy go do swoich mieszkań chętnie, bo nie potrzebuje dużo uwagi, jest niezwykle odporny, nawet na wielodniowe niedobory wody. Trujące kwiaty zawierają piekący sok działający drażniąco na skórę. Objawy zatrucia pojawić się mogą stosunkowo szybko a są to między innymi ślinotok, ból brzucha, wymioty, w poważniejszych

zatruciach drgawki i poważne upośledzenie układu pokarmowego i pracy nerek, a przy silnej reakcji nawet śmierć (Kucharczak 2020).

Lilie

Lilia (*Lilium*) to rodzaj bylin cebulowych z rodziny liliowatych, obejmujący około 115 gatunków. Lilie są często uprawiane jako rośliny ozdobne, zwłaszcza mieszańce, kultywary i odmiany, których powstało ponad 8 tysięcy. Gatunkiem typowym jest lilia biała (Mynett i Startek 2003). Koty zjadające lub ogryzające lilie narażone są na ciężkie zatrucie, które w przypadku niepodjęcia leczenia może nawet skończyć się śmiercią. Zatrucie liliami przebiega w sposób dwufazowy, ponieważ pierwsze objawy dotyczą zazwyczaj układu pokarmowego i występują krótko po spożyciu, są to między innymi wymioty, biegunka, brak apetytu, bardzo częsta nie są one zauważone przez opiekuna. Niestety, po tej pierwszej fazie, następuje druga, charakteryzująca się silną nefrotoksycznością która może doprowadzić do rozległego uszkodzenia nerek, a w przypadku ciężkiego zatrucia i braku podjętego leczenia, nawet do śmierci kota. Objawami drugiej fazy zatrucia są między innymi zwiększone pragnienie i oddawanie moczu, lub bezmocz który świadczy już o poważnym problemie z filtracją nerkową oraz bolesnością przy omacywaniu brzucha. Należy również pamiętać, że lilie jako rośliny całe są toksyczne dla kotów, tj. wszystkie ich części takie jak płatki, pręciki, czy nawet pyłek. Przy czym nie ma określonych danych ile trucizny musi zjeść kot, do wystąpienia objawów toksycznych. Dlatego nie zaleca się hodować lili w domostwach, w których mieszkają koty (Volmer PA 2000).

3.3 Ogrodowe rośliny toksyczne

Koty niewychodzące, łatwiej jest uchronić przed szkodliwym wpływem roślin zewnętrznych. W przypadku kotów, mających możliwość wychodzenia do ogrodów przydomowy, mamy do czynienia z narażeniem na działanie trujących roślin hodowanych w ogródkach. Niżej przedstawione będzie kilka gatunków, roślin ogrodowych potencjalnie trujących dla kotów

Hiacynt

Hiacynt (*Hyacinthus*) to rodzaj roślin z rodziny szparagowatych. Gatunkiem typowym jest hiacynt wschodni, występujący na obszarze od Turcji po Palestynę. Gatunek ten został szeroko rozpowszechniony jako roślina ogrodowa. Hiacynty mogą być uprawiane na ogrodowych rabatach, w pojemnikach na balkonach i tarasach, jak również pędzone w doniczkach w domu. Składa się z grona dzwonkowatych kwiatów o wspaniałym, oszałamiającym zapachu. Umiarkowanie trujące dla kotów są cebule, pędy i kwiaty hiacyntu. Objawy zatrucia są nieswoiste, takie jak ból żołądka, wymioty, biegunka i odwodnienie, których często właściciel może nie zauważyć (Dowers 2013).

Oleander

Oleander (*Nerium oleander*) to gatunek rośliny z rodziny toinowatych, pochodzi z basenu Morza Śródziemnego, gdzie chętnie obrasta brzegi strumieni. Ponieważ niskie temperatury są szkodliwe dla tej rośliny, w naszym klimacie uprawia się go jedynie w pojemnikach, często właśnie w przydomowych ogródkach. Roślinom zwykle nadaje się formę drzewka. Posiadają piękne kwiaty o średnicy 3-4 cm, występujące w wielu barwach, między innymi różowe, łososiowe, białe, sporadycznie żółte. Największym powodzeniem cieszą się odmiany pełne, które wyglądają, jakby były obsypane różyczkami. Roślina ta jest trująca w całości – substancje toksyczne (glikozydy oraz alkaloidy) są w liściach, łodygach, kwiatach i nektarze. Zjedzenie go przez kota może mieć bardzo przykre konsekwencje, z uwagi na obecność glikozydów i alkaloidów w roślinie. Roślina ta powoduje zmiany w rytmie ich serca, uszkadza koci układ pokarmowy, czasami prowadzi do śmierci zwierzęcia (Dowers 2013).

Bluszcz pospolity

Bluszcz pospolity (*Hedera helix*) jest długowiecznym, zimozielonym krajowym pnączem, należącym do rodziny araliowatych (*Araliaceae*). Jest jedynym przedstawicielem rodziny araliowatych we florze Polski i jedynym w niej pnączem o liściach zimotrwałych. Ozdobną częścią rośliny są jej liście, które, w młodości są owłosione, później błyszczące i skórzaste, mają ciemnozieloną blaszkę z wyraźną siatką jasnożółtych nerwów. Bluszcz kwitnie bardzo obficie, ale

dopiero na starszych egzemplarzach. Drobne, zielono-żółte kwiaty o średnicy do 4 cm pojawiają się na wzniesionych łodygach w formie wiech i przyciągają do siebie pszczoły. Kwiaty jednak stosunkowo szybko opadają. Koty i psy, ale również domowy drób powinny być chronione przed dostępem do tej rośliny. Najbardziej toksyczne dla czworonogów i ptactwa są liście bluszczu oraz jego jagody. Ich spożycie lub obgryzanie może wywołać u kota objawy ze strony układu pokarmowego takie jak bóle brzucha, wymioty i biegunkę oraz ślinotok (Chlopecka 2002).

3.4 Postępowanie w przypadku zatruc i ich zapobieganie

Jeżeli właściciela kota, zauważą niepokojące objawy zatrucia, bądź zaobserwuje, że zwierzę zjadło trującą roślinę powinien niezwłocznie zgłosić się do lekarza weterynarii. Czas w przypadku zatrucia ma kluczowe znaczenie, a im szybciej zwierzę otrzyma fachową pomoc, tym jest mniejsze ryzyko wystąpienia ostrych objawów zatrucia, czy śmierci. Zjedzenie trujących roślin, oprócz mniej szkodliwych objawów ze strony układu pokarmowego, jak biegunka, wymioty czy odwodnienie, może spowodować poważne problemy z sercem i układem krążenia m.in. arytmie i nadciśnienie lub zmiany ze strony układu oddechowego, takie jak duszności i poważne problemy z oddychaniem, a w przypadku niektórych roślin objawy ze strony układu nerwowego jak drgawki, stany spastyczne, obrzęk mózgu, a nawet śmierć zwierzęcia. Stąd, należy mieć na uwadze jakie rośliny znajdują się w domu i obserwować interakcje kotów z owymi roślinami. Nie wszystkie z roślin są potencjalnym zagrożeniem dla naszych pupili, będąc właścicielami kotów, nie trzeba rezygnować z pięknego ogrodu lub roślin w mieszkaniu. Aby jednak zapewnić bezpieczeństwo naszym zwierzętom właściciele muszą zadbać o to, by miał do tego bezpieczną przestrzeń roślinną w swoim otoczeniu. Stąd zaleca się aby przed zakupem, nowej rośliny do mieszkania lub kupnem sadzonek do ogrodu, sprawdzić ich potencjalną szkodliwość dla kota.

3.5 Zielona alternatywa i rośliny bezpieczne dla kotów

Kot najczęściej skubią i podgryzają rośliny, aby wywołać odruch wymiotny i oczyścić swój układ pokarmowy, między innymi w celu odkrztuszenia kłaczków z sierści. Specjalna trawa dla kotów, posadzona w doniczkce, ustawiona w miejscu dostępnym dla kota może pomóc w oczyszczaniu przewodu pokarmowego kota. Dodatkowo jest wiele roślin, dedykowanych kotom. Jedną z nich jest słynna kocimiętka, która przyciąga większość kotów i działa na nie oszałamiająco. Podobne właściwości do kocimiętki, wykazuje macierzanka tymianek, hodowana w doniczkach jak i na terenie ogrodu. Inną z roślin wpływającą na koty, jest waleriana, która je relaksuje i odstresowuje.

4. Podsumowanie i wnioski

Rośliny doniczkowe i ogrodowe, hodowane w domach i ogrodach, ze względu na swoje właściwości ozdobne, czy lecznicze, często nieświadomie mogą stanowić zagrożenie dla naszych kotów. Wynika to z obecności wielu substancji zawartych w roślinach, takich jak glikozydy, saponiny, szczawiany, czy inne, które u kotów wywołują objawy zatrucia. Przebieg i nasilenie zatruc po zjedzeniu toksycznych roślin, może być różny od niegroźnych objawów ze strony układu pokarmowego, po zaburzenia nerwowe, niewydolności narządowe, a nawet śmierć zwierzęcia. Często wiele objawów, jest nieswoistych, stąd reakcja właściciela na zatrucie, bywa opóźniona. Należy jednak pamiętać, że w przypadku wystąpienia, któregośkolwiek z objawów, bądź podejrzenia zjedzenia rośliny potencjalnie trującej, czas działa na niekorzyść zwierzęcia i może nasilać pogorszenie objawów, stąd jak najszybciej należy udać się po fachową pomoc. Aby zapobiec zatruciom, należy sprawdzić, toksyczność kwiatów posiadanych w domu i ogrodzie i powtarzać tą czynność przed każdym zakupem nowych sadzonek, czy kwiatków doniczkowych. Dom w którym mieszka kot, nie oznacza jednak, że nie można w nim hodować, żadnych roślin, należy jednak wybierać te nietoksyczne i obserwować zachowanie naszego zwierzęcia.

5. Literatura

- Adaszek L, Garbal M, Kutrzuba J, i. in. (2009) Przypadki zatruc dracaną u kotów. Życie Weterynaryjne 84: 8.
Chlopecka M (2002) Zatrucia roślinami u psów i kotów. Magazyn Weterynaryjny Tom 11:16-20.

- Dowers KL (2013) Kłopotliwe zatrucia u kotów. *Weterynaria po dyplomie* Tom 14:21-23.
- Kucharczak E (2020) Zatrucia u psów i kotów Cz. 3 - Ozdobne rośliny ogrodowe. *Weterynaria w praktyce* 17: 94-96, 98-100.
- Mynett K i Startek L (2003) Rośliny ozdobne. *Hortpress* 10: 123-131.
- Peterson ME, Talcott PA (2001) et. al. *Small Animal Toxicology*. W.B. Saunders Co.47(10):1014.
- Sulborska A ,Haratym W, Matysik-Woźniak A, i. in. (2016) Rośliny toksyczne niebezpieczne dla oczu. *Alergoprofil*, 12(1): 17-22.
- Volmer PA (2000) Zatrucia liliowatymi u kotów. *Weterynaria po dyplomie* Tom 1, str 73.

7. Mulardy

Mulards

Dawid Ziobro⁽¹⁾, Paweł Kawałko⁽¹⁾, Kinga Rokicka⁽¹⁾, Damian Spustek⁽¹⁾, Remigiusz Bagrowski⁽¹⁾, Justyna Batkowska⁽²⁾, Kamil Drabik⁽²⁾

⁽¹⁾ Studenckie Koło Naukowe Biologii, Hodowli i Użytkowania Drobiu, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

⁽²⁾ Instytut Biologicznych Podstaw Produkcji Zwierzęcej, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
Opiekunowie SKN: dr hab. Justyna Batkowska prof. UPL, mgr inż. Kamil Drabik

Dawid Ziobro: dawid.ziobro@onet.pl

Słowa kluczowe: kaczki, mieszance międzygatunkowe, chów, jakość mięsa

Streszczenie

W literaturze mianem mulardów określa się bezpłodne mieszańce międzygatunkowe kaczek. Jednak najczęściej mulardami nazywa się potomstwo uzyskane z kojarzenia kaczki pekin z kaczoziemnym. Ptaki te cechują się niską ilością tłuszczu okołojelitowego oraz wysokim udziałem mięśni piersiowych i nóg w tuszce. Niska zawartość tłuszczu w tuszce może świadczyć o walorach dietetycznych mięsa tych ptaków, dlatego też może ono mulardów może wzbudzać zainteresowanie konsumentów.

W Polsce chów mulardów jest stosunkowo mało popularny. Zdecydowanie bardziej rozpowszechniony jest on w krajach takich jak Francja, Węgry czy Bułgaria. Mulardy nie mają wysokich wymagań odnośnie warunków utrzymania, a sposób ich chowu jest bardzo zbliżony do chowu kaczek pekin czy piżmowych. Wysoka popularność chowu mulardów we Francji może wynikać z tego, że przy odpowiednim żywieniu uzyskuje się od nich stłuszczone wątroby, czyli *foie gras*, będące nie tylko przysmakiem, ale też sztandarowym produktem eksportowym.

Celem pracy było przedstawienie i omówienie procesu uzyskiwania, chowu oraz jakości surowca kaczek mulardów.

1. Wstęp

W 2016 roku Polska była trzecim co do wielkości producentem mięsa kaczego w Unii Europejskiej. Ponadto na przestrzeni 2012-2016 zwiększyło się pogłowie kaczek utrzymywanych w kraju o 43% oraz doszło do wzrostu eksportu produktów od nich pozyskiwanych (Pasińska i in. 2018). Obecnie na rynku mięsa kaczego w Polsce dominuje mięso uzyskiwane od kaczek pekin bądź piżmowych. Jednak w państwach zachodnich (Francja) na masową skalę utrzymuje się ptaki uzyskiwane z krzyżowania kaczek pekin oraz kaczorów piżmowych określanymi mianem mulardów. Chów tych ptaków nie różni się istotnie od chowu typowych kaczek mięsnych. Być może niewielkie zainteresowanie hodowców w Polsce może wynikać z problemów, jakie stwarza pozyskanie tych mieszańców, wymienić tu można chociażby stosunkowo niską płodność stad rodzicielskich oraz konieczność stosowania sztucznej inseminacji. Należy zaznaczyć, że surowiec uzyskiwany od mulardów może cechować się mniejszą zawartością tłuszczu w tuszy oraz wysoką aromatycznością i walorami smakowymi, co wpisuje się w preferencje konsumentów kaczego mięsa. Dlatego też, wydaje się, że należy przyrzeć się bliżej pozyskiwaniu, utrzymaniu i jakości surowców pochodzących od mulardów.

2. Opis ogólny

Mulardy są kaczkami pochodzącymi ze skojarzenia kaczoziemnego (*Cairina moschata*), stanowiącego komponent ojcowski z kaczkami rasy pekin (*Anas platyrhynchos*), jako komponentem matczym (Mohamed i in. 2016). Z uwagi na to, że takie połączenie jest krzyżowaniem międzygatunkowym, pochodzące z niego potomstwo jest bezpłodne (Różewicz i Kaszperuk 2017). Według doniesień Pingel (1999) największym producentem kaczek w Europie jest Francja,

a produkcja oparta jest na kaczkach piżmowych oraz na mulardach czyli właśnie mieszańcach dwóch gatunków. Tylko w samym 2004 roku mulardy pokrywały 90% całego zapotrzebowania mięsa kaczego we Francji, ponadto wykorzystuje się je do oryginalnych wyrobów takich jak *magrety* czyli filety z kaczek karmionych przymusowo. Warto też wspomnieć że w ciągu 20 lat pięciokrotnie wzrosła produkcja stłuszczonej wątroby - *foie gras* (Brun i in. 2005). Francja, Węgry i Bułgaria należą do trzech wiodących światowych producentów *foie gras* gęsi oraz właśnie z mulardów. W Bułgarii rocznie utrzymuje się około 5,5 milionów mulardów na stłuszczone wątroby (Ministry of Agriculture and Food, 2015).

Na skutek wspomnianego krzyżowania i wystąpienia efektu heterozji uzyskuje się mieszańce posiadające najlepsze cechy rodzicielskie, czyli bardzo dobre umięśnienie, a także, dzięki wykorzystaniu kaczki piżmowej, niski poziom otluszczenia, co jest niezwykle istotne dla konsumentów (Kapusta 2011). Dzięki takiemu doborowi komponentów matecznego i ojcowskiego mieszańce charakteryzują się wysoką masą ciała, wyższą procentową zawartością mięsa w tuszy, lepszej jakości wątrobą (zwiększeniu ulega procentowy udział tłuszczu w jej składzie), mniejszą ilością tłuszczu w tuszce oraz mniejszą podatnością na stres (Mohamed i in. 2016). Efekt heterozji obserwuje się również w znacznie lepszej odporności ptaków-mieszańców, w stosunku do ras rodzicielskich (Li i in. 2020). Mulardy ubijane są zwykle w wieku 10 tygodni, kiedy osiągną 70-80% wagi osobnika dorosłego.

2.1 Stada rodzicielskie

Ze względu, że mulardy są bezpłodną hybrydą samicy kaczki pekin i kaczoza piżmowego pracę hodowlaną prowadzi się na obu rodach rodzicielskich. Aby ją wdrożyć należy znać parametry genetyczne (odziedziczalność i korelacje genetyczne) oraz parametry krzyżowania (bezpośrednie i addytywne efekty genetyczne matki, efekt heterozji) istotne dla produkcji, a także istotne dla postępu genetycznego (Marie-Etancelin i in. 2008). Selekcja opiera się na genetycznej zmienności cech determinujących ilość i jakość mięsa oraz produkcję stłuszczonej wątroby (m.in. reprodukcja, wzrost, poprawa wykorzystania paszy i jakość produktów) i wiedzy z zakresu genetyki (heterozja, wpływ mateczny i inne parametry). Jedną z cech, która wykazała silny determinizm genetyczny zarówno u kaczek typu pekin (Pingel, 1999), jak i mieszańców (Larzul i in. 2004) jest konwersja paszy. Chociaż hodowcy wykazują zainteresowanie tą cechą, wskaźnik wykorzystania paszy jest uwzględniany w doskonaleniu kaczek tylko poprzez pośrednią selekcję skorelowanych cech. Szacuje się, że oznacza to stratę około 30% postępu genetycznego, który może być uzyskany w wyniku selekcji bezpośredniej (N'Dri i in. 2007).

Wg Gvaryahu i in. (1984) zadowalający wskaźnik zapłodnienia przy pozyskiwaniu kaczek mulardów (ok. 80%) daje utrzymywanie ptaków stada rodzicielskiego w bardzo wąskim stosunku płci (1♂:1,8♀). Już stosunek 1♂:2,5♀ obniża zapłodnienie do 57%. Przy sztucznej inseminacji stosowanej 2 razy w tygodniu był on jeszcze niższy i wyniósł 48%. W nowszych pracach (Sellier i in. 2005) dzięki sztuczemu unasiennianiu wskaźniki zapłodnienia w jajach mulardów wciąż były niższe niż dla czystych linii rodzicielskich, jednak wynosiły od 68-80%. Poprawa ta wynikała prawdopodobnie z postępu w stosowanych technikach inseminacyjnych, zaś uzyskane wyniki pozwalają by uznać je za najbardziej skuteczną metodę uzyskiwania mieszańców międzygatunkowych. Mazanowski (2008b) podaje, że sztuczna inseminacja gwarantuje większą liczbę uzyskiwanych mulardów oraz jest najbardziej wydajną metodą poprawy zapłodnienia. Jak twierdzi Watanble (1961) aby pozyskać ejakulat od kaczoza piżmowego należy zastosować metodę elektroejakulacji, ze względu na zbyt dużą szerokością pomiędzy udami oraz brakiem uległości na masaż. Następnie pobranym nasieniem od kaczorów piżmowych za pomocą wziernika inseminowane są samice kaczek pekin.

2.2 Warunki utrzymania stada rodzicielskiego i mulardów

Stado rodzicielskie utrzymywane jest z zachowaniem temperatury w przedziale od 8 do 12 °C, która jest najbardziej optymalna dla stada przy wilgotności na poziomie 60 - 70%. Utrzymuje się natężenie światła w kaczniku rodzicielskim 3-4 W/m². Długość dnia świetlnego dla kaczek w wieku 46 tygodni powinna wynosić 16 godzin i taka pozostać aż do końca cyklu nieśnego. Na jeden m² nie

powinno przypadać więcej niż 3 osobniki, jest to optymalna liczba ptaków zapewniająca im odpowiedni status zdrowotny i komfort bytowania (Mazanowski 2008a).

Odcłów piskląt prowadzi się w odchowniach, przy początkowej temperaturze 33 °C (przez pierwsze 3 dni życia ptaków). Później należy stopniowo obniżać temperaturę, aż do temperatury pokojowej (21 °C) w 14. dobie życia. Stosuje się żywienie fazowe, zgodnie z wymaganiami, które zmieniają się w raz z wiekiem ptaków. Minimalny okres tuczu kaczek mulardów trwa 63 dni i po tym okresie osiągają one średnią wagę ok. 4 kg. Średnie pobranie paszy na jednego ptaka podczas całego cyklu produkcyjnego wynosi ok. 11,9 kg, przy współczynniku jej wykorzystania ok. 2,98 (Ivanov i in. 2018).

Mulardy przybierają na masie wolniej na początku cyklu produkcyjnego w porównaniu do kaczek pekin oraz kaczek piżmowych. Mieszkańce te cechują się wyższą masą oraz lepszym wykorzystaniem paszy na kilogram masy ciała podczas całego cyklu produkcyjnego od wyżej wymienionych gatunków (Stateczny i in. 2015). Wykazano (Ivanov i in. 2018), że stosowanie odpowiedniej diety (gotowanej kukurydzy) oraz przymusowego karmienia może zwiększyć masę ciała kaczek nawet do 6,6 kg. Niestety technika przymusowego zadawania paszy zwiększa procent śmiertelności ptaków do 3,4%, podczas, gdy przy standardowym zadawaniu paszy wynosiła ona ok. 2,7%. Jednak kaczki karmione przymusowo pod koniec tuczu, które w pozostałym okresie chowu utrzymywane były w systemie intensywnym wykazują najlepsze efekty produkcyjne. Dzięki zastosowaniu takich metod można uzyskać nie tylko wysoko stłuszczone wątroby (*foie gras*), ale także dużą masę mięśniową tych kaczek (Guy i in. 1995).

2.3 Jakość mięsa mulardów

Mulardy ze względu na bezpłodność są ptakami przeznaczanymi na ubój, samice na mięso, a z samców po za mięsem pozyskuje się również stłuszczone wątroby, która uważana jest za przysmak w wielu krajach, a we Francji cieszy się szczególnym zainteresowaniem.

Mięso kaczki ze względu na swoje walory odżywcze i smakowe łączy cechy mięsa czerwonego i drobiowego. Wysoka zawartość białka oraz ważnych lipidów jak fosfolipidy i wielonienasycone kwasy tłuszczowe (PUFA) sprawia, że mięso mulardów jest towarem pożądanym przez konsumentów finalnych (Baeza 2006).

Mulardy wyróżnia prawidłowo ukształtowana tuszka z dużą ilością mięśni piersiowych i nóg (Kapusta 2011). Warto zauważyć również, że tuszki mulardów mogą cechować się wyższą masą mięśni nóg niż tuszki kaczek pekin (Wawro i in. 2004). Należy zwrócić uwagę, że mięśnie piersiowe i mięśnie nóg pochodzące od mulardów mogą cechować się mniejszą zawartością wody niż surowce pochodzący od kaczek piżmowych (Kokoszyński i in. 2020). Jak donoszą Wawro i in. (2004) tuszki mulardów mogą wykazywać się mniejszą ilością tłuszczu okołojelitowego niż te pozyskane od obu form rodzicielskich. Hassan i in. (2018) wskazują, że mulardy mogą cechować się wyższym procentowym udziałem wątroby niż kaczki piżmowe czy pekin. Na podstawie uzyskanych wyników przez Galin i in. (2017) stwierdzono, że tkanka mięśniowa i tłuszczowa kaczek mulardów jest bardziej aromatyczna w porównaniu do kaczki pekin. Mięso mieszańców charakteryzuje się bogatym i wyrazistym smakiem oraz zapachem, dlatego może to stanowić dla konsumenta dobrą wartość organoleptyczną. Całkowita liczba aminokwasów w mięsie mulardów jest wyższa od kaczek piżmowych o 1,02 g/100 g białka i pekińskich o 0,86 g/100 g białka co może sugerować wyższą wartość dietetyczną. Baeza i in. (2010) zaobserwowali, że mięśnie piersiowe kaczek mulardów 8 tygodniowych mogą charakteryzować się mniejszym procentowym udziałem kwasu mirystynowego (C14:0) w składzie kwasów tłuszczowych niż piersi mulardów 13 tygodniowych.

2.4 Stłuszczone wątroby

Zgodnie z ustawą o ochronie zwierząt z dnia 21 sierpnia 1997 (Dz. U. nr 111, poz. 724, 1997) w Polsce zabroniony jest tucz gęsi i kaczek na stłuszczone wątroby. Jednak w takich krajach jak Francja z uwagi na wielowiekowe tradycje zakaz taki nie obowiązuje i produkcja stłuszczonej wątroby jest powszechną praktyką, zaś *foie gras* ma status produktu regionalnego. Do produkcji stłuszczonej wątroby wykorzystuje się głównie mulardy. W 2001 roku karmiono przymusowo ponad 35 milionów kaczek mulardów, co stanowiło prawie 95% krajowej produkcji *foie gras* (Guémené i Guy, 2004). W 2020 r. w Unii Europejskiej wyprodukowano około 19 620 ton *foie gras* (przy czym

92,7% stanowiły wątroby pozyskane od kaczek, a 7,3% od gęsi). Szacuje się, że ten sektor produkcji generuje ponad 50 000 miejsc pracy w UE. UE produkuje około 90 % *foie gras* na świecie, pozostali producenci to Chiny, Stany Zjednoczone i Kanada. Według Eurostatu w 2020 r. eksport *foie gras* z UE do państw trzecich wyniósł 56 mln euro (<https://www.eurofoiegras.com/en/the-production/>).

Tucz mulardów na stłuszczone wątroby trwa około 14-16 dni. Przez ten okres ptaki są żywione paszą składającą się głównie z kukurydzy poddanej uprzednio obróbce termicznej, a wprowadzaną do przelęku za pomocą sondy. Taki sposób żywienia przyczynia się znacznie do powiększenia wątroby, stłuszczenia hepatocytów oraz zmiany jej zabarwienia (żółty kolor) (Szarek i in. 1997). Ptaki przyjmują tak dużą ilość energii, że wątroba ulega degeneracji, w jej komórkach gromadzi się tłuszcz. Czynnikiem sprzyjającym jest fakt, że stosowana w paszy kukurydza nie zawiera choliny, jako czynnika hepatoprotekcyjnego (Książkiewicz 2006).

Kolejnym sposobem wywołania stłuszczenia wątroby u mulardów może być podawanie arsenu. Dawka 40 mg/dzień może przyczyniać się do zwiększenia masy wątroby oraz jej stłuszczenia. Jednak w przypadku podania większej dawki (50 mg/dzień) może być ona śmiertelna (Chen i Chionut 2001). Jednak, z punktu bezpieczeństwa, surowiec pozyskiwany od kaczek mulardów, tu wątroby, może być potencjalnym zagrożeniem dla konsumentów, gdyż wątroba magazynuje szkodliwe substancje pełniąc w organizmie rolę filtra. Także arsen jest zaliczany do metali ciężki oraz może być przyczyną zwiększonego ryzyka wystąpienia chorób nowotworowych pęcherza, płuc oraz skóry u ludzi (Kondej i in. 2007; Georgescu i in. 2011) zwłaszcza, że wątroby kaczek mulardów mogą wykazywać się większą zawartością miedzi, kadmu i rtęci, niż wątroby kaczek piżmowych czy pekin, podobnie jak mięso, w którym stwierdzano wyższą zawartość rtęci (Lucia i in. 2007).

Dlatego też wydaje się, że najbezpieczniejszym z punktu widzenia konsumentów sposobem uzyskiwania stłuczonych wątrób wydaje się tuczenie ptaków kukurydzą podawaną za pomocą sondy do przelęku ptaków. Wen i in. (2016) przeprowadzili doświadczenie, w którym badano nadmierne zużycie paszy podczas przymusowego okresu karmienia w produkcji *foie gras*. Mulardy przymusowo karmiono od 91 do 102 dnia, podzielono na siedem grup, w każdej z nich ptaki były żywione inną ilością paszy w celu uzyskania maksymalnych przyrostów. Uzyskane wyniki sugerują że dla maksymalnego przyrostu masy ciała, całkowitej masy wątroby i względnej masy wątroby należy zadawać odpowiednio 217, 227 i 216 g paszy/kg. Wyniki istotnie mogą przyczynić się do zoptymalizowania kosztów produkcji i wychowu kaczek mulardów na stłuszczone wątroby.

3. Podsumowanie

Podsumowując chów mulardów może być opłacalną gałęzią produkcji drobiarskiej. Na korzyść ich utrzymania może przemawiać fakt wysokiej wartości dietetycznej mięsa, dlatego też ich mięso może być wykorzystywane jako żywność funkcjonalna. Na uwagę zasługuje również to że tuszki mulardów cechują się wysoką zawartością mięśni piersiowych i mięśni nóg. Ponadto ptaki te mogą cechować się wyższą odpornością, lepszym wykorzystaniem paszy niż kaczki pekin czy kaczki piżmowe. Cechy te mogą być efektem heterozji występującym tylko w pierwszym pokoleniu mieszańców. Natomiast zdecydowanie niekorzystnie na rozwój chowu mulardów wpływają wskaźniki reprodukcji stad rodzicielskich oraz konieczność stosowania sztucznej inseminacji, co wymaga wykwalifikowanych pracowników oraz znacznie podnosi koszty produkcji drobiarskiej.

4. Literatura

- Baeza E (2006) Major trends in research into domestic ducks and recent results concerning meat quality. [In:] Proceedings of 12th European Poultry Conference, Verona (Italy) 8.
- Baeza E, Salichon MR, Marche G i in. (2000) Effects of age and sex on the structural, chemical and technological characteristics of mule duck meat. *British Poultry Science* 41(3): 300-307.
- Brun JM, Richard MM, Marie-Etancelin C i in. (2005) The mule duck: genetic determinism of an intergeneric hybrid. *Productions Animales* 18(5): 295-308.
- Chen KL, Chiout PWS (2001) Oral treatment of mule ducks with arsenicals for inducing fatty liver. *Poultry Science* 80(3):2 95-301.

- Galin RF, Slobodjanik VS, Kuchmenko TA (2017) Breslavets physicochemical properties of meat of ducks of mulberries in modern technologies of meat products. Vestnik VGUIT [Proceedings of VSUET] 79: 2310-1202.
- Georgescu B, Georgescu C, Dărăban S i in. (2011) Heavy metals acting as endocrine disrupters. Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies 44(2): 89-93.
- Guémené D, Guy G (2004) The past, present and future of force-feeding and “foie gras” production. World's Poultry Science Journal 60(2):210-222.
- Guy G, Rousselot-Pailley D, Gourichon D (1995) Comparison of geese, mule duck and muscovy duck after cramming. Annales de Zootechnie 44(3):297-305.
- Gvaryahu G., Robinzon B., Meltzer A i in. (1984) Artificial insemination and natural mating in the crossbreeding of the Muscovy drake and the Pekin duck. Poultry Science 63(2): 386-387.
- Hassan FA, Roushdy EM, Zagloul AW i in. (2018) Growth performance, carcass traits and economic values of Pekin, Muscovy, and Mulard ducks. Slovenian Veterinary Research 55(20): 357-365.
- <https://www.eurofoiegras.com/en/the-production/>, dostęp: 31.12.2021
- Ivanov V, Lukanov H, Genchev A (2018) Attempts for optimisation of foie gras and meat production from mulard darkes. Trakia Journal of Sciences 16(1): 32-39.
- Kapusta F (2011) Drobiarstwo mięsne w Polsce i jego powiązania z rynkiem Unii Europejskiej. Ekonomia 16: 398-411.
- Kokoszyński D, Wilkanowska A, Arpášová H i in. (2020) Comparison of some meat quality and liver characteristics in Muscovy and mule ducks. Archives Animal Breeding 63(1): 137-144.
- Kondej D (2007) Metale ciężkie - korzyści i zagrożenie dla zdrowia i środowiska. Bezpieczeństwo Pracy: Nauka i Praktyka 2:25-27.
- Książkiewicz J (2006) Historia tuczu przymusowego drobiu wodnego na stłuszczone wtroby - aspekty badawcze i technologiczne. Wiadomości Zootechniczne 44(3): 82-87.
- Larzul C, Guy G, Bernadet MD (2004) Feed efficiency, growth and carcass traits in female mule ducks. Archiv für Geflügelkunde 68: 265–268.
- Li L, Zhang L, Zhang Z i in. (2020). Comparative transcriptome and histomorphology analysis of testis tissues from mulard and Pekin ducks. Archives Animal Breeding 63(2): 303-313.
- Lucia M, André JM, Bernadet MD i in. (2007) Concentrations of metals (zinc, copper, cadmium, and mercury) in three domestic ducks in France: Pekin, Muscovy, and Mule ducks. Journal of Agricultural and Food Chemistry 56(1): 281-288.
- Marie-Etancelin C, Chapuis H, Brun JM i in. (2008) Genetics and selection of mule ducks in France: a review. World's Poultry Science Journal 64(2): 187-208.
- Mazanowski A (2008a) Wychów i chów kaczek [W:] Mazurkiewicz M (red.) Choroby drobiu oraz ptaków ozdobnych, Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, Wrocław: 85-91.
- Mazanowski A (2008b) Wychów i chów kaczek piżmowych [W:] Mazurkiewicz M (red.) Choroby drobiu oraz ptaków ozdobnych, Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, Wrocław: 93-97.
- Ministry of Agriculture and Food (2015) Bulletin № 294. Activity of white meat slaughter houses in Bulgaria in 2012. Ministry of Agriculture and Food, Department Agrostatistics, Republic of Bulgaria.
- Mohamed RA, Abou-Ismaïl UA, Shukry M (2016). Effects of different monochromatic LED light colours on fear reactions and physiological responses in Mulard ducks. Animal Production Science 57(6): 1128-1136.
- N'Dri AL, Sellier N, Tixier-Boichard M i in. (2007) Genotype by environment interactions in relation to growth traits in slow growing chickens. Genetics Selection Evolution 39: 513–528.
- Pasińska D (2018) Polski handel zagraniczny kaczkami żywymi i mięsem kaczym w latach 2012-2016. Prace Naukowe Uniwersytetu Ekonomicznego we Wrocławiu 509: 317-327.
- Pingel H (1999) Influence of breeding and management on the efficiency of duck production. Lohmann Information 22: 7–13.

- Różewicz M, Kaszperuk K (2017) Charakterystyka kaczki piżmowej (*Cairina moschata*). Wiadomości Zootechniczne 55(1): 55–66 55-66.
- Sellier N, Brun JM, Richard MM i in.. (2005) Comparison of fertility and embryo mortality following artificial insemination of common duck females (*Anas platyrhynchos*) with semen from common or Muscovy (*Cairina moschata*) drakes. Theriogenology 64(2),: 429-439.
- Steczny K, Kuzniacka J, Adamski M (2015) Comparison of growth rate and body weight of ducks of different origins. Acta Scientiarum Polonorum. Zootechnica 14(3): 97-106.
- Szarek J, Fabczak J, Winnicki S i in. (1997) Zmiany morfologiczne wątroby kaczek podczas tuczu na wątroby stłuszczone. MedycynaWeterynaryjna 53(11): 661-664.
- Ustawa o ochronie zwierząt z dnia 21 sierpnia 1997 r. Dziennik Ustaw nr 111, poz. 724.
- Watanabe M (1961) Experimental studies on the artificial insemination of domestic ducks with special reference to the production of mule ducks. Faculty Fisheries and Animal Husbandry Hiroshima University 3(2): 439-78.
- Wawro K, Wilkiewicz-Wawro E, Kleczek K i in. (2004) Slaughter value and meat quality of Muscovy ducks, Pekin ducks and their crossbreeds, and evaluation of the heterosis effect. Archives Animal Breeding 47(3): 287-299.
- Wen ZG, Jiang Y, Tang J i in. (2016) Effect of feed consumption levels on growth performance and carcass composition during the force-feeding period in *foie gras* production of male Mule ducks. Animal 10(9):1417-1422.

8. Gatunki niszowe drobiu w Polsce

Niche species of poultry in Poland

Dawid Ziobro⁽¹⁾, Paweł Kawałko⁽¹⁾, Kinga Rokicka⁽¹⁾, Remigiusz Bagrowski⁽¹⁾, Justyna Batkowska⁽²⁾

⁽¹⁾ Studenckie Koło Naukowe Biologii, Hodowli i Użytkowania Drobiu, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

⁽²⁾ Instytut Biologicznych Podstaw Produkcji Zwierzęcej, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
Opiekunowie SKN: dr hab. Justyna Batkowska prof. UPL, mgr inż. Kamil Drabik

Dawid Ziobro: dawid.ziobro@onet.pl

Słowa kluczowe: bażant, perlica, kuropatwa, struś, chów

Streszczenie

Chów niszowych gatunków drobiu budzi coraz większe zainteresowanie hodowców w Polsce. Surowce uzyskiwane od tych ptaków mogą być z powodzeniem sprzedawane po wyższych cenach niż surowce uzyskiwane od najbardziej popularnych kur (niosek lub brojlerów), indyków czy kaczek, a nawet stanowić towar ekskluzywny, co może przełożyć się na opłacalność produkcji drobiarskiej, ponieważ konsumenci w Polsce poszukują produktów drobiowych atrakcyjnych wizualnie, o wysokich walorach smakowych i cechach prozdrowotnych.

Oprócz użytkowania w kierunku towarowym na uwagę zasługuje również utrzymywanie ptaków ze względu na ich atrakcyjny wygląd, czy oryginalny behavior. Dlatego też, chów gatunków niszowych drobiu w Polsce wpisuje się w rozwój agroturystyki. Rolnicy prowadzący gospodarstwa agroturystyczne mogą poprzez urozmaicenie różnorodności gatunkowej mogą rozwinąć swoją ofertę edukacyjną i wyróżnić się atrakcyjnością na tle innych gospodarstw.

Celem pracy było przedstawienie i omówienie chowu gatunków niszowych drobiu w Polsce oraz jakości surowców pozyskiwanych od tych ptaków.

1. Wstęp

Obecnie obserwuje się wzrost zainteresowania chowem niektórych gatunków drobiu w Polsce. Do gatunków niszowych, które są utrzymywane w naszym kraju, a niejednokrotnie nie są kojarzone z produkcją drobiarską, można zaliczyć perlice, bażanty, kuropatwy czy strusie afrykańskie. Mięso tych ptaków uważane jest za rarytas, ponieważ cechuje się wysokimi walorami smakowymi i odżywczymi. Co więcej oprócz mięsa i jaj można uzyskać od nich inne surowce, wykorzystywane między innymi w przemyśle kosmetycznym czy galanteryjnym. Dlatego, warto przyjrzeć się bliżej utrzymaniu gatunków niszowych drobiu w Polsce oraz jakości surowców uzyskiwanych od tych ptaków.

2. Niszowe gatunki ptaków zaliczane do drobiu

2.1 Perlice

Perlica zwyczajna (*Numida meleagris*), zaliczana jest do ptaków grzebiących, rzędu kuraków (*Galliformes*). Podobnie jak u kur perlice wykazują dymorfizm płciowy, cechy pozwalające na określenie płci to m.in. specyficzny hełm kostny, który różni się w zależności od płci, czy dzwonki (Szablicka i in. 2018). Jak podaje Pasinska (2018) Polska w 2016 roku, plasowała się na 19 pozycji jako największy eksporter mięsa i podrobów perliczych. Warto dodać że mięso perlicze charakteryzuje większa o 1,0-1,3% zawartość białka oraz mniejsza o 0,4-2,5% zawartość tłuszczu niż mięso kurecząt czy indyków rzeźnych (Pudyszak i in. 2005).

Perlice odznaczają się wysoką umiejętnością żerowania tzn. eksplorując wybieg, bezproblemowo znajdują sobie na nim pożywienie (owady, roślinność). Wykazują bardzo silny bahawior stadny, ale i terytorialny, można także zauważyć wyraźną hierarchię w stadzie, co sprawia, że wymagają one dość rozległego terenu. Minimalne warunki utrzymania fermowego zostały

określone w krajowym prawodawstwie (Pluta i in. 2019). W przypadku chowu z dostępem do wybiegu gęstość obsady wynosi 6 szt./m² w budynkach, natomiast 1szt./20 m² na wybiegu, w przypadku chowu intensywnego obsada ptaków nie może być większa niż 15 szt./m². Smulikowska i Rutkowski (2005) podają trzy okresy żywieniowe w odchowie perlic brojlerów i hodowlanych odpowiednio 0-3 tyg. życia, 4-8 tyg. oraz okres końcowy chowu. W poszczególnych okresach zmienia się zapotrzebowanie ptaków na białko i energię metaboliczną. Ptaki utrzymywane w celach hodowlanych otrzymują paszę o nieco niższych zawartościach białka i energii, co ma zabezpieczyć stada reprodukcyjne przed nadmiernym otluszczeniem.

Michalczuk i Siennicka (2010) porównały wydajność rzeźną oraz jakość mięsa pochodzącego od komercyjnych kurcząt broilerów oraz indyków rzeźnych z wynikami gatunków niszowych, wśród nich również perlic. Perlice cechowały się wysoką wydajnością rzeźną na poziomie 73,61% i wysoką ilością białka w mięsie z piersi oraz ud, odpowiednio 25,53 i 23,20 g co niewątpliwie stanowi znakomite wyniki pośród innych badanych gatunków ptaków. Bałowski i in. (2015) analizując mięsień piersiowy od różnych gatunków ptactwa łownego i hodowlanego, wykazali istotne różnice między gatunkami objętymi badaniami. Mięso kaczki, bażanta, gęsi, kuropatwy, gołębia i przepiórki cechowały mniejszy od ok. 84% do 95% obszarem tłuszczu śródmięśniowego niż mięso perlic. Sugerować to może wysoką soczystość i smakowitość mięsa perlicy cenioną wśród konsumentów.

Warto zwrócić uwagę na to że jaja perlicze charakteryzują się dobrą jakością i z powodzeniem stanowią alternatywę dla jaj kurzych w diecie człowieka. Według Moreki (2009) perlice mogą znosić jaja już w 16-17 tygodniu życia. Masa jaja wynosi około 40 g, zaś skorupa jaja charakteryzuje się wyższą niż u innych grzebiących grubością i wytrzymałością. Alkan i in. (2013) badali różnice jakościowe i skład jaj przepiórczych i perliczych. Uzyskane wyniki wskazują na wyższy stosunek żółtka do białka u perlicy (0,55) niż u przepiórki (0,52). U perlicy zaobserwowano również wyższy udział skorupy w masie jaja niż w przypadku przepiórki japońskiej (13,5% vs. 7,3%). Dane te wskazują na możliwość wykorzystania jaj perliczych jako jaj konsumpcyjnych, tym bardziej, że omówione wcześniej cechy ich skorup mogą pozwolić na ograniczenie strat surowca w czasie jego dystrybucji

2.2 Bażanty

Bażanty (*Phasianus colchicus*) są cenione od wielu lat, ich pióra wykorzystuje się do ozdoby strojów ludowych czy nakryć głowy, choć ptak ten posiada status gatunku łownego, a nie hodowlanego. Złoty okres utrzymywania bażantów w Polsce przypadał na lata międzywojenne, zaś okresem intensywnego rozwoju zamkniętych hodowli tych ptaków były lata pięćdziesiąte XX wieku. Zapotrzebowanie na te ptaki wynikało z konieczności odbudowy przetrzebionych po wojnie populacji zwierząt łownych (Dzięciołowski i in. 1971; Mazaraki 1993). Obecnie chów fermowy bażantów, poza utrzymywaniem go w hodowlach amatorskich i ogrodach zoologicznych, jest powiązany z potrzebami racjonalnie prowadzonej gospodarki łowieckiej (Mróz 2003; Gugala i Flis 2018). Pozyskiwanie łowieckie w powiązaniu z poprawą warunków środowiskowych i zasiedleniami na poziomie ok. 150 tys. ptaków rocznie przyczynia się do względnej stabilizacji populacji tego gatunku (Filis i in. 2019). W ostatnich latach utrzymywanie bażantów w tak zwanych "ptaszarniach" staje się również istotnym elementem uatrakcyjniania gospodarstw agroturystycznych i ma charakter amatorskiej hodowli przydomowej. Tego rodzaju hodowle nie mają jednak znaczenia w ujęciu produkcyjnym, natomiast fermowy chów bażantów w ujęciu gospodarczym jest nastawiony na produkcję wysokowartościowego materiału na potrzeby użytkowania rzeźnego lub nieśnego (o małej popularności) oraz głównie do wsiedleń (Gugala i Flis 2018).

Bażanty w fermach odchowywane są do wieku 3 miesięcy, a następnie powinny być przetrzymywane w wolierach adaptacyjnych przez 2-3 miesiące, w miejscach, gdzie mają być wypuszczone (Motyl i Sadkowski 2012; Sadliński 2012). W pojedynczej wolierze powinno być utrzymywane od 6 do 10 (maks. 20) ptaków, przy czym powierzchnia wolierzy to ok. 20–25 m² przy wysokości ok. 2,5–5 m, co ma istotne znaczenie dla zapewnienia ptakom możliwości chociaż krótkiego swobodnego lotu. Z reguły podaje się mieszanki pełnoporcjowe dostosowane do poszczególnych etapów rozwojowych w warunkach zbliżonych do naturalnych oraz imitujących

naturalne żerowanie. Ważne jest, aby pierwszych dniach życia zapewnić paszę zawierającą co najmniej 30% białka zwierzęcego (Gugała i Flis 2018).

2.3 Kuropatwy

Kuropatwa szara (*Perdix perdix*) jest ptakiem dziko żyjącym należącym do rodziny *Phasianidae* z rzędu *Galliformes*. Jest to ptak średniej wielkości około 30 cm, ważący od 290 do 475 g. Dziko występuje praktycznie w całej Europie oraz północnej części Azji. Kuropatwy charakteryzują się szybkim tempem wzrostu, ale trzeba im zapewnić wysokowartościowe pasze zwłaszcza w hodowli wolierowej. W wieku 12 tygodni mogą osiągnąć wielkość dorosłego osobnika (Kokoszynski i in. 2013). Śmiertelność kuropatw w hodowli wynosi około 10% ze względu na wysokie ryzyko rozprzestrzeniania się chorób zakaźnych (Nowakowska 2010). W naturze młode kuropatwy przez pierwsze 2-5 tygodni żywią się pokarmem składającym się głównie z obecnych w środowisku owadów dopiero później przechodzą one na pokarm roślinny (Panek 1992).

Bombik i in. (2019) stwierdzili, że żywienie młodych kuropatw w chowie fermowym pełnoporcjową mieszanką paszową dla indyków IB-1 (jest to mieszanka paszowa przygotowująca układ pokarmowy ptaków do przyswajania białka pochodzenia roślinnego) oraz IB2 (mieszanka paszowa pełnoporcjowa dla indyków w wieku od 6 do 12 tyg. życia) przynosi lepsze rezultaty w zakresie przyrostów masy ciała w porównaniu do stosowania paszy typu starter przeznaczonej do odchovu brojlerów kurzych.

Kuropatwy hodowane w celu wypuszczenia na siedliska łowieckie żywione są *ad libitum* paszami komercyjnymi przeznaczonymi dla bażantów. Mieszanka paszowa podawana kuropatwom zawiera 26,0% białka i 12,1 MJ ME do 2. tygodnia życia. Potem jej wartość pokarmowa jest mniejsza, odpowiednio 21,5% i 12,0 MJ ME od 4 do 5 tyg., 17% białka 11,9 MJ ME oraz i 11,9 MJ ME od tygodnia 5 do 16 tyg. Ptakom po 16 tyg. Podaje się ziarno pszenicy, nasionami rzepaku oraz grubo mielonym ziarnem kukurydzy.

Ptaki utrzymywane są w wolierach o wymiarach 15×25 m, a na każdego ptaka przypada min, 2,5 m². Należy w tym miejscu zwrócić uwagę na fakt spadającej liczebności kuropatw w środowisku przyrodniczym. Początkowo tendencje te obserwowano w Europie zachodniej, jednak wraz z intensyfikacją rolnictwa dotknęły one także populacji krajowych. Ma to związek z występowaniem monokultur rolniczych ograniczających bazę pokarmową tych ptaków, jak również ilość miejsc gniazdowania czy schronienia (Nasiadka i Świtalska, 2014). Utrzymanie stabilnej populacji jest zatem możliwe poprzez prowadzenie stałej reintrodukcji i wsiedleń oraz stworzenie odpowiednich warunków w środowisku naturalnym ptaków.

2.4 Strusie

Strusiarstwo jest relatywnie nową gałęzią produkcji rolniczej poza kontynentem afrykańskim (Utnik-Banas i Krawczyk 2011). W Polsce od dłuższego czasu można zaobserwować wzrost zainteresowania chowem ptaków bezgrzebieniowców tj. strusi, emu i nandu (Horbańczuk 2008; Horbańczuk 2016), z których największe znaczenie gospodarcze mają strusie (*Struthio camelus*) (Majewski, 2017). Paki te często wykorzystywane są w gospodarstwach agroturystycznych, gdzie można je oglądać, skosztować strusich produktów, nabyć pióra, jaja naturalne lub wykonane z nich ozdoby (Horbańczuk 2007). Początkowo strusie hodowano dla ich piór i skór, ponieważ skóra strusia jest cennym surowcem galanteryjnym i stanowi połowę wartości ptaka (Meyer i in. 2002). Surowce pozyskiwane od tych ptaków, głównie mięso, tłuszcz i ekstrahowany z niego olej, cieszą się od pewnego czasu coraz większym zainteresowaniem technologów, naukowców i konsumentów (Hoffman i in. 2012; Liu i in. 2011; Palanisamy i in. 2011). Mimo wysokich kosztów produkcji strusiny wysokie ceny zbytu produktów zapewniają zadowalający zysk.

Strusina jest mięsem wysokiej jakości, odznacza się subtelnym smakiem, delikatnością i niewielką kalorycznością tzn. zawiera mało tłuszczu (1,2%) i posiada niską zawartość cholesterolu (60 mg/100 g tkanki) (Cloete i in. 2012). Pod względem delikatności, smakowitości, zapachu i struktury najbardziej przypomina wołowinę (Walter i in. 2000). Pod względem technologicznym mięso strusia uzyskiwane w czasie rozbioru w ponad 70% jest zaliczane do I klasy jakości i (Żych 2005b), a z jednej tuszki można uzyskać 30 - 35 kg mięsa z czego ponad 20 kg w klasie I (Żych, 2005a).

Tłuszcz brzuszny u bezgrzebieniowców jest wykorzystywany do ekstrakcji cennego oleju, składnika kosmetyków, m.in. preparatów przeciwdoleźynowych. W zależności od płci, a także wieku oraz kondycji z jednego strusia po uboju można pozyskać od 5 do 7 kg tłuszczu (Morris i in. 1995). Profil kwasów tłuszczowych występujących w tłuszczu strusi jest zależny od umiejscowienia tkanki tłuszczowej w organizmie ptaka (np. wokół narządów wewnętrznych, w okolicy mostka i pod skórą na grzbiecie). Wykazano, że tłuszcz strusi z okolicy grzbieta i mostka zawiera znacząco więcej kwasów nasyconych niż brzuszny (Majewska i in. 2014). W badaniach Frontczk i in. (2008) stwierdzono, że tłuszcz brzuszny zawierał 31,2% nasyconych kwasów tłuszczowych (SFA), a grzbietowy 40,3%. Z kolei Grompone i in. (2005) nie stwierdzili w swoich badaniach różnic w składzie oleju wyekstrahowanego z tłuszczu podskórnego i brzuszego w analizowanym surowcu. Tłuszcz strusi zawiera także jednonienasycone kwasy tłuszczowe (MUFA), które pod względem ilościowym jest najwięcej, a także kwasy wielonienasycone (PUFA) (Majewski 2017). Dominującymi MUFA są kwasy oleinowy i palmitoleinowy, z czego ten pierwszy pełni funkcję pobudzającą regenerację naskórka oraz niweluje stany zapalne. Z kwasów PUFA występującym w największej ilości jest kwas linolowy, który poprawia barierę lipidową naskórka, chroni przed transepidermalną utratą wody i normalizuje metabolizm skóry (Zielińska i Nowak 2014). Mnogość zastosowań oraz udowodnione naukowo właściwości tłuszczów i olejów pochodzących od bezgrzebieniowców przyczyniają się do podniesienia zainteresowania chowem tych ptaków nie tylko jako egzotycznych atrakcji gospodarstw agroturystycznych, ale również w odchowie fermowym (Lambrechts i in. 2004; Mshelia i in. 2011).

3. Podsumowanie

Odnotowuje się wzrost zainteresowania hodowców się chowem gatunków niszowych drobiu, co może wynikać z tego, że surowce uzyskiwane od tych ptaków mogą być sprzedawane po wyższych cenach niż te uzyskiwane od bardziej popularnych gatunków ptaków. Dodatkowym aspektem jest Warto wspomnieć również o możliwości wykorzystania tych ptaków w gospodarstwach agroturystycznych jako atrakcji turystycznej. Ponadto chów wybranych gatunków niszowych (bażant, kuropatwa) jest szczególnie ważny przy introdukcji tych gatunków do środowiska naturalnego, co może przekładać się na utrzymanie odpowiedniego poziomu bioróżnorodności fauny. Dlatego też wydaje się, że chów i hodowla gatunków niszowych zasługuje na zainteresowanie producentów drobiu w Polsce.

4. Literatura

- Alkan S, Karsli T, Galiç A i in. (2013) Determination of phenotypic correlations between internal and external quality traits of guinea fowl eggs. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi* 19(5): 861-867.
- Balowski M, Kotowicz M, Zochowska-Kujawska J i in. (2015) Porównanie struktury i tekstury oraz jakości sensorycznej mięśni piersiowych wybranych gatunków ptactwa łownego i hodowlanego. *Postępy Nauki i Technologii Przemysłu Rolno-Spożywczego* 70(3):69-82.
- Bashir L, Ossai PC, Shittu OK i in. (2015) Comparison of the nutritional value of egg yolk and egg albumin from domestic chicken, guinea fowl and hybrid chicken. *Journal of Experimental Agriculture International* 6(5): 310-316.
- Bombik E, Kondracki S, Banaszewska D i in. (2019) Evaluation of the suitability of broiler chicken and turkey commercial feed mixes in the diets of grey partridge (*Perdix perdix* L.) during the rearing period. *Journal of Central European Agriculture* 20(1):130-142.
- Cloete SW, Brand TS, Hoffman LC i in. (2012) The development of ratite production through continued research. *World's Poultry Science Journal* 68(2): 323-334.
- Dzięciołowski R, Kowalina E, Plata Z i in. (1971) Bażant hodowla i użytkowanie. Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warszawa, 5–126.
- Flis M, Grela ER, Gugala D i in. (2019) Skład tuszki i profil kwasów tłuszczowych mięśni piersiowych samców i samic bażanta łownego (*Phasianus colchicus*). *Żywność Nauka Technologia Jakość* 26(1):111-124.

- Frontczak M, Krysztofiak K, Bilaska A i in. (2008) Characteristics of fat from African ostrich *Struthio camelus*. Electronic Journal of Polish Agricultural Universities 11(4): 1-11.
- Grompone M A, Irigaray B, Gil M (2005) Uruguayan nandu (*Rhea americana*) oil: A comparison with emu and ostrich oils. Journal of the American Oil Chemists' Society 82(9):687-689.
- Gugała D, Flis M (2018) Hodowla wolierowa bażantów–pasja czy źródło dochodu? Wiadomości Zootechniczne 4: 211–216.
- Hoffman LC, Brand MM, Cloete SWP i in. (2012) The fatty acid composition of muscles and fat depots of ostriches as influenced by genotype. South African Journal of Animal Science 42(3): 256-265.
- Horbańczuk JO (2007) Strusie w agroturystyce. Polskie Drobiarstwo 5:59-60.
- Horbańczuk JO, Tomasik C, Cooper RG (2008) Ostrich farming in Poland – Its history and current situation after accession to the European Union. Avian Biology Research 1(2):65-71.
- Kokoszynski D, Bernacki Z, Korytkowska H i in. (2013) Carcass composition and meat quality of Grey Partridge (*Perdix perdix* L.). Journal of Central European Agriculture 14(1):378-387.
- Lambrechts H, Swart D, Cloete SWP i in. (2004) The influence of stocking rate and male:female ratio on the production of breeding ostriches (*Struthio camelus* spp.) under commercial farming conditions. South African Journal of Animal Science 34(2): 87-96.
- Liu X, Wang F, Liu X, i in. (2011) Fatty acid composition and physicochemical properties of ostrich fat extracted by supercritical fluid extraction. European Journal of Lipid Science and Technology 113(6): 775-779.
- Majewska D, Szczerbińska D, Tarasewicz Z i in. (2014) Fatty acid profile of three fat depots from slaughter ostriches (*Struthio camelus*). Veterinarija ir Zootechnika 68(90):43-47.
- Majewski J (2017) Tłuszcz emu, strusi i nandu – możliwości wykorzystania i profil kwasów tłuszczowych. Postępy Techniki Przetwórstwa Spożywczego 1: 116-120.
- Mazaraki M (1993) Łowiectwo w Polsce. Krajowa Agencja Wydawnicza, Kraków.
- Meyer A, Cloete SWP, Brown CR i in. (2002) Declawing ostrich (*Struthio camelus domesticus*) chicks to minimize skin damage during rearing. South African Journal of Animal Science 32(3): 192-200.
- Michalczyk M, Siennicka A (2010) Właściwości dietetyczne mięsa różnych gatunków drobiu utrzymywanych w alternatywnych systemach chowu. Przegląd Hodowlany 78(11): 26-30.
- Moreki JC (2009) Guinea fowl production. Reach 1-11.
- Morris CA, Harris SD, May SG i in. (1995) Ostrich slaughter and fabrication: 1. Slaughter yields of carcasses and effects of electrical stimulation on post-mortem pH. Poultry Science 74(10): 1683-1687.
- Motyl T, Sadkowski T (2012) Program odbudowy populacji zwierzyny drobnej w województwie mazowieckim. V. kierunkowe działania i planowane przedsięwzięcia, [W:] Motyl T., Sadkowski T. (red.): Program odbudowy populacji zwierzyny drobnej w województwie mazowieckim. Nauka Łowiectwu, Warszawa 7:21-34.
- Mshelia WP, Abdu PA, Abdussamad AM i in. (2011) Ostrich Management practices in three states of Northern Nigeria. Veterinary World 4(2):64-67.
- Nasiadka P, Świtalska T (2014) Ocena potencjalnych zasobów pokarmowych i osłon dla kuropatw (*Perdix perdix*) w miejscach ich reintrodukcji w warunkach rolnictwa ekstensywnego. Syl 158(7): 539-552.
- Nasiadka P, Świtalska T (2014). Ocena potencjalnych zasobów pokarmowych i osłon dla kuropatw (*Perdix perdix*) w miejscach ich reintrodukcji w warunkach rolnictwa ekstensywnego. Syl 158(7): 539-552.
- Nowakowska J (2010) Hodowla zajęcy i kuropatw w Nadleśnictwie Świebodzin i program "Odbudowa populacji zanikających gatunków zwierzyny drobnej-zajęca i kuropatwy". Studia i Materiały Centrum Edukacji Przyrodniczo-Leśnej 2(25): 357-367.
- Palanisamy UD, Sivanathan M, Radhakrishnan AK i in. (2011) An effective ostrich oil bleaching technique using peroxide value as an indicator. Molecules 16(7): 5709-5719.
- Panek M (1992) The effect of environmental factors on survival of grey partridge (*Perdix perdix*) chicks in Poland during 1987-89. Journal of Applied Ecology 29: 745-750.

- Pasinska D (2018) Polski handel zagraniczny perliczkami żywymi i mięsem perliczym w latach 2012-2016. Roczniki Naukowe Stowarzyszenia Ekonomistów Rolnictwa i Agrobiznesu 20(4): 146-151.
- Pluta A, Różycka K, Drabik K i in. (2019) Możliwość chowu różnych gatunków drobiu w jednym gospodarstwie w aspekcie ich behawioru [W:] Chabuz W, Nowakowicz-Dębek B(red.) Aktualne problemy w produkcji zwierzęcej. Tom 2. Instytut Naukowo-Wydawniczy Spatium, Radom: 121-128.
- Pudyszak K, Pomianowski J, Majewska T. (2005) Wartość rzeźna i jakość mięsa perlic ubijanych w różnym wieku. Żywność Nauka Technologia Jakość 1(42):2 7-34.
- Sadliński H (2012) Hodowla i wsiedlanie kuropatw – porady praktyka [W:] Motyl T., Sadkowski T. (red.): Program odbudowy populacji zwierzyny drobnej w województwie mazowieckim. Nauka Łowiectwu, Warszawa 7:65-69.
- Smulikowska S, Rutkowski A (2005) Zalecenia żywieniowe i wartość pokarmowa pasz: Normy Żywienia Drobiu: praca zbiorowa. Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego PAN.
- Utnik-Banas K, Krawczyk J (2011) Opłacalność produkcji strusi w Polsce w latach 2006-2009 na przykładzie wybranej fermy. Roczniki Naukowe Stowarzyszenia Ekonomistów Rolnictwa i Agrobiznesu 13(2): 505-508.
- Walter JM, Soliah LA, Dorsett D (2000) Ground ostrich: A comparison with ground beef. Journal of the American Dietetic Association 100(2): 244-245.
- Zielińska A, Nowak I (2014) Kwasy tłuszczowe w olejach roślinnych i ich znaczenie w kosmetyce. Chemik 68(2): 103-106.
- Żych A (2005a) Charakterystyka właściwości technologicznych i wartości żywieniowej mięsa strusiego. Informator Masarski 5: 28-31.
- Żych A (2005b) Mięso strusia, jako źródło mięsa kulinarnego. Informator Masarski 4: 28-31.

9. Zastosowanie związków pochodzenia naturalnego w namnażaniu borówki wysokiej (*Vaccinium corymbosum* L.) w kulturach *in vitro*

The use of compounds of natural origin in the micropropagation of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) *in vitro*

Weronika Bil⁽¹⁾, Monika Figiel-Kroczyńska⁽²⁾, Arleta Kruczek⁽²⁾, Marcelina Krupa- Małkiewicz⁽¹⁾

⁽¹⁾Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin; Wydział Kształtowania Środowiska i Rolnictwa; Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

⁽²⁾Katedra Ogrodnictwa, Wydział Kształtowania Środowiska i Rolnictwa; Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

Weronika Bil: weronika.bil@wp.pl

Słowa klucze: zeatyna, zamienniki, mikrorozmnażanie, *Vaccinium corymbosum*

Key words: zeatin, substitutes, micromultiplication, *Vaccinium corymbosum*

Streszczenie

Zeatyna jest naturalną cytokininą występującą w wielu ekstraktach roślinnych. Jest aktywnym składnikiem między innymi mleka kokosowego, który wpływa stymulująco na wzrost roślin. Celem pracy było wykorzystanie mleczka kokosowego i wody kokosowej, jako tańszej alternatywy dla drogiego hormonu wzrost, jakim jest zeatyna w namnażaniu borówki wysokiej, potocznie zwanej borówką amerykańską w kulturach *in vitro*.

Materiał badawczy stanowiły eksplantaty pędowe borówki wysokiej (*Vaccinium corymbosum* L.) otrzymane z ustabilizowanej, sterylnej kultury *in vitro*. W doświadczeniu zastosowano 5 kombinacje pożywek według składu makro- i mikroelementów WPM (Lloyd and McCown, 1981): z dodatkiem 10 i 15% wody kokosowej, WPM z dodatkiem 10 i 15% mleczka kokosowego oraz WPM z zeatyną w stężeniu 0,1 mg/dm³. Próbę, do której zostały odniesione wyniki w doświadczeniu stanowiła pożywka WPM z zeatyną.

Ekplantaty borówki wysokiej o długości ok. 2cm wykładano po cztery sztuki do słoików o pojemności 200ml, uzupełnianych po 30 ml odpowiedniej dla danej grupy pożywki, a następnie próby inkubowano w fitotronie przez okres ok. 6 tygodni.

Po przeanalizowaniu otrzymanych wyników badań, stwierdzono, że dodatek 10% i 15% wody kokosowej do pożywki WPM wpływa pozytywnie na cechy morfologiczne borówki wysokiej takie jak: wysokość roślin, liczba pędów, świeża masa roślin oraz liczbę liści. W zależności od dawki wody kokosowej, zaobserwowano różnice w poprawie cech morfologicznych u roślin. Woda kokosowa może być stosowana jako niedroga alternatywa dla zeatyny. Mleczko kokosowe nie przyniosło oczekiwanych rezultatów.

Abstract

Zeatin is a natural cytokinin found in many plant extracts. It is an active ingredient of, among others, coconut milk, which stimulates plant growth. The aim of the study was to use coconut milk and coconut water as a cheaper alternative to the expensive growth hormone zeatin in the multiplication of highbush blueberry, commonly known as American Blueberry, in *in vitro* cultures.

The research material consisted of highbush blueberry shoot explants (*Vaccinium corymbosum* L.) obtained from a stabilized, sterile *in vitro* culture. In the experiment, 5 combinations of nutrients were used according to the composition of macro- and microelements of WPM (Lloyd and McCown, 1981): with the addition of 10 and 15% coconut water, WPM with the addition of 10 and 15% coconut milk and WPM with zeatin at a concentration of 0.1 mg / dm³. The sample to which the results of the experiment were compared was the WPM medium with zeatin.

2 cm long extracts of highbush blueberries were placed in four pieces in 200 ml jars, supplemented with 30 ml of a medium appropriate for a given group, and then the samples were incubated in a phytotron for about 6 weeks.

After analyzing the obtained test results, it was found that the addition of 10% and 15% coconut water to the WPM medium has a positive effect on the morphological features of highbush blueberry, such as: plant height, number of shoots, fresh plant weight and number of leaves. Depending on the dose of coconut water, differences in the improvement of morphological features in plants were observed. Coconut water can be used as an inexpensive alternative to zeatin. Coconut milk did not bring the expected results.

1. Wstęp

Borówna wysoka (*Vaccinium corymbosum*) znana jest również pod nazwą jagody amerykańskiej. Należy do gatunku z rodziny wrzosowatych (*Ericaceae*). W Polsce borówka wysoka należy do najmłodszych roślin sadowniczych jednak jej uprawa staje się coraz bardziej popularna. Borówka wysoka jest gatunkiem o dużym znaczeniu gospodarczym. Owoce borówki wysokiej są bogate w cenne substancje odżywcze. Świeże borówki zawierają: wodę (84%), węglowodany (9,7%), białko (0,6%) i tłuszcze (0,4%). 100 g owoców dostarcza 57.4 kcal (fdc.nal.usda.gov). Dodatkowo borówki są dobrym źródłem błonnika pokarmowego, witaminy C i cennych polifenoli. Badania Norberto i in. (2013) potwierdziły, że związki polifenolowe mają działanie przeciwzapalne i przeciwrakotwórcze. Pozostałe witaminy, w które obfituje borówka amerykańska to: witamina B1 (0,04 mg), witamina B2 (0,04 mg), witamina B3 (0,42 mg), kwas pantotenowy (0,12 mg), witamina B6 (0,05 mg), kwas foliowy (6,00 µg), witamina A (54,00 UI), witamina E (0,57 ATE) (Michalska, Łysiak 2015).

Borówkę wysoką rozmnaża się za pomocą sadzonek zielnych, półzdrewniałych, czy zdrewniałych, jest to jednak metoda wymagająca i trudna. Alternatywą dla tradycyjnego rozmnażania borówki wysokiej jest mikrorozmnażanie. Metoda ta zwiększa zdolność namnażania i ukorzeniania tych roślin. Hodowla tkanek roślinnych odnosi się do zagadnienia wszystkich metod klonowania komórek roślinnych do określonych celów w warunkach *in vitro*. Rozwój rośliny jest procesem długotrwałym w czasie, którego różnicujące się tkanki, prowadzą do rozwoju całego organizmu identycznego pod względem genetycznym z eksplantatem macierzystym. W procesie tym wykorzystywane jest zjawisko toipotencji komórek roślinnych. Eksplantaty namnaża się w sterylnych warunkach na pożywce z dodatkiem hormonów roślinnych. Metoda ta jest wykorzystywana do namnażania roślin, które są trudne do rozmnażania metodami konwencjonalnymi (Hempel 1986).

Problemem pojawiającym się przy hodowli tkanek roślinnych *in vitro* jest dobór prawidłowej pożywki. Pożywki uzupełnia się o dodatkowe substancje, które zapewniają optymalny wzrost. W mikrorozmnażaniu mogą być na przykład stosowane substancje biologicznie aktywne do których należą np. mleczko kokosowe i woda kokosowa, będące źródłem węglowodanów i wykazujących działanie podobne do roślinnych regulatorów wzrostu. W literaturze przedmiotu wiele jest doniesień (Boase i in. 1993, Ghazzawy 2019) o pozytywnym efekcie działania mleczka kokosowego i wody kokosowej na wzrost i rozwój roślin w kulturach *in vitro*.

Woda kokosowa to płynne bielmo otrzymywane z niedojrzałych orzechów kokosowych. Znajduje się ona w jamie owocu kokosa. Woda kokosowa posiada bardzo wiele zastosowań. Jest doskonale znana jako orzeźwiający napój na całym świecie. Jest bardzo pożywna i korzystnie wpływa na zdrowie. (Agyemang-Yeboah 2011). Woda kokosowa ma również szerokie zastosowanie w hodowli tkanek roślinnych (Ang 2005). Dzięki wyjątkowemu składowi może być stosowana jako dodatek do hodowli tkankowej roślin. Woda kokosowa składa się głównie z wody, która stanowi 94% oraz cukrów, witamin, związków mineralnych, aminokwasów, a także fitohormonów roślinnych. Ze względu na swoje właściwości, szczególną uwagę zwrócono na skład ilościowy fitohormonów, który określa się stosując metodę wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) (Ma i in. 2008). Woda kokosowa ze względu na swój bogaty skład substancji odżywczych, działa stymulująco na wzrost roślin.

Mleko kokosowe jest nieprzezroczystym płynem ekstrahowanym ze startego miąższu dojrzałych orzechów kokosowych. Mleko kokosowe jest bogatym źródłem manganu, miedzi, potasu, fosforu, błonnika pokarmowego i selenu. Ponadto, zawiera wapń, witaminę B1, B3, B5, B6, kwas foliowy, witaminę C i E (NIIR 2006, Janick 2008). W 1941 r. Johannes van Overbeek odkrył, że mleko kokosowe aktywnie pobudza wzrost roślin. Jego prace obejmowały kokos (*Cocos nucifera*),

który po raz pierwszy został użyty przez van Overbeeka do stymulacji wzrostu młodych zarodków *Datura stramonium* w hodowli *in vitro* (van Overbeek 1941).

Zeatyna jest powszechnie stosowana jako skuteczny hormon roślinny do inicjowania organogenezy w kulturach *in vitro* roślin. Zeatyna jest naturalnym hormonem roślinnym należącym do grupy cytokinin. Pierwszą wyizolowaną i zidentyfikowaną cytokininą naturalną była zeatyna. Zeatynę wyizolowano w 1964 r. z niedojrzałych ziarnach kukurydzy zwyczajnej (*Zea mays L.*), od której wzięła się jej nazwa. Zeatyna i jej pochodne naturalnie występują w wielu ekstraktach roślinnych i są aktywnym składnikiem między innymi mleka kokosowego.

Celem badania było porównanie wpływu związków pochodzenia naturalnego tj. mleczko kokosowe i woda kokosowa oraz zeatyny, na wzrost roślin borówki wysokiej (*Vaccinium corymbosum L.*) w kulturach *in vitro* roślin.

2. Materiały i metody

Doświadczenie przeprowadzone zostało w Katedrze Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin, Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie. Materiał badawczy stanowiły eksplantaty pędowe (*Vaccinium corymbosum L.*) borówki amerykańskiej odmiany Liberty otrzymane z ustabilizowanej, sterylnej kultury *in vitro*. W doświadczeniu zastosowano 5 kombinacje pożywek według składu makro- i mikroelementów WPM (Lloyd i McCown, 1981).

Pierwszy etap obejmował przygotowanie pożywek niezbędnych do założenia doświadczenia. W tym celu przygotowano 5 kombinacje pożywek WPM (Lloyd i McCown, 1981) z dodatkiem mleczka kokosowego i wody kokosowej w stężeniu 10% i 15% oraz WPM z dodatkiem $0.1\text{mg}/\text{dm}^3$ zeatyny, która stanowiła próbę kontrolną. Za pomocą HCl lub NaOH ustalono pH pożywek na poziomie 5.7- 5.8. Przygotowane pożywki poddano procesowi autoklawowania przez 19 min w 121°C i ciśnieniu 0.1MPa.

Etap drugi obejmował szczepienie eksplantatów borówki na pożywki. Eksplantaty borówki o długości 2cm wykładano po 4 sztuki do słoików o pojemności 150ml, uzupełnionych 30ml odpowiedniej kombinacji pożywki. Doświadczenie założono w 5 powtórzeniach po 4 rośliny w każdym słoiku. Na każdą próbę przypadało 20 eksplantatów. Szczepienie eksplantatów przeprowadzano pod komorą z laminarnym przepływem powietrza, w celu zapewnienia sterylnych warunków pracy. Tak przygotowane kultury inkubowano w fitotronie o temperaturze 21°C , 16 godzinnym oświetleniu ($40\ \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}^1$) przez 6 tygodni.

Po 42 dniach od momentu wyłożenia eksplantatów dokonano pomiarów cech morfologicznych, takich, jak wysokość roślin, liczba pędów, świeża i sucha masa oraz liczba liści na roślinie oraz pomiaru barwy liści borówki wysokiej. Pomiarów cech morfologicznych były wykonywane z użyciem suwmiarki i wagi elektronicznej. Pomiar barwy liści borówki amerykańskiej w układzie CIE $L^*a^*b^*$ zostały dokonane za pomocą kolorymetru Konica Minolta CR-400. Pomiarów wykonywano na wierzchniej stronie liścia borówki wysokiej.

Pomiary barwy oraz ich współrzędne oznaczono w międzynarodowym konwencjonalnym systemie kolorymetrycznym CIE $L^*a^*b^*$, gdzie: L^* określa barwę białą (100) i czarną (0), a^* określa barwę zieloną (-100) i czerwoną (+100), b^* określa barwę niebieską (-100) i żółtą (+100) (Rys 1). Stosowano typ obserwatora 10° oraz iluminant D65, a średnica otworu pomiarowego wynosiła 3 mm.

Otrzymane wyniki badań opracowano statystycznie w programie Statistica 13. Wykorzystano analizę wariancji dwuczynnikowej oraz test Tukey'a dla średnich. Różnice pomiędzy badanymi cechami szacowano na poziomie istotności $\alpha 0.01$ dla różnic wysoce istotnych i $\alpha 0.05$ dla różnic istotnych.

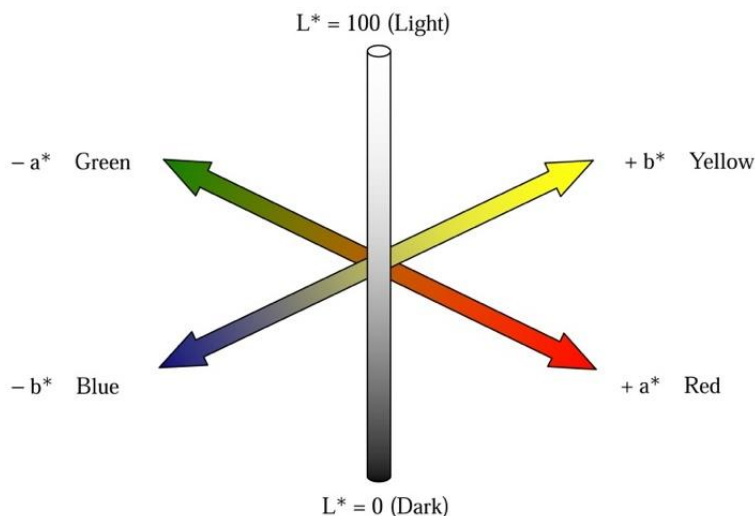
3. Wyniki

Na podstawie uzyskanych wyników badań zaobserwowano, że dodatek wody kokosowej w stężeniu 10 i 15%, miał pozytywny wpływ na takie cechy morfologiczne borówki wysokiej jak: wysokość roślin, liczbę liści oraz masę rośliny (Tab. 1).

Przeprowadzona analiza wariancji wykazała istotnie statystycznie różnice pomiarów cech morfologicznych. Wzrost kultur pędów był porównywany do pożywki WPM z dodatkiem $0,1\text{mg}/\text{dm}^3$

zeatyny. Wykazano, znacznie gorszy wzrost eksplantatów na pożywce z dodatkiem 10 i 15% mleczka kokosowego. Najlepszą elongację pędów pachwinowych zaobserwowano na pożywce z dodatkiem zeatyny. W warunkach tych najintensywniejsze było także powstawanie liści.

Rośliny borówki wysokiej na pożywkach WPM z dodatkiem 15% wody kokosowej charakteryzowały się najdłuższymi pędami (2,1 cm), największą liczbą pędów (1,5) oraz najwyższą świeżą masą roślin (0,04 g) w porównaniu do kontroli (rys. 2). Natomiast najniższe rośliny obserwowano na pożywce WPM z dodatkiem 10% i 15% mleczka kokosowego, gdzie ich średnia wysokość wynosiła 1,24 cm i 1,29 cm, odpowiednio (Tab. 1).



Rys. 1. Model barw CIE Lab.



Rys. 2. Eksplantaty pędowe borówki amerykańskiej 'Liberty' po 6 tygodniach wzrostu namnażane w kulturach *in vitro*.

Ponadto, zaobserwowano, zwiększenie stężenia wody kokosowej powodowało zwiększenie intensywności tworzenia pędów przybyszowych. Rośliny na pożywce WPM z dodatkiem 15% wody kokosowej wytworzyły ponad 1,5 pędów bocznych na roślinie (Tab1). Natomiast brak pędów przybyszowych obserwowano na eksplantatach borówki namnażanych na pożywce WPM z dodatkiem mleczka kokosowego, niezależnie od stężenia.

Przeprowadzona analiza wariancji pozwoliła stwierdzić, że liczba liści była zależna od rodzaju zastosowanego podłoża. Dodatek wody kokosowej nie wpłynął znacząco na masę roślin. Przy czym, średnią największą liczbę liści obserwowano na eksplantatach z pożywki WPM z dodatkiem 0.1 mg/dm³ zeatyny (18,75).

Tab. 1. Cechy morfologiczne borówki wysokiej ‘Liberty’ w zależności od zastosowanej pożywki.

Rodzaj pożywki	Wysokość rośliny [cm]	Liczba pędów na 1 roślinie	Świeża masa [g]	Sucha masa [g]	Liczba liści na 1 roślinie
WPM + 0,1 mg/dm ³ zeatyny	2,50c*	2,75b	0,11b	0,03c	18,75c
WPM + 10% mleczko kokosowe	1,24a	1,00a	0,02a	0,01a	1,29a
WPM + 15% mleczko kokosowe	1,29a	1,00a	0,01a	0,01a	1,38a
WPM + 10% woda kokosowa	1,97b	1,12a	0,03a	0,02b	8,58b
WPM + 15% woda kokosowa	2,08bc	1,50a	0,03a	0,02b	8,13b

*grupy jednorodne

Wyniki pomiarów wykazały zmiany parametrów barwy. Na podstawie uzyskanych wyników badań zaobserwowano, że dodatek mleczka kokosowego w stężeniu 10 i 15% miał wpływ na zmiany kolorów liści borówki amerykańskiej w porównaniu do kontroli (WPM+ 0.1 mg/dm³ zeatyny). W systemie CIE L*a*b* obniżenie wartości L* oznacza zmniejszenie ilości światła odbitego od badanego materiału, wynikiem czego jest jego pociemnienie. Liście borówki z pożywki kontrolnej i pożywki WPM uzupełnionej wodą kokosową, nie różniły się istotnie i znalazły się w jednej grupie jednorodnej (Tab.2).

Tab. 2. Składowe parametry barwy CIE L*a*b* mierzone na wierzchu liści borówki wysokiej

Rodzaj pożywki	L*	a*	b*
WPM + 0,1 zeatyny	36,00a*	-3,26a	22,48ab
WPM + mleczko kokosowe 10%	39,90ab	4,38b	21,40ab
WPM + mleczko kokosowe 15%	37,61a	5,08b	20,89a
WPM + woda kokosowa 10%	43,28ab	2,07ab	25,75b
WPM + woda kokosowa 15%	47,27b	-1,22ab	25,60b

*grupy jednorodne

Wartości parametrów a* i b*, gdzie -a* barwa zielona, +a* barwa czerwona, -b* barwa niebieska, +b barwa żółta, wskazują, że liście borówki były w zakresie barw od zielonej i czerwonej do żółtej.

Zmiany współrzędnej a* związane są z dodaniem do pożywki wody kokosowej i mleczka kokosowego, co spowodowało otrzymanie wartości dodatnich. W systemie CIE L*a*b* oznacza to wyeliminowanie tonu zielonego. Ujemną wartość współrzędnej a* odnotowano jedynie dla pożywki WPM z dodatkiem 15% wody kokosowej (Tab. 2).

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że po zastosowaniu mleczka kokosowego (niezależnie od stężenia) liście borówki były wybarwione na kolor czerwony w porównaniu do eksplantatów stanowiących kontrolę. Zaobserwowano również, że liście borówek z pożywki WPM z dodatkiem wody kokosowej różniły się między sobą wartością parametru a*. Różnica ta zależała od zastosowanego stężenia wody kokosowej (Tab. 2).

Zaobserwowano także, że borówki z tych pożywek charakteryzowały się statystycznie istotnym wzrostem parametru b*. W porównaniu do grypy kontrolnej (b*=22,48) parametr b* wzrósł o 14%, a rośliny z pożywek WPM + mleczko kokosowe, niezależnie od stężenia, stanowiły odrębną grupę jednorodną.

4. Dyskusja

Namnażanie borówki wysokiej w kulturach *in vitro* jest procesem długotrwałym. Ważny w tym procesie jest dobór odpowiedniej pożywki i substancji wspomagających morfogenezę i organogenezę roślin. W wielu badaniach pożywka WPM stosowana jest jako podstawowa pożywka do namnażania dla borówki. Niekiedy w badaniach stosowane są próby optymalizowania pożywki MS. W celu modyfikacji, łączy się podłoże WPM z pożywką MS. Na tak, zmodyfikowanym podłożu obserwowano najlepszy wzrost pędów (Tetsumura i in. 2008). Qiu (2018) wykazał skuteczność regenerowania pędów na pożywce WPM. Zaobserwowano również, że istnieje zależność pomiędzy odmianą, a organogenezą pędów. W przeprowadzonym badaniu, pożywka WPM z dodatkiem zeatyny wykazała pozytywne wyniki w indukowaniu proliferacji pędów.

Pożywka WPM z dodatkiem 2 mg/dm³ zeatyny jest komercyjną pożywką proliferacyjną. W badaniu Schuch (2019) wykazano, że skuteczne namnażanie borówki wysokiej jest możliwe dzięki zastosowaniu hodowli roślin w pierwszym etapie na pożywce WPM z dodatkiem zeatyny. Badania Šimala (2006) również potwierdziły, że zeatyna jest dobrym środkiem do indukowania tworzenia pędów u *Vaccinium* sp. Zastosowane w badaniu niskie stężenie zeatyny, 0,5 mg/dm³ działało najlepiej.

W niniejszym badaniu zastosowanie 0,1 mg/dm³ do pożywki WPM dało pozytywne efekty. Dodaną ilość można skutecznie wykorzystywać do proliferacji pędów w kulturach *in vitro* borówki amerykańskiej.

W literaturze przedmiotu wiele jest doniesień o wykorzystaniu wody kokosowej i mleczka kokosowego jako suplementu do pożywki wzrostowej w celu poprawy regeneracji komórek roślinnych (Buah 2014). Związki te wykazują podobne działanie na komórki roślinne jak naturalne cytokininy. W badaniach własnych również zaobserwowano pozytywne efekty dodatku mleczka i wody kokosowej do pożywki. Jednym z nich jest wzrost świeżej masy roślin borówki z pożywki WPM z dodatkiem 15% wody kokosowej.

Woda kokosowa zawiera różne cytokininy, które wspomagają podział komórek, a tym samym sprzyjają szybkiemu wzrostowi.

W wielu przypadkach dodatek do pożywki wody kokosowej pozwolił uzyskać satysfakcjonujące wyniki z regeneracją pędów u wielu gatunków (Anis i Ahmad 2016). Woda kokosowa jest znana jako substancja naturalna o wysokim poziomie zeatyny w swoim składzie, a w ostatnich latach stwierdzono zwiększone znaczenie jej zastosowanie w mikrorozmnazaniu gatunków ważnych gospodarczo.

Nasib (2008) przeprowadził porównawcze badanie namnażania kiwi z zastosowaniem wody kokosowej. Najlepsze efekty pod względem cech morfologicznych uzyskano po zastosowaniu 20% stężenia wody kokosowej. Ponadto, dodatek wody kokosowej pozwolił na dłuższy czas prowadzenia subkultury i produkcję wysoce odpornych roślin, które były w stanie przetrwać w warunkach cieplarnianych. W badaniu mającym na celu opracowanie skutecznego namnażania orzecha laskowego *Corylus avellana* L. również wykorzystano wodę kokosową. Wykazano, że dodanie 20% wody kokosowej, 2 mg/dm³ BAP i 0,5 mg/dm³ GA₃ do pożywki sprzyjało wydłużaniu i proliferacji pędów orzecha. Dodatkowo, wystąpił efekt synergiczny między regulatorami wzrostu, a wodą kokosową (Prando 2014). Jednocześnie w wyniku prowadzonych badań stwierdzono, że woda kokosowa działa pobudzająco na wzrost roślin borówki wysokiej.

Podobne badanie porównania skuteczność zeatyny i mleczka kokosowego przeprowadził Giridhar (2004). Porównane zostało synergistycznego działania zeatyny, syntetycznej cytokininy tidiazuronu (TDZ) i mleka kokosowego (CM), a także N 6-benzyloadeniny (BA).

Eksplantaty *Vanilla planifolia* hodowano na pożywce MS uzupełnionej zeatyną, BA + zeatyną, TDZ i TDZ + mlekiem kokosowym. Wykazano, że zeatyna i 10% mleczko kokosowe wspierają proliferację pędów wanilii (Giridhar 2004). Zalecane ilości stosowania mleczka kokosowego to 10-20%. W badaniu przeprowadzonym na kiwi *Actinidia deliciosa* var. *Deliciosa* potwierdzono, że zastosowanie 10% mleczka kokosowego jako dodatku do pożywki poprawia długość pędów, masę świeżych pędów, długość ogonków liściowych, liczbę pojedynczych węzłów,

powierzchnię liścia i masę świeżej kalusa. Badanie własne pokazuje, że dodatek mleczka kokosowego nie przynosi zadawalających wyników w przypadku namnażania borówki wysokiej.

Zastosowanie wody kokosowej jest bardzo interesujące, ponieważ wzrost roślin jest poprawiony dzięki użyciu naturalnego związku, który jest również ekonomiczny. W badaniach własnych w zależności od dawki wody kokosowej zaobserwowano różnice w poprawie cech morfologicznych u roślin. Porównanie wyników otrzymanych na pożywkach WPM z zeatyną i pożywkach WPM z dodatkiem wody kokosowej daje obiecujące wyniki.

5. Wnioski

- I. Dodatek wody kokosowej w stężeniu 10 i 15%, miał pozytywny wpływ na takie cechy morfologiczne borówki amerykańskiej jak: wysokość roślin, liczbę liści, masę roślin oraz na parametry $L^*a^*b^*$ barwy liści w warunkach *in vitro*.
- II. Wzrost pędów borówki wysokiej był najintensywniejszy na pożywce WPM z dodatkiem zeatyny, a także WPM z dodatkiem wody kokosowej.
- III. Zwiększenie koncentracji wody kokosowej powodowało stopniowy wzrost powstawania liści i pędów przybyszowych.
- IV. Woda kokosowa może być stosowana jako niedroga alternatywa dla naturalnego hormonu wzrostu - zeatyny.
- V. Mleczko kokosowe nie przyniosło oczekiwanych rezultatów.

6. Literatura

- Agyemang-Yeboah, F (2011) Health benefits of coconut (*Cocos nucifera* Linn.) seeds and coconut consumption. In Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention (pp. 361-367). Academic Press.
- Ang SL, Yong JWA (2005) Protocol for *in vitro* germination and sustainable growth of two tropical mistletoes. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 80, 221–228
- Anis M, Ahmad N et al. (2016) *Plant tissue culture: propagation, conservation and crop improvement*. Springer Singapore.
- Boase MR, Wright S, McLeay, PL (1993) Coconut milk enhancement of axillary shoot growth *in vitro* of kiwifruit. *New Zealand journal of crop and horticultural science*, 21(2), 171-176.
- Buah JN, Agu-Asare P (2014) Coconut water from fresh and dry fruits as an alternative to BAP in the *in vitro* culture of Dwarf Cavendish banana. *Journal of Biological Sciences*, 14(8), 521-526.
- Ghazzawy HS, El-Sharabasy SF (2019) Effect of natural additives as coconut milk on the shooting and rooting media of *in vitro* barhi date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Materials Research Proceedings*, 11, 186-192.
- Giridhar, P, Ravishankar G A (2004) Efficient micropropagation of *Vanilla planifolia* Andr. under influence of thidiazuron, zeatin and coconut milk.
- Hempel M (1986) Some economical aspects of commercial micropropagation. *Biotechnology & Bioindustry*, 1(5), 22-26.
- <https://fdc.nal.usda.gov> dostęp: 10.12.2021 r.
- Janick J, Paull RE (2008) Cocos In *The Encyclopedia of Fruit and Nuts*. pp. 109–113. Archived from the original on 18 May 2015. Retrieved 11 May 2015.
- Ma Z, Ge L, Lee A S et al. (2008) Simultaneous analysis of different classes of phytohormones in coconut (*Cocos nucifera* L.) water using high-performance liquid chromatography and liquid chromatography–tandem mass spectrometry after solid-phase extraction. *analytica chimica acta*, 610(2), 274-281
- Michalska Anna, Łysiak, Grzegorz (2015) "Bioactive Compounds of Blueberries: Post-Harvest Factors Influencing the Nutritional Value of Products" *Int. J. Mol. Sci.* 16, no. 8: 18642-18663.
- Nasib ASMA, Ali KASHIF, Khan S (2008) An optimized and improved method for the *in vitro* propagation of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) using coconut water. *Pak. J. Bot.* 40(6), 2355-2360.

- NIIR Board of Consultants and Engineers (2006) *The Complete Book on Coconut & Coconut Products (Cultivation and Processing)*. Asia Pacific Business Press Inc. p. 274.
- Prando M S, Chiavazza P, Faggio A, Contessa C (2014) Effect of coconut water and growth regulator supplements on in vitro propagation of *Corylus avellana* L. *Scientia Horticulturae*, 171, 91-94.
- Qiu D, Wie X, Fan S et al. (2018) Regeneration of Blueberry Cultivars through Indirect Shoot Organogenesis, *HortScience horts*, 53(7), 1045-1049.
- Schuch MW, Tomaz ZFP (2019) Advances in the spread of vegetative blueberry. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 41(1).
- Šimala D (2006) Microclonal propagation of *Vaccinium* sp. and *Rubus* sp. and detection of genetic variability in culture in vitro. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, 14, 1.
- Tetsumura, T, Matsumoto Y, Sato M et al. (2008) Evaluation of basal media for micropropagation of four highbush blueberry cultivars. *Scientia Horticulturae*, 119(1), 72-74.
- van Overbeek, J, Conklin, ME, Blakeslee AF (1941) Factors in coconut milk essential for growth and development of very young *Datura* embryos. *Science*, 94(2441), 350-351.

10. Zastosowanie substancji pochodzenia naturalnego do rozmnażania kaktusów w kulturach *in vitro*

Michalina Kędzierska ⁽¹⁾, Monika Figiel-Kroczyńska ⁽²⁾, Marcelina Krupa-Małkiewicz ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin; Wydział Kształtowania Środowiska i Rolnictwa; Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

⁽²⁾ Katedra Ogrodnictwa, Wydział Kształtowania Środowiska i Rolnictwa; Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

Michalina Kędzierska: michalina.kedzierska17@gmail.com

Słowa kluczowe: woda kokosowa, mleczko kokosowe, mikrorozmnażanie, *Echinopsis chamaecerus*.

Key words: coconut water, coconut milk, micropropagation, *Echinopsis chamaecerus*

Streszczenie

Kaktusy stanowią dużą grupę roślin o znaczeniu gospodarczym, są również jednymi z najbardziej zagrożonych gatunków roślin na świecie. W celu ich ochrony i zapewnienia ciągłości gatunku doskonalą się metody mikrorozmnażania, które są z reguły efektywniejsze od rozmnażania w sposób tradycyjny. Opracowanie składu pożywki zawierającej dodatek cytokinin jest zalecane u większości gatunków. Substancje naturalne takie jak wyciągi i ekstrakty roślinne są znanymi dodatkami do pożywek w kulturach *in vitro* roślin. Woda kokosowa jest bogatym źródłem cytokinin, główną aktywną cytokininą jest zeatyna trans. Ze względu na wysokie stężenie naturalnej cytokinin w wodzie kokosowej, jej dodanie do pożywki często ma taki sam efekt, jak dodanie komercyjnej cytokinin. Dodatek wody kokosowej do pożywki MS w stężeniu 15 % i 20% wykazał istotny wpływ na inicjację pędów kaktusa. Mleczko kokosowe nie jest szczególnie uznanym dodatkiem do pożywek w kulturach *in vitro* ze względu na wysoką zawartość tłuszczu. Mimo, że również w swoim składzie zawiera substancje fitohormonalne. Dodatek niskotłuszczowego mleczka kokosowego w stężeniu 15% i 20%, znacząco wpłynął jedynie na długość i liczbę korzeni. Może to świadczyć o obecności substancji wzmagających ryzogenezę kaktusa *Echinopsis chamaecerus*

Summary

Cacti are a large group of plants of economic importance and are also one of the most threatened plant species in the world. In order to protect them and ensure the continuity of the species, micropropagation methods are being improved, which are generally more effective than traditional propagation. The development of a nutrient solution based on the addition of cytokinins is recommended for most species. Natural substances such as plant extracts are well-known additives to *in vitro* culture media of plants. Coconut water is a rich source of cytokinins, the main active cytokinin being trans zeatin. Due to the high concentration of natural cytokinin in coconut water, adding it to the culture medium often has the same effect as adding a recognised commercial cytokinin. The addition of coconut water to MS medium at 15% and 20% concentrations showed a significant effect on cactus shoot initiation production. Coconut milk is not a particularly well known additive to *in vitro* culture media due to its high fat content. The addition of low-fat coconut milk at concentrations of 15% and 20% only significantly affected root length and number, which may indicate the presence of substances enhancing rhizogenesis in *Echinopsis chamaecerus*.

1. Wstęp

Kaktusy są roślinami wieloletnimi i wolno rosnącymi, które są szczególnie znane ze swojej tolerancji na suszę (rośliny kserofityczne). Zaliczane są do sukulentów. Charakteryzują się różnorodnością form, mogą mieć kształt kulisty, cylindryczny, kolumnowy, podłużny lub kładodialny, z cierniami rozmieszczonymi równomiernie wokół trzonu lub tworzącymi podłużne żebra. Ciernie kaktusów są wytwarzane przez wyspecjalizowane struktury zwane areolami. Są to wyspecjalizowane struktury będące rodzajem tkanki merystatycznej. Areole są cechą odróżniającą kaktusy od innych sukulentów. Wytworami areoli są również kwiaty i owoce, owocem jest zazwyczaj

wielonasienna jagoda. Rodzina *Cactaceae* pochodzi z kontynentu amerykańskiego i obejmuje ponad 2 000 gatunków, które są rozmieszczone głównie w czterech centrach różnorodności w regionach suchych i półsuchych. Najważniejszymi centrami różnorodności kaktusów są północno-środkowy region Meksyku aż po południowo-zachodnią część Stanów Zjednoczonych, oraz jałowa i półjałowa strefa południowo-zachodniej części Andów. Inne obszary o dużej różnorodności kaktusów to wschodnia Brazylia, region Ameryki Środkowej (Perez-Molphe-Balch 2015).

Rośliny te są ważnym źródłem pożywienia – przez co mają duże znaczenie gospodarcze (Hernandez i in. 2011). Uprawy kaktusów cieszą się coraz większym zainteresowaniem na całym świecie. Wiele gatunków jest sprzedawanych na rynku światowym jako rośliny ozdobne. Od XVI wieku w ogrodach botanicznych w Europie tworzono kolekcje kaktusów i sukulentów. Handel ogrodniczy jest obecnie głównym sposobem wprowadzania nowych kaktusów: 81% wszystkich gatunków kaktusów jest sprzedawanych na arenie międzynarodowej jako rośliny dorosłe lub nasiona do celów ozdobnych (Novoa i in. 2019).

Kaktusy należą do najbardziej zagrożonych grup taksonomicznych. Rośliny te doświadczają różnorodnych zagrożeń, przy czym dominującymi procesami (czyli bezpośrednią działalnością człowieka odpowiedzialną za degradację, niszczenie i/lub osłabianie różnorodności biologicznej) jest przekształcanie gruntów na potrzeby rolnictwa, zbieranie jako zasobów biologicznych oraz rozwój mieszkalnictwa i handlu. Zbieranie kaktusów dla zasobów biologicznych, na przykład dla kolekcji ozdobnych i drewna dotyczy 47% zagrożonych gatunków. Rolnictwo jest najbardziej rozpowszechnionym zagrożeniem dla kaktusów, dotyczącym gatunki w dużej części północnego Meksyku, Mezoameryki i południowej części Ameryki Południowej (Ortega-Baes i in. 2010; Goettsch 2015).

Metody rozmnażania *in vitro* są często wykorzystywane do konserwacji rzadkich kaktusów, a także do produkcji roślin w celach komercyjnych (Monostori i in. 2012). Rozwój kaktusów *in vitro* przebiega na ogół szybciej niż metodami tradycyjnymi. Po kilku miesiącach od założenia kultury można uzyskać kwitnące okazy. W krajach, gdzie kaktusy znajdują się za czerwonymi listami zagrożonych gatunków jak przykładowo w Meksyku, na szeroką skalę rozmnaża się kaktusy zagrożone, w celu wysycenia rynku konsumenckiego i ograniczenia ich pozyskiwanie ze środowiska naturalnego. Istotnym czynnikiem warunkującym efektywność rozmnażania jest skład pożywki na jakiej inicjowana jest kultura. Uwagę zwraca się na rodzaj i stężenie hormonów roślinnych, głównie z grupy cytokinin. Fitohormony te wpływają na wykształcanie nowych pędów (Wyka 2007). Najczęściej wykorzystywane jest medium według Murashige i Skoog (1962) - MS, ale w niektórych pracach naukowych, zaobserwowano, że również inne podłoża są dobre do wzrostu pędów bocznych kaktusa. Najkorzystniejszy sposób na aktywację pąków pachowych jest użycie pożywki o wysokim lub umiarkowanym, stężeniu cytokin. (Lema-Rumińska i in. 2014)

Woda kokosowa to wielojądrowe, płynne bielmo wewnątrz zielonych (młodych) orzechów kokosowych (bielmo nuklearne), które nie rozwinęło się w stałą tkankę złożoną z komórek. Później bielmo dojrzewa i osadza się na skórcie orzecha kokosowego podczas fazy komórkowej. Woda kokosowa została po raz pierwszy użyta w kulturach tkankowych przez Van Overbeek i in. w 1941. Stwierdzono, że dodanie wody kokosowej do pożywki hodowlanej jest niezbędne do rozwoju bardzo młodych zarodków *Datura stramonium*. Gautheret (1942) odkrył, że woda kokosowa może być używana do inicjowania i utrzymywania wzrostu w kulturach tkankowych kilku roślin, a Caplin i Steward (1948) wykazali, że kalus pochodzący z eksplantów tkanki łyka korzeni *Daucus carota* rósł znacznie szybciej, gdy do pożywki zawierającej IAA (kwas indolilo-3-octowy) dodana została woda kokosowa w stężeniu 15%. Powyższe badania potwierdzają zatem wysoką skuteczność wody kokosowej, istotnie wpływającą na inicjację podziałów komórkowych roślin. Kuraishi i Okumura (1961) wykazali, że woda kokosowa ma aktywność cytokininową i od tego czasu wyizolowano uznane naturalne substancje cytokininowe [9-β-D-rybo-furanozylozeatyna (Letham, 1968); zeatyna. Późniejsze badania dowiodły również obecność innych związków cytokininowych w wodzie kokosowej takich jak N6-izopentenyloladenina, dihydrozeatyna, trans-zeatyna, kinetyna, ortotopolina, O-glukozyd dihydrozeatyny, O-glukozyd trans-zeatyny, rybozyd trans-zeatyny, rybozyd kinetyny i rybozyd-5'-zeatyny trans-zeatyny. Ponieważ woda kokosowa zawiera naturalne cytokininy, dodanie go do pożywki często ma taki sam efekt, jak dodanie oczyszczonej zeatyny czy syntetycznej

kinetyny. Najbardziej aktywną cytokininą obecną w wodzie kokosowej jest zeatyna trans, a najobficiej występującą cytokininą w wodzie kokosowej jest rybozyd trans-zeatyny. W literaturze można spotkać różnice w objętościach wody kokosowej dodawanych do medium. Objętości zaczynają się od 5%, jednak w znacznej większości źródeł podane są stężenia 15% i 20% w pożywce (Thorpe i in. 2008; Yong i in. 2009; Mohd Lazim i in. 2015).

Mleczko kokosowe odnosi się do produktów płynnych otrzymywanych przez ucieranie stałego bielma z dodatkiem wody. Mleczko kokosowe charakteryzuje się wysoką zawartością tłuszczu i ma kremową konsystencję. W porównaniu z wodą kokosową, badania nad wodnym ekstraktem stałego bielma kokosowego nie są tak powszechne. Mimo to dane literaturowe wskazują na obecność czynników promujących wzrost i kiełkowanie nasion w hodowlach tkankowych- cytokinin (Yong i in 2009).

Stąd też, celem niniejszych badań było zbadanie wpływu wody kokosowej i mleczka kokosowego w dwóch stężeniach na mikrorozmnażanie pędów kaktusa (*Echinopsis chamaecerus*) jako alternatywy dla droższej komercyjnej zeatyny.

2. Materiały i metody

Doświadczenie przeprowadzono w laboratorium kultur tkankowych i komórkowych Katedry Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie. Materiał badawczy stanowiły stabilizowane kultury pędowe kaktusa (*Echinopsis chamaecerus*). Doświadczenie podzielono na dwa etapy. W pierwszym etapie doświadczenia pojedyncze pędy kaktusa wyłożono na trzy najbardziej popularne pożywki: MS (Murashige i Skoog, 1962), WPM (Lloyda i McCowna, 1980) i RA (Anderson, 1975). Etap ten miał na celu wybranie pożywki, której skład makro- i mikroelementów jest optymalny dla kaktusów i na której eksplantaty wykazały największy przyrost pędów bocznych. Eksplantaty o długości ok 2 cm inicjowano na pożywki w sterylnych warunkach w komorze z laminarnym przepływem powietrza. Inicjowano po 4 pędy w pozycji pionowej do słoiczeków uzupełnionych 30 ml pożywek w 4 powtórzeniach. Próby inkubowano w fitotronie przez okres 5 tygodni, w stałych warunkach świetlnych ($40 \mu\text{mol m}^{-1} \text{s}^{-2}$) i temperaturowych ($24 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2$). Po 5 tygodniach dokonano pomiarów cech morfologicznych, określając: liczbę pędów, długość i liczbę korzeni, świeżą i suchą masę oraz procentową zawartość wody.

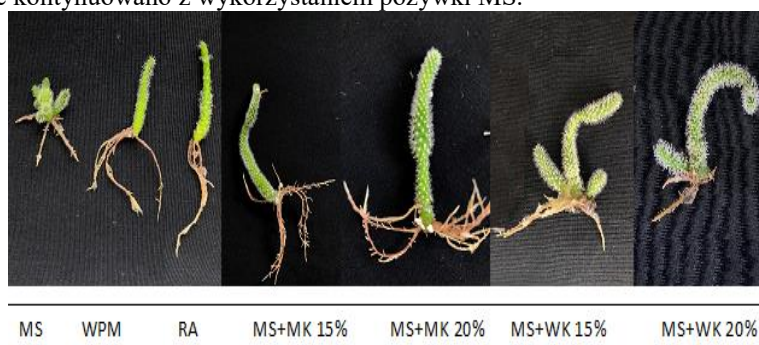
Na pożywce MS zaobserwowano największy przyrost pędów bocznych, dlatego tą pożywkę wybrano do dalszych badań. W drugim etapie doświadczenia sprawdzono skuteczność dodatku mleczka kokosowego (MK) i wody kokosowej (WK) w stężeniach 15% i 20% w namnażaniu pędów kaktusa. Kontrolę stanowiła pożywka bez żadnych dodatków. Pożywkę na bazie składu makro- i mikro-elementów MS suplementowano dodatkiem spożywczej wody kokosowej i mleczka kokosowego. Puskę z mleczkiem kokosowym wstępnie schłodzono w celu oddzielenia płynnego ekstraktu od tłustej kremowej masy. W ten sposób otrzymano ekstrakt z małą zawartością tłuszczu. Przygotowano 4 kombinacje pożywek: MS+15%MK MS+20%MK, MS+15%WK, MS+20%WK oraz pożywkę MS jako próbę kontrolną. W sterylnych warunkach eksplantaty pasażowano po 4 do słoiczeków uzupełnionych 30 ml pożywki. Każdą próbę przygotowano w czterech powtórzeniach. Próby inkubowano w fitotronie przez okres 5 tygodni w takich samych warunkach jak wcześniej. Po tym czasie dokonano pomiarów cech morfologicznych jak liczba nowych pędów długość i liczbę korzeni, świeżą i sucha masa, oraz zawartość wody. Wysokość wyłożonych eksplantatów nie była brana pod uwagę w badaniu.

Otrzymane wyniki opracowano statystycznie z wykorzystaniem programu Statistica 13.0 (StatSoft Polska, Cracow, Poland). Istotność statystyczną różnic między średnimi określono testem jednorodności wariancji i normalności rozkładu, a następnie metodą ANOVA z testem post hoc Tukeya. Istotność przyjęto na poziomie $p < 0,05$

3. Wyniki doświadczenia

Na podstawie uzyskanych wyników badań zaobserwowano, że najlepszą pożywką do namnażania kaktusów w kulturach *in vitro* wykazywały eksplantaty na pożywce MS (Rys.1). Na

pożywkach WPM i RA kaktusy po 5 tygodniach nie wykształciły pędów bocznych, dlatego doświadczenie kontynuowano z wykorzystaniem pożywki MS.



Rys. 1. Eksplantaty kaktusa po 5 tygodniach prowadzenia kultury *in vitro* (MS – Murashige i Skoog (1962), WPM – Woody Plant Medium, RA – (Rododendron Anderson, MK – mleko kokosowe, WK – woda kokosowa).

Dodatek niskotłuszczowego mleczka kokosowego i wody kokosowej wpłynęły istotnie na cechy morfologiczne kaktusa (Rys.1). Woda kokosowa istotnie wpłynęła na wykształcanie pędów bocznych. Rośliny miały średnio dwa lub więcej pędów. Na pożywce MS z dodatkiem wody kokosowej w stężeniu 15%, zaobserwowano 4 roślin z jednym pędem, a 8 roślin wykształciło 2 lub więcej pędów (Tab.1). Przy stężeniu 20% WK zaobserwowano 6 roślin z jednym pędem, a 6 wykształciło 2 lub więcej pędów. Zastosowanie mleczka kokosowego nie wpłynęło istotnie na inicjację pędów bocznych. Natomiast mleczko kokosowe wyraźnie wpłynęło na rozwój korzeni roślin. Dwie rośliny wykształciły po 1 korzeniu, natomiast 10 roślin miało 2 lub więcej korzeni. Mleczko kokosowe przez wpływ na rozwój korzeni przyczyniło się do większego pobierania wody średnio o 37% więcej wody w porównaniu z próbą kontrolną (Tab.1)

Tab. 1 Średnie wyniki pomiarów cech morfologicznych eksplantałów kaktusa namnażanych na pożywce MS z dodatkiem mleczka kokosowego (MK) oraz wody kokosowej (WK) w dwóch stężeniach 15 i 20%

pożywka	liczba pędów	długość korzeni [mm]	liczba korzeni	świeża masa [g]	sucha masa [g]	zawartość wody [%]
MS+15% MK	1.2 **	28.67 **	4.50 **	0.21 *	0.038 *	81.43 *
MS+15% WK	2.2 *	26.00 **	2.67 *	0.91 **	0.311 **	65.89 **
MS+ 20% MK	1.2 **	32.08 **	4,00 **	0.30 *	0.045 *	84.87 *
MS+ 20% WK	2.0 *	11.67 *	1.42 *	0.43 *	0.192 *	55.26 **
MS	1.2 **	18.56 *	2.56 *	0.20 **	0.107 **	47.24*

*, ** -grupy jednorodne ($p < 0,05$)

Przeprowadzona analiza wariancji wykazała, że średnie wartości pomiarów cech morfologicznych roślin zależą od rodzaju zastosowanej pożywki. Zastosowany test post-hoc wskazał grupy jednorodne wykazując brak różnicy w zastosowanych stężeniach WK i MK w badaniu liczby pędów, liczby korzeni, masy, zawartości wody i w przypadku mleczka kokosowego, również długości

korzeni. Różnica jest istotna w przypadku długości korzeni przy zastosowaniu WK, ponieważ korzenie po zastosowaniu 15 % WK są dłuższe niż przy 20% WK.

4. Wnioski i dyskusja

Zarówno mleczko kokosowe jak i woda kokosowa mają wpływ na wzrost i rozwój kaktusa w kulturach *in-vitro* roślin. Jednak to woda kokosowa wpłynęła istotnie na rozmnażanie, ponieważ stymulowała rozwój dodatkowych pędów. Dodatek 15% wody kokosowej indukował również proces ryzogenezy u eksplantatów kaktusa. Dodatek mleczka kokosowego nie wykazywał pozytywnego wpływu na proces namnażania roślin kaktusa. Skuteczność wody kokosowej jako czynnika stymulującego rozmnażanie dowiedziono w wielu badaniach. Socorro Santos-Díaz i in (2006) w badaniach nad rozmnażaniem kaktusa (*Ariocarpus kotschoubeyanus*) również zaobserwowali indukcję wytwarzania pędów przy zastosowaniu pożywki MS z dodatkiem wody kokosowej w stężeniach 10- 15%. Ci sami autorzy zalecali również pasaż eksplantatów w pozycji poziomej w celu przełamania dominacji wierzchołkowej, co również może wpłynąć na większą liczbę wytworzonych pędów. Według doniesień Vankatachalam i in. (2015) woda kokosowa może zwiększyć procent aktywowanych pąków pędów bambusa (*B. arundinacea*). Zastosowana kombinacja pożywki MS z dodatkiem 3 mg⁻¹ BAP (6-benzylaminopuryna) + 4% wody kokosowej + 4% sacharozy istotnie wpłynęła na regenerację pędów bocznych bambusa. Według Sandoval Prando i in. (2014) w rozmnażaniu orzecha laskowego, dodatek 20% wody kokosowej zwiększył liczbę pędów przybyszowych na eksplantacie. Według autorów samo użycie wody kokosowej jest w stanie znacznie poprawić liczbę pędów na eksplantat, jednak najlepsze rezultaty otrzymywano w połączeniu 2 mg⁻¹ BAP, 0.01 mg⁻¹ IAA i 0.5 mg⁻¹ GA₃ (kwas giberelinowy) kombinacja ta podwoiła efekt samej wody kokosowej. Ghazzawy i El-Sharabasy (2019) w badaniach nad rozmnażaniem palmy daktylowej (*Phoenix dactylifera* L) wykazali, że dodatek 10%, 20%,30% wody kokosowej do pożywki MS znacznie zwiększa liczbę nowych pędów oraz ukorzenie roślin w warunkach *in vitro*.

Mleczko kokosowe o niskiej zawartości tłuszczu wykazało działanie wzmagające ryzogenezę kaktusa i pobieranie wody podobnie jak zastosowanie wody kokosowej w stężeniu 15%. Korzenie roślin na pożywce MS uzupełnionej mleczkiem kokosowym były średnio 1,7 razy dłuższe i zawierały o 37% wody w porównaniu do roślin kontrolnych. Laslo i Zapârta (2011) w badaniu dotyczącym wpływu ekstraktu kokosowego na rozmnażanie chryzantemy (*Chrysanthemum morifolium* Ramat) wykazały inhibicję rozwoju systemu korzeniowego w przypadku zastosowania wysokich stężeń mleka kokosowego w połączeniu z cytokininami. Jednakże, mleko kokosowe w niskich stężeniach w połączeniu z cytokininami wykazywało pozytywny wpływ na wzrost roślin. Uzyskane wyniki badań mogły wskazywać na obecność w mleczku kokosowym substancji stymulujących ryzogenezę kaktusa przy niskim lub zerowym stężeniu cytokinin.

Wskazane są dalsze badania na większej grupie roślin oraz na innych gatunkach kaktusów, aby jednoznacznie stwierdzić czy dodatki te mogą być zalecane jako zamiennie źródło fitohormonów w rozmnażaniu kaktusów. Uwagę powinno również zwrócić się na technikę pasażowania, a dokładniej poziome ułożenie eksplantatów na pożywkę co według doniesień innych autorów może przynieść dodatkowe korzyści.

5. Literatura

- Ghazzawy H, El-Sharabasy S (2019). Effect of natural additives on the shooting and rooting media of *in vitro* Barhi Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) Bypalam conference Materials Research Proceedings 11: 186-192.
- Goettsch B, Hilton-Taylor C, Cruz-Piñón G (2015) High proportion of cactus species threatened with extinction. *Nat Plants* 1(1514):142.
- Hernández-Hernández T, Hernández HM, De-Nova JA i in. (2011) Phylogenetic relationships and evolution of growth form in Cactaceae (*Caryophyllales, Eudicotyledoneae*) *American Journal of Botany* 98(1): 44-61

- Lazim, Mohd Izwan Mohd i in. (2015) Quantification of cytokinins in coconut water from different maturation stages of malaysia's coconut (*Cocos nucifera* L.) varieties. *Journal of Food Processing and Technology* 6: 1-5.
- Lema-Rumińska J, Kulus D (2014) Micropropagation of Cacti—a Review. *Haseltonia*. 19:46-63.
- Monostori, T, Tanács L, Mile L (2012) Studies on *in vitro* propagation methods in cactus species of the genera *Melocactus*, *Cereus* and *Lobivia*. *Acta Horticulturae* 937:255-261.
- Novoa A, Brundu G, Day MD i in. (2019). Global Actions for Managing Cactus Invasions. *Plants* 8(10) :421
- Ortega-Baes P, Suhring S, Sajama J i in. (2010) Diversity and Conservation in the Cactus Family. *Desert Plants* 1(8): 157-173.
- Pérez-Molphe-Balch E, Socorro Santos-Díaz M i in. (2015) Tissue culture of ornamental cacti: *Scientia Agricola* 72 (6): 540-561.
- Perumal V, Kalamegam K, Sreeramanan S (2015). Influence of plant growth regulators (PGRs) and various additives on *in vitro* plant propagation of *Bambusa arundinacea* (Retz.) Wild: A recalcitrant bamboo species. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 13:193-200.
- Sandoval Prando MA, Chiavazza P, Faggio A, (2014) Effect of coconut water and growth regulator supplements on *in vitro* propagation of *Corylus avellana* L. *Scientia Horticulturae* 171: 91-94.
- Sandoval Prando MA, Chiavazza P, Faggio A, Cecilia C (2014). Effect of coconut water and growth regulator supplements on *in vitro* propagation of *Corylus avellana* L. *Scientia Horticulturae* 171: 91–94.
- Santos-Díaz M (2006). Effect of coconut water, darkness and auxins on morphogenesis of *Ariocarpus kotschoubeyanus* (*Cactaceae*). *Bradleya* 24: 83-88.
- Thorpe T, Stasolla C, Yeung E (2008) The components of plant tissue culture media II. Organic additions, osmotic and pH effects, and support systems. *Plant Propagation by Tissue Culture* 1: 115-173.
- Wyka T (2007) Sukulenty z próbówki. *Kaktusy i inne* 2(4): 58-63.
- Yong JW, Ge L, Ng YF, in. (2009) The chemical composition and biological properties of coconut (*Cocos nucifera* L.) water. *Molecules* 14(12):5144-64.

11. Zmienność strukturalnych elementów komórkowych *Porphyromonas gingivalis*: przegląd badań molekularnych

Variability of structural elements of the *Porphyromonas gingivalis* cell: an overview of molecular studies

Strzelec Karolina⁽¹⁾, Dziędzic Agata⁽¹⁾, Uroczynska Marta⁽¹⁾, Aptekorz Małgorzata⁽²⁾, Plakwicz Paweł⁽³⁾, Chomyszyn-Gajewska Maria⁽⁴⁾, Gawron Katarzyna⁽¹⁾

⁽¹⁾ Katedra Biologii Molekularnej i Genetyki, ⁽²⁾ Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Wydział Nauk Medycznych w Katowicach, Śląski Uniwersytet Medyczny, Katowice

⁽³⁾ Katedra Periodontologii i Chorób Błony Śluzowej, Wydział Dentystyczny, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa

⁽⁴⁾ Katedra i Zakład Periodontologii i Klinicznej Patologii Jamy Ustnej, Wydział Lekarski, Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum, Kraków
Opiekun naukowy: dr hab. n. med. Katarzyna Gawron

Karolina Strzelec: karolina.strzelec@infoart.pl

Słowa kluczowe: *P. gingivalis*, przewlekłe zapalenie przyzębia, czynniki wirulencji, LPS, fimbrie

Streszczenie

Bakterie z gatunku *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) są kluczowym czynnikiem etiologicznym przewlekłego zapalenia przyzębia (cPD, *chronic periodontitis*). Komórki *P. gingivalis* kolonizują beztlenowe oraz mikroaerofilne nisze w obrębie jamy ustnej stanowiąc typowy gatunek komensalny, czyli oportunistycznie patogenny. Do manifestacji obrazu klinicznego cPD dochodzi w wyniku gwałtownego namnażania i zaburzenia równowagi między ilością bakterii *P. gingivalis* i innych gatunków kolonizujących kieszonki dziąsłowe (zmiana charakteru z saprofitycznego na pasożytniczy) oraz odpowiedzi immunologiczną gospodarza. W przebiegu cPD dochodzi do krwawienia i obrzęku dziąseł, zwiększenia głębokości kieszonek dziąsłowych, a ostatecznie do resorpcji kości wyrostka zębodołowego i utraty zębów. Do najważniejszych czynników wirulencji *P. gingivalis* należą enzymy proteolityczne, lipopolisacharyd (LPS) oraz fimbrie. Z uwagi na ich istotne znaczenie w rozwoju cPD stały się one w ostatnich latach celem licznych badań w kraju i na świecie. Ponadto, istnieją doniesienia w których zademonstrowano, iż na stopień patogenności *P. gingivalis* wpływają modyfikacje bakteryjnych czynników wirulencji na poziomie transkrypcji genów, a także modyfikacje potranslacyjne. W związku z tym, celem pracy jest omówienie roli zmian na poziomie sekwenacji genów kodujących LPS i białka fimbrii *P. gingivalis* w wirulencji bakteryjnej oraz patogenezie cPD.

1. Wstęp

Choroby jamy ustnej i przyzębia stanowią niezwykle istotne zagadnienie w zakresie zdrowia publicznego. Prawidłowy stan jamy ustnej wraz z tworzącymi ją elementami strukturalnymi niezbędny jest do utrzymania homeostazy ustrojowej, a tym samym zachowania zdrowia pacjenta.

Zasadniczo wyróżnia się pięć głównych grup chorób przyzębia określanych mianem periodontopatii do których zalicza się: przewlekłe zapalenie przyzębia (cPD, *chronic periodontitis*), agresywne zapalenie przyzębia, stany martwiczo-wrzdziejące przyzębia i martwiczo-wrzdziejące zapalenie dziąseł oraz wrodzone zapalenie przyzębia i zapalenie przyzębia towarzyszące innym jednostkom ogólnoustrojowym. Podział na przedstawione jednostki chorobowe uzależniony jest od czasu trwania i nasilenia objawów klinicznych oraz stopnia rozwoju patogennej flory bakteryjnej płytki nazębnej, przy czym, najpowszechniej występującą chorobą infekcyjną przyzębia jest cPD (Curtis i in. 2020; Highfield 2009, Potempa i in. 2021).

Zgodnie z definicją cPD jest złożoną, zapalną chorobą tkanek aparatu przyzębia człowieka o pierwotnej etiologii bakteryjnej. Szacuje się, że choroba ta rozwija się u ok. 30% dorosłej populacji na świecie. W zależności od lokalizacji głównych objawów klinicznych wyróżnia się dwa kryteria

podziału cPD na zlokalizowane oraz uogólnione. W zależności od lokalizacji głównych objawów klinicznych i stopnia zaawansowania obrazu klinicznego, wyróżniono cPD o przebiegu łagodnym, średniozaawansowanym oraz zaawansowanym (Highfield 2009; Gawron i in. 2019).

Manifestacja symptomów klinicznych cPD spowodowana jest toczącym się procesem zapalnym w obrębie tkanek przyzębia i objawia się krwawieniem dziąseł, pogłębieniem kieszonek dziąsłowych oraz resorpcją kości wyrostka zębodołowego, prowadzącą w ostateczności do utraty zębów i związanych z tym powikłań w obrębie jamy ustnej.

Rozwój cPD uzależniony jest od wielu czynników, takich jak wiek, płeć, uwarunkowania genetyczne, czynniki środowiskowe, m.in. brak zachowania higieny jamy ustnej, błędy dietetyczne, czy brak systematycznych kontroli stomatologicznych oraz palenie tytoniu. Podstawowym czynnikiem etiologicznym cPD jest dysbioza w obrębie biofilmu bakteryjnego zlokalizowanego w płytce nazębnej. Bakterie gatunku *P. gingivalis* zawsze kolonizują beztlenowe i mikroaerofilne nisze ekologiczne w jamie ustnej będąc typowymi bakteriami komensalnymi, tj. oportunistycznie patogennymi. Na rozwój cPD wpływa zarówno obecność mikroorganizmów oportunistycznych, jak i czynników towarzyszących beztlenowej florze mikroorganizmów. Prowadząca do dysbiozy proliferacja i kolonizacja periodontopatogenami, a z drugiej strony towarzyszące niedobory immunologiczne gospodarza wywołują upośledzenie tolerancji układu odpornościowego, zaburzenia homeostazy w obrębie jamy ustnej i rozwój cPD. Uważa się, że wyżej opisane czynniki odgrywają kluczową rolę w indukcji oraz progresji procesów patologicznych w przebiegu cPD, również na skutek interakcji z mediatorami reakcji zapalnej, takimi jak IL-1A oraz IL-1B. Ponadto, wyróżniono kilka chorób ogólnoustrojowych, które sprzyjają rozwojowi cPD. W przypadku występujących dysfunkcji metabolicznych, jak w cukrzycy typu I lub II obserwuje się zarówno zwiększoną częstość występowania, jak i ostrzejszy przebieg cPD (Curtis i in. 2020, Potempa i in.2021).

Kluczowym czynnikiem w rozwoju cPD są Gram-ujemne pałeczki *P. gingivalis*, charakteryzujące się właściwościami hemaglutynacyjnymi oraz hemolitycznymi, które w warunkach laboratoryjnych rosną pod postacią czarnych kolonii. Czarno zabarwione kolonie powstają na skutek kumulacji hemu stanowiącego produkt degradacji hemoglobiny erytrocytów, a zarazem swoisty dla bakterii magazyn żelaza oraz porfiryn niezbędnych do ich wzrostu.

Pałeczki *P. gingivalis* wyposażone są w czynniki warunkujące ich wirulencję, do których należą, m.in. enzymy proteolityczne stanowiące silne determinanty patogenności gatunku *P. gingivalis*, hemaglutyniny oraz fimbrie. Na stopień zjadliwości bakterii wpływa również lipopolisacharyd (LPS), który stanowi element strukturalny komórki bakteryjnej uwalniany przez bakterie po ich lizie. Dane literaturowe wskazują, że zmiany którym podlegają czynniki wirulencji na poziomie transkrypcji genów lub modyfikacji potranslacyjnych umożliwiają przetrwanie, a także wzrost stopnia zjadliwości bakterii kolonizujących kieszonki dziąsłowe (Nakao i in. 2014; Gawron i in. 2019; Zaric i in. 2017).

W nawiązaniu do tych danych, w pracy omówiono rolę zmian na poziomie sekwencji genów kodujących LPS i białka fimbrii *P. gingivalis* w wirulencji bakteryjnej oraz patogenezie cPD.

2. Lipopolisacharyd *P. gingivalis*

Lipopolisacharyd *P. gingivalis* stanowi główny glikolipid na powierzchni komórek bakterii Gram-ujemnych o właściwościach antygeny powierzchniowego, który kodowany jest przez ponad 40 genów. LPS składa się z trzech elementów strukturalnych posiadających właściwości endotoksyny, a za jego umocowanie na powierzchni komórek bakterii odpowiada lipid A, natomiast polisacharydowy polimer tworzy najbardziej wysunięty na zewnątrz element komórki, umożliwiający interakcje ze środowiskiem zewnętrznym drobnoustroju (Kumanda i in. 1995).

Bakterie z gatunku *P. gingivalis* charakteryzują się występowaniem dwóch różnych wariantów LPS, tj. O-LPS oraz A-LPS. Wariant O-LPS stanowi element strukturalny, w skład którego wchodzi antygen O-umożliwiający wiązanie się z rdzeniem lipidu A. Z kolei, wariant A-LPS dzięki obecności fosforylowanej, rozgałęzionej, powtarzającej się sekwencji jednostki mannanu zapewnia przymocowanie do lipidu A (Chen i in. 2004).

Głównym zadaniem LPS jest ochrona mikroorganizmów przed niekorzystnymi dla nich czynnikami pochodzenia egzo- oraz endogennego, jak na przykład sole kwasów żółciowych czy

antybiotyki. Obecność LPS w organizmie gospodarza indukuje komórki układu odpornościowego, stanowiąc tym samym wtórną reakcję immunologiczną po lizie komórek bakteryjnych (Kumanda i in. 1995).

Podczas infekcji bakteryjnej, komórki człowieka po rozpoznaniu cząsteczki LPS inicjują reakcje odpornościowe, celem jak najszybszej destrukcji frakcji bakteryjnej. Z drugiej strony dochodzi do wyzwolenia procesu zapalnego, który w miarę postępowania procesu choroby prowadzi do resorpcji kości wyrostka zębodołowego. Ważną rolę w tym zjawisku odgrywa proces glikozylacji powierzchni cząsteczki LPS (Zarin i in. 2010). Poza tym, proces glikozylacji LPS może modyfikować reakcję zapalną organizmu gospodarza na skutek transformacji lipidu oraz domeny oligosacharydowej. Drobnoustroje chorobotwórcze wykorzystują przekształcanie elementów strukturalnych LPS przy pomocy reszt kwasu sialowego do stłumienia odpowiedzi immunologicznej lub wiązania z komórkami gospodarza pośrednicząc w ten sposób w adhezji komórek bakteryjnych (Zaric i in. 2018).

Badania przeprowadzone przez Chen i in. wskazują na obecność reszt kwasu sialowego w dużym stopniu wraz z ugrupowaniami o charakterze kwasowym w strukturze LPS szczepu dzikiego W83 *P. gingivalis*. Ponadto, analiza porównawcza przeprowadzona pomiędzy szczepami referencyjnymi W83 i ATCC 33277 wykazała występowanie zdecydowanych różnic w poziomie procesu sialilacji ich cząsteczek. Na podstawie badań aktywności bakterii, określających stopień wirulencji badanych szczepów stwierdzono, że W83 charakteryzuje się wyższym poziomem sialilacji oraz wyższą wirulencją w porównaniu do szczepu ATCC 33277. Wysznuo hipotezę, że za wyższą wirulencję szczepu W83 może odpowiadać grupa genów, które kodują transpozazę, helikazę i fibronektynę typu 3, ponieważ geny te nie podlegają ekspresji w szczepie ATCC 33277 (Chen i in. 2004).

Dodatkowo LPS *P. gingivalis* indukuje mechanizmy wrodzonej odpowiedzi immunologicznej organizmu gospodarza poprzez interakcje z jego receptorami Toll- like 2 i 4 (TLR-2, TLR-4) na powierzchni komórek układu odpornościowego, stymulując następnie produkcję grupy cytokin prozapalnych, jak IL-1, IL-6, IL-8, a także czynnika martwicy nowotworu α (TNF- α).

Zróźnicowanie budowy chemicznej LPS, a dokładniej lipidu A pozwoliło na zaobserwowanie różnic w interakcji LPS szczepu W83 i ATCC 33277 z receptorami TLR podczas indukcji reakcji zapalnej. W zależności od stopnia fosforylacji czy acetylacji dochodzi do różnorodnych efektów komórkowych w linii LPS-TLR. Proces ten modulowany jest również przez antygen O. Tym samym, w przypadku szczepu W83 dochodzi do aktywacji komórek zapalnych gospodarza stymulujących syntezę cytokin prozapalnych w cPD (Zaric i in. 2010). Reife i in. dowiedli natomiast, że heterogenność struktury lipidu A szczepu ATCC 33277 *P. gingivalis* może wywoływać różne, często przeciwstawne reakcje wrodzonej odpowiedzi immunologicznej gospodarza, co zachodzi w efekcie interakcji z receptorem TLR4 (Reife i in. 2006).

Z kolei Rangarajan i in. analizowali stopień wirulencji szczepu W50 *P. gingivalis* pod kątem modyfikacji LPS. W tym celu ocenie zostały poddane różne warianty zmutowanych konstruktów laboratoryjnych, z uwzględnioną dysfunkcją syntezy O-LPS i A-LPS. Przeprowadzone badania opierały się przede wszystkim na obserwacji wiązania heminy, ponieważ intensywność procesu pigmentacji *P. gingivalis* wpływa na stopień zjadliwości bakterii. Na podstawie przeprowadzonych analiz komórek bakteryjnych W50 oraz mutantów laboratoryjnych, połączonych z oceną wiązania heminy z natywną i pozbawioną frakcji lipidowej formą LPS stwierdzono, że brak LPS-A charakteryzuje się obniżonym powinowactwem do heminy. To z kolei prowadzi do obniżenia aktywności mechanizmów odpowiadających za regulację aktywności proteaz cysteinowych, a także kumulacji pigmentu (μ -oksobishemu) oraz pochodnej heminy ze środowiska zewnętrznego bakterii. Przedstawiony mechanizm wskazuje na istotną rolę A-LPS w chorobotwórczości *P. gingivalis* (Rangarajan i in. 2017).

3. Fimbrie *P. gingivalis*

Fimbrie to struktury białkowe znajdujące się na powierzchni bakterii Gram-ujemnych. Odgrywają one kluczową rolę w początkowej fazie kolonizacji komórek gospodarza przez *P. gingivalis* oraz tworzeniu biofilmu. Tworzenie biofilmu odbywa się na drodze interakcji małego

antygeny fimbrialnego (Mfa1) *P. gingivalis* z paciorkowcowym antygenem I/II i innymi bakteriami tworzącymi płytkę nazębną. Podczas kolonizacji kieszonek gospodarza, fimbrie *P. gingivalis* obniżają prawidłową odpowiedź immunologiczną oraz ułatwiają układowe rozprzestrzenianie się bakterii na skutek kolonizacji i inwazji komórek gospodarza (Dashper i in. 2017; Coats i in. 2019).

Fimbrie *P. gingivalis* kodowane są przez różne grupy genów, lecz mimo braku podobieństwa w ich sekwencji nukleotydowej są do siebie zbliżone budową (Zhang i in. 2016). Klaster genów kodujących białka fimbrii dużych składa się z genów *fimA-E* oraz *fimX* i *pgmA*, kodujących odpowiednio białka FimA-E oraz FimX i PgmA. Spośród nich za zjadliwość *P. gingivalis* w najwyższym stopniu odpowiada białko FimA. Na podstawie sekwencji nukleotydowych gen *fimA* został podzielony na sześć genotypów: *fimA I-V* oraz *fimA Ib*, które różnią się między sobą stopniem wirulencji (Zhang i in. 2016; Abreu i in. 2019).

Z kolei białka FimX oraz PgmA odgrywają rolę w ekspresji białka FimA, a ich brak znacznie ją obniża. Białko FimB jest odpowiedzialne za długość wytwarzanych przez *P. gingivalis* fimbrii. Wykazano doświadczalnie, że brak FimB powodował wytwarzanie fimbrii o ponad przeciętnej długości, zaś jego przywrócenie skutkowało wytwarzaniem struktur o standardowych wymiarach. Białka FimC, FimD oraz FimE stanowią białka pomocnicze, odgrywające ważną rolę w adhezji do komórek gospodarza. Nie są one niezbędne do wytworzenia fimbrii, jednak ich brak powoduje obniżenie liczby struktur na powierzchni komórki bakteryjnej. FimA posiadają zdolność oddziaływania z powierzchnią β 1-integriny komórek nabłonkowych dziąseł oraz wiązania się z dehydrogenazą aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAPDH) paciorkowców będących pierwotnymi kolonizatorami jamy ustnej (Nagano i in. 2012; Lee i in. 2018).

Jak wcześniej wspomniano, poszczególne genotypy *fimA* cechują się różnym stopniem zjadliwości. Znaczna większość pacjentów z cPD charakteryzuje się stwierdzoną obecnością drobnoustrojów o genotypie *fimA II* lub *fimA IV*. Genotyp *fimA I* oraz *fimA V* jest zaś najbardziej rozpowszechniony u osób zdrowych (Abreu i in. 2019).

Fimbrie małe zbudowane są z białek Mfa1-5. Geny *mfa1-4* ułożone są w operonie, zaś gen *mfa5* transkrybowany jest niezależnie. Najważniejszą podjednostką fimbrii mniejszych jest białko Mfa1, które stanowi główne białko trzonu fimbrii. Typ drugi fimbrii małych, Mfa2, jest białkiem błony zewnętrznej, które warunkuje długość fimbrii. Znajduje się ono u podstawy struktury fimbrii i zakotwicza je w powierzchni komórki bakteryjnej. Białka Mfa3-Mfa4 są białkami pomocniczymi związanymi z Mfa1. Mfa3 służy jako białko adaptorowe między Mfa1, a pozostałymi białkami. Mutageneza tego białka doprowadza do braku wszystkich białek pomocniczych w fimbriach, tak więc jest to element niezbędny do powstania białkowego kompleksu na fibrylarnym włóknie Mfa1. Białko Mfa5 wpływa natomiast na wbudowywanie innych białek pomocniczych do struktury fimbrii (Lee i in. 2018).

Fimbrie Mfa1 mogą wiązać się z białkiem powierzchniowym SspA/B (*Streptococcal adhesin*) *Streptococcus gordonii*, co inicjuje wiele szlaków sygnałowych. Mfa1 może oddziaływać także na receptory DC-SIGN (receptory lektyny typu C), które są obecne na powierzchni komórek odpornościowych (Lee i in. 2018).

Składanie fimbrii *P. gingivalis* obejmuje proteolityczną obróbkę lipidowanych podjednostek prekursorowych, a następnie ich późniejszą polimeryzację na powierzchni komórki bakteryjnej. Konserwatywne sekwencje N i C końcowe w przypadku nici Mfa1 pełnią kluczową rolę w tym procesie. Zastosowanie odpowiednich inhibitorów peptydowych działających na te fragmenty nici sprawia, że polimeryzacja fimbrii zostaje zaburzona. Inhibitory o podobnej budowie działają także na fimbrie duże, hamując ich zewnątrzkomórkową polimeryzację. Działaniem odpowiednio dobranych leków na komórki *P. gingivalis* można zaburzyć wytwarzanie fimbrii, a co za tym idzie, znacząco obniżyć zjadliwość tej bakterii *P. gingivalis* (Alaei i in. 2019).

Fimbrie indukują produkcję różnych cytokin, zaś mutanty laboratoryjne *P. gingivalis* pozbawione fimbrii wykazywały niższą zjadliwość i indukowały słabszą reakcję zapalną. Struktury te zdolne są do stymulacji wytwarzania cząsteczek prozapalnych, takich jak: IL1-B, IL-6, IL-8, białka chemotaktycznego monocytów (MCP-1), cząsteczek adhezji wewnątrzkomórkowej (ICAM-1), cząsteczek adhezji śródbłonna naczyniowego (VCAM-1) i selektyny E. Pobudzają także ekspresję TNF- α w makrofagach i innych komórkach linii monocytarnej. Gatunek *P. gingivalis* może także

stymulować powstawanie wyżej wspomnianych receptorów TLR, które odgrywają kluczową rolę w nieswoistej odpowiedzi immunologicznej (Takahashi i in. 2006).

4. Podsumowanie

Bakterie gatunku *P. gingivalis* stanowią element składowy kompleksu czerwonego, uczestniczący w rozregulowaniu mechanizmów wrodzonej odpowiedzi immunologicznej gospodarza. Jednocześnie, *P. gingivalis* uważa się za kluczowy czynnik etiologiczny cPD. W związku z tym, w niniejszym przeglądzie omówiono zmienność tych czynników wirulencji *P. gingivalis*, które jednocześnie stanowią istotne elementy struktury komórki bakteryjnej (Gawron i in. 2019; Zaric i in. 2010; Zaric i in. 2017; Coats i in. 2019)

W artykule przedyskutowano najnowsze doniesienia dotyczące następstw zmienności LPS oraz fimbrii *P. gingivalis* na poziomie sekwencji genowych. Biorąc pod uwagę niezwykle złożoną mechanizmów patogenetycznych cPD, jak i samych elementów strukturalnych *P. gingivalis* uczestniczących w ich indukcji postulowano, iż czynniki te mogą stanowić istotne ogniwo w zaprojektowaniu skutecznego schematu leczenia tej choroby. Niemniej jednak, cel ten będzie możliwy do osiągnięcia w następstwie kontynuacji badań nad zmiennością struktury molekularnej i organizacji komórkowej gatunku *P. gingivalis*.

5. Literatura

- Abreu MGL, Kawamoto D, Mayer MPA et al. (2019) Frequency of *Porphyromonas gingivalis* fimA in smokers and nonsmokers after periodontal therapy. *Journal of Applied Oral Science* 27:e20180205.
- Alaei SR, Park JH, Walker SG et al. (2019) Peptide-based inhibitors of fimbrial biogenesis in *Porphyromonas gingivalis*. *Infection and Immunity* 87:e00750-18.
- Cai J, Chen J, Guo H et al. (2019) Recombinant fimbriae protein of *Porphyromonas gingivalis* induces an inflammatory response via the TLR4/NF- κ B signaling pathway in human peripheral blood mononuclear cells. *International Journal of Molecular Medicine* 43(3):1430-1440.
- Chen T, Hosogi Y, Nishikawa K et al (2004) Comparative whole-genome analysis of virulent and avirulent strains of *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Bacteriology* 186: 5473-5479.
- Coats SR, Kantrong N, To TT et al. (2019) The distinct immune-stimulatory capacities of *Porphyromonas gingivalis* strains 381 and ATCC 33277 are determined by the fimB allele and gingipain activity. *Infection and Immunity* 87:e00319-19.
- Curtis MA, Diaz PI, Van Dyke TE (2020) The role of the microbiota in periodontal disease. *Periodontology* 2000 83(1): 14-25.
- Dashper SG, Mitchell HL, Seers CA et al. (2017) *Porphyromonas gingivalis* Uses Specific Domain Rearrangements and Allelic Exchange to Generate Diversity in Surface Virulence Factors. *Frontiers in Microbiology* 8(48): doi: 10.3389/fmicb.2017.00048.
- Gawron K, Wojtowicz W, Łazarz-Bartyzel K et al. (2019) Status of The Oral Cavity in Chronic Periodontitis. *In vivo* 33: 1165-1174.
- Highfield J (2009) Diagnosis and classification of periodontal disease. *Australian Dental Journal* 54(1): 11–26.
- Kumanda H, Haishima Y, Umemoto T et al. (1995) Structural study on the free lipid A isolated from lipopolysaccharide of *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Bacteriology* 177: 2098-2106.
- Lee JY, Miller DP, Wu L et al. (2018) Maturation of the Mfa1 Fimbriae in the Oral Pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *Frontiers in Cellular Infection Microbiology* 8:137.
- Nagano K, Hasegawa Y, Abiko Y et al. (2012) *Porphyromonas gingivalis* FimA Fimbriae: Fimbrial Assembly by fimA Alone in the fim Gene Cluster and Differential Antigenicity among fimA Genotypes. *PLOS ONE* 7(9): e43722.
- Nakao R, Takashiba S, Kosono S et al. (2014) Effect of *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles on gingipain-mediated detachment of cultured oral epithelial cells and immune responses. *Microbes and Infection* 16: 6-16.

- Potempa J, Madej M, Scott DA (2021) The RagA and RagB proteins of *Porphyromonas gingivalis*. *Molecular Oral Microbiology* 36: 225-232.
- Rangarajan M, Aduse-Opoku J, Paramonov NA et al. (2017) Hemin binding by *Porphyromonas gingivalis* strains is dependent on the presence of A-LPS. *Molecular Oral Microbiology* 32:365–374.
- Reife RA, Coats SR, Qutub MAI et al. (2006) *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide lipid A heterogeneity: differential activities of tetra- and penta-acylated lipid A structures on E-selectin expression and TLR4 recognition. *Cellular Microbiology* 8: 857-868.
- Takahashi Y, Davey M, Yumoto H et al. (2006) Fimbria-dependent activation of pro-inflammatory molecules in *Porphyromonas gingivalis* infected human aortic endothelial cells. *Cellular Microbiology* 8(5): 738-757.
- Zaric SZ, Lappin MJ, Fulton CR et al. (2017) Sialylation of *Porphyromonas gingivalis* LPS and its effect on bacterial-host interactions. *Innate Immunity* 23(3): 319-326.
- Zaric S, Shelburne C, Darveau R et al. (2010) Impaired immune tolerance to *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide promotes neutrophil migration and decreased apoptosis. *Infection and Immunity* 78: 4151-4156.
- Zhang B, Sirsjö A, Khalaf H et al. (2016) Transcriptional profiling of human smooth muscle cells infected with gingipain and fimbriae mutants of *Porphyromonas gingivalis*. *Scientific Reports* Nature 6: 2191.

Fundowanie:

Artykuł pt. ‘**Zmienność strukturalnych elementów komórkowych *Porphyromonas gingivalis*: przegląd badań molekularnych**’ powstał w ramach realizacji projektu OPUS (UMO-2018/29/B/NZ2/01930 - K.G.) oraz projektu Młodego Naukowca finansowanego umową PCN-CBN-004301/3-2/218/2021 - M.U.

12. Rola białek enzymatycznych *Porphyromonas gingivalis* w wirulencji bakterii

The role of enzymes produced by *Porphyromonas gingivalis* in bacterial virulence

Strzelec Karolina⁽¹⁾, Uroczynska Marta⁽¹⁾, Dziejcz Agata⁽¹⁾, Botor Malwina⁽¹⁾, Łazarz-Bartyzel Katarzyna⁽²⁾, Lesiak Marta⁽¹⁾, Gawron Katarzyna⁽¹⁾

⁽¹⁾ Katedra Biologii Molekularnej i Genetyki, Wydział Nauk Medycznych w Katowicach, Śląski Uniwersytet Medyczny, Katowice

⁽²⁾ Katedra i Zakład Periodontologii i Klinicznej Patologii Jamy Ustnej, Wydział Lekarski, Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum, Kraków
Opiekun naukowy: dr hab. n. med. Katarzyna Gawron

Karolina Strzelec: karolina.strzelec@infoart.pl

Słowa kluczowe: periodontopatia, czynniki zjadliwości, PPAD, proteazy cysteinowe, gingipainy

Streszczenie

Przewlekłe zapalenie przyzębia (cPD, *chronic periodontitis*) stanowi stosunkowo częstą chorobę tkanek przyzębia o podłożu infekcyjnym. Za kluczowy czynnik etiologiczny tego schorzenia uważa się Gram-ujemną pałeczkę *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*). Do enzymatycznych czynników wirulencji periodontopatogenu zalicza się unikatowy nieproteolityczny enzym, deiminazę peptydyloargininową *P. gingivalis* (PPAD, *peptidylarginine deiminase*) oraz gingipainy, należące do grupy proteaz cysteinowych. W wyniku potranslacyjnej modyfikacji białek katalizowanej przez PPAD, polegającej na przekształceniu dodatnio naładowanych reszt peptydyloargininy do peptydylocytruliny i amoniaku utrzymywane są optymalne warunki do namnażania i bytowania bakterii w kieszonkach dziąsłowych. Z kolei arginino- oraz lizyno-specyficzne gingipainy, dzięki aktywności enzymatycznej warunkują generowanie substratów do reakcji katalizowanych przez PPAD. W wyniku tych reakcji dochodzić może do modyfikacji białek/peptydów bakteryjnych i gospodarza skutkujących zmianami ich stabilności, wrażliwości na degradację proteolityczną oraz funkcji biologicznych. Procesy te stanowią podłoże molekularne patomechanizmu cPD. W nawiązaniu do przedstawionych zagadnień, w niniejszej pracy przedstawiono przegląd badań dotyczących właściwości i roli białek enzymatycznych produkowanych przez *P. gingivalis* w wirulencji tego periodontopatogenu. Biorąc pod uwagę złożoność mechanizmów patogenetycznych cPD, a z drugiej strony wpływ białek enzymatycznych produkowanych przez *P. gingivalis* na rozwój tej choroby, wydaje się, iż enzymy te w przyszłości mogą stanowić skuteczny cel terapeutyczny cPD. Strategia ta wymaga jednak skonstruowania i przetestowania inhibitorów specyficznych dla tych enzymów.

1. Wstęp

Porphyromonas gingivalis (*P. gingivalis*) jest głównym czynnikiem etiologicznym przewlekłego zapalenia przyzębia (cPD, *chronic periodontitis*), które należy do grupy przewlekłych schorzeń jamy ustnej określanymi mianem periodontopatii. Zgodnie z danymi epidemiologicznymi cPD występuje u około 30% dorosłej populacji na świecie (Curtis i in. 2020).

P. gingivalis należy do grupy bakterii tzw. czerwonego kompleksu, a zjadliwość tego periodontopatogenu uwarunkowana jest ekspresją enzymatycznych czynników wirulencji, tj. deiminazy peptydyloargininowa *P. gingivalis* (PPAD) i proteaz cysteinowych (gingipain) oraz strukturalnych elementów komórki bakteryjnej, takich jak: lipopolisacharyd (LPS) i fimbrie (Gawron i in. 2014).

W rozwoju zmian patologicznych warunkujących przełamanie tolerancji immunologicznej organizmu gospodarza w przebiegu cPD, a następnie rozprzestrzenianiu się infekcji, kluczową rolę odgrywają jednak czynniki enzymatyczne. Kolonizacja jamy ustnej *P. gingivalis* rozpoczyna się już

we wczesnym okresie dzieciństwa, jednak w zależności od nakładającego się efektu działania czynników środowiskowych, genetycznych, a w dużym stopniu również od kondycji układu immunologicznego gospodarza dochodzi do zmian warunkujących rozwój choroby (Gawron i in. 2014). Na skutek aktywności enzymów proteolitycznych oraz PPAD dochodzi do biosyntezy składników odżywczych oraz czynników wzrostu niezbędnych do prawidłowego rozwoju *P. gingivalis*. W wyniku ich aktywności, zostają naruszone bariery mechanizmów wrodzonej odpowiedzi immunologicznej (Quirke i in. 2014).

Tak więc, w efekcie nałożenia wielu różnych czynników potencjalnie warunkujących rozwój cPD dochodzi do dysbiozy w obrębie biofilmu bakteryjnego w jamie ustnej gospodarza, czego manifestacją jest rozwijający się obraz kliniczny tej choroby (Gawron i in. 2014).

Do głównych objawów klinicznych cPD zalicza się zaczerwienie, obrzęk i krwawienie dziąseł, powstające w wyniku toczącego się procesu zapalnego w tkankach przyzębia, w którym kluczową rolę odgrywają interleukiny (IL-1, IL-6, IL-8) oraz czynnik martwicy nowotworu α (TNF- α , *tumor necrosis factor alpha*). W miarę postępu choroby dochodzi do pogłębienia kieszonek dziąsłowych oraz resorpcji kości wyrostka zębodołowego, co ostatecznie prowadzi do utraty zębów i związanych z tym powikłań w przypadku braku leczenia lub braku skuteczności metody terapeutycznej (Curtis i in. 2020; Quirke i in. 2014).

Celem niniejszej pracy jest przegląd badań dotyczących właściwości i roli białek enzymatycznych produkowanych przez *P. gingivalis* w wirulencji periodontopatogenu.

2. Deiminaza peptydyloargininowa *P. gingivalis*

Deiminaza peptydyloargininowa (PPAD) jest enzymem produkowanym przez *P. gingivalis*, uważanym za czynnik wirulencji tej bakterii. Poza bakteryjnym enzymem PPAD, znanych jest 5 ludzkich izoform deiminazy peptydyloargininowej (PAD; PAD1-4, PAD6), jednak enzymy ludzkie nie wykazują genetycznych powiązań z enzymem bakteryjnym. W wyniku potranslacyjnej deiminacji białek oraz peptydów katalizowanej przez PPAD dochodzi do zmiany ładunku makrocząsteczki poprzez przekształcanie dodatnio naładowanych reszt peptydyloargininy do peptydylocytruliny oraz amoniaku. PPAD charakteryzuje się powinowactwem do C-końcowych reszt argininy białek oraz peptydów, dostarczanych w wyniku aktywności enzymatycznej proteaz cysteinowych (gingipain), przy braku jonów wapnia (Ca^{2+}), przeciwstawnie do izoform ludzkich enzymów PAD (Gawron i in. 2014).

W wyniku nieproteolitycznej aktywności enzymu PPAD może dochodzić do modyfikacji białek/peptydów bakteryjnych, jak i produkowanych w ustroju gospodarza, co skutkuje zmianami ich właściwości, a dokładnie stabilności, wrażliwości na degradację proteolityczną, czy funkcji biologicznych. Istnieją badania, które donoszą o roli wpływu enzymu PPAD na rozwój cPD, jak i reumatoidalnego zapalenia stawów (RA, *rheumatoid arthritis*) (Konig i in. 2015; Quirke i in. 2014). Uważa się, że cPD, charakteryzujące się etiologią bakteryjną *P. gingivalis* może być stanem poprzedzającym rozwój RA w organizmie człowieka. PPAD poprzez deiminację białek bakteryjnych i gospodarza w tkance objętej procesem zapalnym, generuje pulę cytrulinowanych antygenów. Tym samym wzmożona (auto)odpowiedź układu odpornościowego człowieka, w której pierwszorzędą rolę odgrywają przeciwciała przeciwko cytrulinowanym antygenom (ACPA, *anti-citrullinated protein autoantibodies*) stanowi podłoże patogenetyczne RA. Z tego względu, postuluje się, że PPAD może odgrywać istotną rolę zarówno w patogenezie cPD, jak i RA (Gawron i in. 2014; Jennings i in. 2019).

Na podstawie danych literaturowych wykazano, że istnieje kilka wariantów enzymu PPAD (fPPAD/tPPAD), które różnią się długością sekwencji aminokwasowej białka, co z kolei przekłada się na różnorodność jego właściwości enzymatycznych (Jennings i in. 2019).

Rodriguez i in. wykazali, że skrócony wariant tPPAD, zawierający sekwencję N-końcową (aminokwas 513) był w pełni stabilny oraz zdolny do procesu autocytrulinacji, podobnie jak forma fPPAD (aminokwas 556), zawierająca kompletną sekwencję aminokwasową enzymu. Natomiast, Quirke i in. badali zdolności autocytrulinacji zmodyfikowanego fPPAD pęcherzyków błony zewnętrznej (OMVs, *outer membrane vesicles*). Jednak to Konig i in. zidentyfikowali dwie formy komórkowe o różnych masach cząsteczkowych 47kDa oraz 75-85 kDa tPPAD, a także oczyszczoną

formę zrekombinowanego tPPAD, który według autorów publikacji charakteryzował się zwiększoną wirulencją (Jenning i in. 2019; Rodriguez i in. 2009; Konig i in. 2015; Quirke i in. 2014).

Jenning i in. sprawdzali natomiast potencjał patogenny enzymu PPAD w przebiegu RA. W tym celu do konstruktów laboratoryjnych wstawiono identyczne sekwencje aminokwasowe PPAD i PAD, które generowały reaktywne neoepitopy, będące celem dla ACPA. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że w wyniku procesu cytrulinacji białek, *m.in.*, fibrynogenu, dochodzi do rozprzestrzeniania się procesu zapalnego. Wykazano również, że OMVs oraz cytrulinacja ułatwia połączenie się wielu gatunków bakterii, poprzez tworzenie kolonii, a następnie ułatwienie adhezji do komórek nabłonka, co ma istotne znaczenie w cPD (Jenning i in. 2019).

Następnie, Montgomery i in. porównywali aktywność katalityczną PPAD szczepu dzikiego oraz mutanta laboratoryjnego, celem analizy swoistości enzymatycznej PPAD dla C-końcowych reszt argininy oraz procesu cytrulinacji białek. Przeprowadzona ocena struktury krystalicznej PPAD sugeruje obecność tzw. „pułapek” dla ligandów argininy zlokalizowanych w bliskim sąsiedztwie centrum aktywnego enzymu. W badaniu wykryto również występowanie dodatkowych reszt aminokwasowych (Arg 152, Arg 154) w sekwencji białka PPAD, wpływających na proces adhezji *P. gingivalis* do komórek nabłonka oraz aktywność enzymatyczną. W wyniku powstających wiązań jonowych z C-końcową resztą argininy, dochodzi do obrotu enzymatycznego, a następnie katalizowania danej reakcji biochemicznej. Wykorzystane w badaniu konstrukty laboratoryjne tPPAD_{WT} oraz tPPAD_{C351A} obejmujące pozycje sekwencji aminokwasowej 464-484 reprezentują region łączący z elementami IgLF i CTD systemu wydzielniczego typu IX (PorSS), przez który PPAD zostaje uwalniany do środowiska reakcji. Stwierdzono tym samym, że skrócona forma enzymu PPAD jest wariantem o pełnej zjadliwości. Na tej podstawie następnie, przedstawiono wniosek, że skrócona sekwencja aminokwasowa wpływa na wzrost aktywności PPAD. W badaniu potwierdzono również preferencje cytrulinacji C-końcowych sekwencji przez PPAD w porównaniu do ludzkich izoform enzymu PAD2 i PAD4. Tym samym, opublikowane wyniki badań stwarzają mocne dowody potwierdzające udział *P. gingivalis* i PPAD w zaburzeniu tolerancji immunologicznej pacjentów, a następnie rozwoju cPD i RA (Montgomery i in. 2016).

Badania przeprowadzone przez Vermilyea i in. na szczepie *P. gingivalis* 381 sugerują natomiast, że proces deiminacji katalizowany przez PPAD wpływa na interakcję pomiędzy komórkami *P. gingivalis* zwiększając biomasę mikrofilmu na powierzchni płytki poddziałkowej. W wyniku przeprowadzonych analiz porównawczych szczepu 381 oraz zmutowanego wariantu laboratoryjnego Δ8820, charakteryzującego się wyciszoną ekspresją genu PPAD stwierdzono, iż macierz biofilmu składa się z cytrulinowanych białek na powierzchni komórek bakteryjnych lub OMVs, wydzielanych przez system sekrecji typu IX (Vermilyea 2019).

3. Proteazy cysteinowe *P. gingivalis*

Gingipainy to enzymy proteolityczne należące do rodziny proteaz cysteinowych, niezbędne do przeżycia *P. gingivalis* w kieszonkach dziąsłowych. Z uwagi na ich właściwości patogenne, enzymy te uczestniczą również w indukcji reakcji patologicznych w cPD. Ponieważ patogenność szczepów *P. gingivalis* uzależniona jest od poziomów ekspresji genów kodujących gingipainy, enzymy te uważane są za jedne z ważniejszych czynników wirulencji tej bakterii (Gabarrini i in. 2020; Hocevar i in. 2020; Bhogal i in. 1997; Miya i in. 2020; Bostanci i in. 2013).

W zależności od specyficzności reszty P1 w wiązaniu peptydowym w trakcie reakcji hydrolizy białek, gingipainy zostały podzielone na dwie grupy. Do pierwszej grupy należą enzymy arginino-specyficzne, RgpA oraz RgpB, które hydrolizują wiązania w miejscu występowania argininy (Arg-XXX) i kodowane są odpowiednio przez gen *rgpA* i *rgpB*. W skład drugiej grupy wchodzi gingipainy wykazujące powinowactwo enzymatyczne do reszt lizyny (Lys-XXX), tj. Kgp, stanowiące produkt pojedynczego genu *kgp* (Gabarrini i in. 2020; Hocevar i in. 2020; Curtis i in. 2000; Potempa i in. 1998). Cechą wspólną obu grup jest preferencja do C-końcowych, odpowiednich dla siebie reszt aminokwasowych peptydów lub białek (Gabarrini i in. 2020; Hocevar i in. 2020; Curtis i in. 2000; Potempa i in. 1998).

Grupa gingipain arginino-specyficznych nie jest jednorodna pod kątem budowy biochemicznej, charakteryzuje się zróżnicowaniem elementów strukturalnych. Proteazy RgpA

wydzielane są pod postacią dużego, niekowalencyjnego kompleksu zbudowanego z miejsca aktywnego oraz domeny hemaglutynacyjno-adhezyjnej (HA), określanego mianem HRgpA o wewnątrzkomórkowej lokalizacji. W przypadku RgpB wyróżnia się obecność pojedynczego łańcucha o niezwykle podobnej sekwencji aminokwasowej do centrum aktywnego RgpA, bez C-końcowej domeny HA (Gabarrini i in. 2020; Hocevar i in. 2020; Curtis i in. 2000; Potempa i in. 1998; Bhogal i in. 1997). Podobną analogię można zaobserwować w przypadku enzymów lizynospetycznych Kgp, które charakteryzują się obecnością miejsca aktywnego oraz HA. Badania wykazały również możliwą interakcję z domeną adhezji kompleksu HRgpA, zapewniając kontakt w relacji HRgpA-Kgp i formowanie kompleksu wykazującego dwojaką specyficzność względem obu posiadanych miejsc aktywnych, tzn., Arg-XXX oraz Lys-XXX (Gabarrini i in. 2020; Hocevar i in. 2020; Curtis i in. 2000; Potempa i in. 1998; Bhogal i in. 1997). Izofromy proteaz cysteinowych, specyficznych względem reszt argininy wchodzą w reakcje krzyżowe z przeciwciałami monoklonalnymi skierowanymi przeciwko antygenom strukturalnym *P. gingivalis*, indukując tym samym reakcje odpornościowe ze strony gospodarza, co stanowi istotny czynnik warunkujący rozwój cPD (Abdullah i in. 2013).

Gingipainy, podobnie do deiminazy peptydyloargininowej *P. gingivalis*, wydzielane są za pośrednictwem systemu sekrecji typu IX. Transportowane są przez zewnętrzną błonę komórkową, następnie uwalniane w formie zymogenu (nieaktywnej), a dopiero pod wpływem proteolitycznej autoaktywacji dochodzi do ich przekształcenia w aktywne biologicznie makrocząsteczki, przy czym Rgp charakteryzują się zdecydowanie większą aktywnością proteolityczną w porównaniu do Kgp (Hocevar i in. 2020; Curtis i in. 2000; Potempa i in. 1998; Bhogal i in. 1997; Immamura i in. 2003; Eick i in. 2019). Istotnym faktem, przemawiającym za kluczową rolę gingipain w fizjologii *P. gingivalis*, a jednocześnie patogenezie cPD jest ich znaczący udział w aktywności pozakomórkowej, która obejmuje ok. 85% w miejscu toczącego się procesu zapalnego (Miya i in. 2020).

Do kluczowych funkcji gingipain *P. gingivalis* należą przede wszystkim interakcje z białkami powierzchniowymi organizmu gospodarza, hemaglutyninami, ale także udział w procesach wzrostowych, czy modulacji odpowiedzi immunologicznej (Gabarrini i in. 2020; Hocevar i in. 2020; Curtis i in. 2000; Potempa i in. 1998; Bhogal i in. 1997). W związku z faktem, iż *P. gingivalis* uczestniczy również w degradacji białek osocza krwi, których jedną z zasadniczych funkcji jest transport żelaza, gingipainy uczestniczą w procesie pigmentacji kolonii bakteryjnych. Na skutek aktywności proteazy cysteinowej Lys-gingipain dochodzi do rozszczepiania wolnej hemoglobiny, co stanowi potwierdzenie chorobotwórczych właściwości *P. gingivalis* (Gabarrini i in. 2020).

Ważny aspekt aktywności gingipain stanowi ich zdolność do inaktywacji receptorów białkowych, prowadząc w ten sposób do dysfunkcji wielu szlaków sygnałowych w komórkach, co umożliwia rozprzestrzenianie się infekcji *P. gingivalis* w obrębie jamy ustnej człowieka (Eick i in. 2019).

Z kolei degradacja białek powierzchniowych przez gingipainy ma istotne znaczenie w procesie adhezji komórek bakteryjnych do nabłonka jamy ustnej człowieka. Na podstawie analizy szczepu dzikiego W83 oraz szczepu pozbawionego aktywności proteaz cysteinowych wykazano, że w wyniku aktywności domen adhezyjnych dochodzi do bezpośredniego kontaktu *P. gingivalis* z komórkami nabłonkowymi, co z kolei zwiększa powierzchnię kontaktu z enzymami proteolitycznymi. Dodatkowo, ocena wskaźnika infekcji (MOI, *multiplicity of infection*) potwierdziła obecność innych enzymów o charakterze proteolitycznym, uczestniczących w degradacji białek powierzchniowych komórki gospodarza w trakcie kolonizacji jamy ustnej *P. gingivalis* (Hocevar i in. 2020; Eick i in. 2019).

Wirulencja bakterii uzależniona jest od poziomów ekspresji genów kodujących gingipainy, natomiast na ich aktywność transkrypcyjną w dużym stopniu wpływają interakcje z komórkami nabłonka jamy ustnej. Potwierdzają to wyniki badań przedstawione przez Hosogi i in., w których dowiedziono, że stymulacja *P. gingivalis* unieśmiertnionymi komórkami nabłonka istotnie zwiększa poziom ekspresji RgpB w porównaniu z czystą, niestymulowaną hodowlą bakteryjną (Bostanci i in. 2013; Immamura i in. 2003; Eick i in. 2019).

Zespół Xu i in. analizował funkcję biologiczną gingipain *P. gingivalis* w warunkach stresowych. Badaniom poddano szczep dziki W83 oraz konstrukt laboratoryjny ΔPG0352, będący mutantem delecyjnym szczepu laboratoryjnego *P. gingivalis*. Analizy obu porównywanych szczepów wykazały, że mutant laboratoryjny charakteryzuje się niższą aktywnością zarówno w normalnych, jak i stresowych warunkach. Obserwacje te wskazują, że na aktywność gingipain wpływ mają także warunki środowiskowe (pH, temperatura, stres oksydacyjny) (Xu i in. 2017).

4. Podsumowanie

Przewlekłe zapalenie przyzębia stanowi częste schorzenie o podłożu infekcyjnym i zapalnym o istotnym znaczeniu w zakresie zdrowia publicznego. Za główny czynnik etiologiczny cPD uważana jest Gram-ujemna bakteria *P. gingivalis*, wyposażona w liczne czynniki wirulencji będące jednocześnie elementami strukturalnymi komórki bakteryjnej, jak fimbrie, czy lipopolisacharyd lub cieszące się w ostatnich latach znacznym zainteresowaniem badaczy czynniki o charakterze enzymatycznym, tj. gingipainy i PPAD.

W związku z powyższym, celem artykułu był przegląd doniesień na temat właściwości i roli białek enzymatycznych produkowanych przez *P. gingivalis* w wirulencji periodontopatogenu. W artykule uwaga została skupiona głównie na białku enzymatycznym PPAD oraz proteazach cysteinowych, tzw. gingipainach. Biorąc pod uwagę niezwykle złożoną mechanizmów patogenetycznych cPD, a z drugiej strony istotny wpływ białek enzymatycznych produkowanych przez *P. gingivalis* na rozwój tej choroby, wydaje się, iż enzymy te w przyszłości mogą stanowić skuteczny cel terapeutyczny cPD. Strategia ta wymaga jednak skonstruowania i przetestowania inhibitorów specyficznych dla tych enzymów.

1. Literatura

- Abdullah SN, Farmer EA, Spargo L et al. (2013) *Porphyromonas gingivalis* peptidylarginine deiminase substrate specificity. *Anaerobe* 23: 102–108.
- Bhagal PS, Slakerski N, Reynolds EC (1997) A cel-associated protein complex of *Porphyromonas gingivalis* W50 composed of Arg- and Lys-specific cysteine proteinases and adhesins. *Microbiology* 143: 2485-2495.
- Bostanci N, Thurnheer T, Aduse-Opoku J et al. (2013) *Porphyromonas gingivalis* regulates TREM-1 in human polymorphonuclear neutrophils via its gingipains *PLOS One* 8: e75784.
- Curtis MA, Diaz PI, Van Dyke TE (2020) The role of the microbiota in periodontal disease. *Periodontology* 2000 83(1): 14-25.
- Curtis MA, Kuramitsu HK, Lantz M et al. (2000) Molecular genetics and nomenclature of proteases of *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Periodontal Research* 34: 464-472.
- Eick S, Gadzo N, Tacchi M et al. (2019) Gingipains impair attachment of epithelial cel to dental titanium abutment surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research Part B* 107B: 2549-2556.
- Gabarrini G, Grasso S, van Winkellhoff AJ et al. (2020) Gingimaps: Protein Localization in the Oral Pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 84(1): e00032-19.
- Gawron K, Bereta G, Nowakowska Z et al. (2014) Peptidylarginine deiminase from *Porphyromonas gingivalis* (PPAD) contributes to infection of gingival fibroblasts and induction of PGE2-signaling pathway. *Molecular Oral Microbiology* 29(6): 321-332.
- Hocevar K, Vizovisek M, Wong A et al. (2020) Proteolysis of gingival keratinocyte cell surface proteins by gingipains secreted from *Porphyromonas gingivalis*-proteomic insights into mechanisms behind tissue damage in the diseased gingiva. *Frontiers in Microbiology* 11: doi: 10.3389/fmicb.2020.00722.
- Imamura T, Travis J, Potempa J (2003) The biphasic virulence activities of gingipains: activation and inactivation of host proteins. *Current Protein & Peptide Science* 4: 443-450.
- Jenning M, Marklein B, Ytterberg J et al. (2020) Bacterial citrullinated epitopes generated by *Porphyromonas gingivalis* infection a missing link for ACPA production. *Annals of the Rheumatic Disease* 79: 1194-1202.

- Konig MF, Paracha AS, Moni M et al. (2015) Defining the role of *Porphyromonas gingivalis* peptidylarginine deiminase (PPAD) in rheumatoid arthritis through the study of PPAD biology. *Annals of the Rheumatic Disease* 74: 2054-2061.
- Montgomery AB, Kopec J, Shrestha L et al. (2016) Crystal structure of *Porphyromonas gingivalis* peptidylarginine deiminase: implications for autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Disease* 75(6): 1255-1261.
- Potempa J, Mikolajczyk-Pawlinska J, Brassel D et al. (1998) Comparative properties of two cysteine proteinases (gingipains R), the products of two related but individual genes of *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Biological Chemistry* 273: 21648-21657.
- Quirke AM, Lugli EB, Wegner N et al. (2014) Heightened immune response to autocitrullinated *Porphyromonas gingivalis* peptidylarginine deiminase: a potential mechanism for breaching immunologic tolerance in rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Disease* 73: 263-269.
- Rodriguez SB, Stitt BL, Ash DE (2009) Expression of peptidylarginine deiminase from *Porphyromonas gingivalis* in *Escherichia coli*: enzyme purification and characterization. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 488:14-22.
- Stobernack T, du Teil Espina M, Mulder LM et al. (2018) A secreted bacterial peptidylarginine deiminase can neutralize human innate immune defenses. *mBio* 9: doi. 10.1128/mBio.01704-18.
- Vermilyea DM, Ottenberg GK, Davey M (2019) Citrullination mediated by PPAD constrains biofilm formation in *P. gingivalis* strain 381. *npj Biofilms and Microbiomes* 5(7): doi.org/10.1038/s41522-019-0081-x.
- Xu X, Tong T, Yang X et al. (2017) Differences in survival, virulence and biofilm formation between sialidase-deficient and W83 wild-type *Porphyromonas gingivalis* strains under stressful environmental conditions. *BMC Microbiology* 17: 178-188.

Fundowanie:

Artykuł pt. ‘**Rola białek enzymatycznych *Porphyromonas gingivalis* w wirulencji bakterii**’ powstał w ramach realizacji projektu OPUS (UMO-2018/29/B/NZ2/01930 – K.G.) oraz Projektu Statutowego.

13. Bioróżnorodność ryzobiów w Południowej Afryce

Biodiversity of rhizobia in South Africa

Aleksandra Wichrowska, Joanna Banasiewicz

Katedra Biochemii i Mikrobiologii Instytutu Biologii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Opiekun naukowy: prof. SGGW dr hab. Tomasz Stępkowski

Wichrowska Aleksandra: aleksawicher@gmail.com

Słowa kluczowe: symbionty roślin, bakterie brodawkujące, ryzosfera

Streszczenie

Ryzobia to bakterie glebowe mające zdolność do tworzenia symbiozy z roślinami strączkowymi i wytwarzania na powierzchni ich korzeni guzkowatych struktur – brodawek korzeniowych. Bakterie te odpowiadają za biologiczne wiązanie azotu. Dzięki nim roślina otrzymuje ten niezbędny do jej wzrostu pierwiastek, w możliwej do przyswojenia przez nią formie amoniaku. Większość znanych ryzobiów to alfa-ryzobia, należą one do klasy *Alphaproteobacteria*. Z brodawek korzeniowych roślin porastających tereny Południowej Afryki można wyizolować również ryzobia należące do klasy *Betaproteobacteria*. Bakterie te są nazywane beta-ryzobiami i należą do rodziny *Burkholderiaceae*, która nie była wcześniej utożsamiana z biologicznym wiązaniem azotu. Przedstawiciele tej rodziny byli pierwotnie poznani jako patogeny roślin wywołujące np. zgniliznę cebuli oraz zakażenia zwierząt i człowieka. W miarę poznawania zdolności tych bakterii do promowania wzrostu roślin pojawiła się potrzeba zmiany klasyfikacji w obrębie tej rodziny. Na terenach Południowej Afryki bakterie należące do tej grupy i mające zdolność brodawkowania tworzą symbiozę z motylkowatymi roślinami strączkowymi. Symbioza roślin strączkowych zarówno z beta jak i alfa ryzobiami pomaga wzrastać roślinie w trudnych warunkach środowiskowych. Poznanie bioróżnorodności ryzobiów zależnie od środowiska ich występowania może nam pomóc lepiej zrozumieć rolę tej zależności.

1. Wstęp

Ryzobia są to bakterie posiadające zdolność do tworzenia symbiozy z roślinami motylkowatymi. Rośliny te dzięki symbiozie otrzymują azot w zredukowanej formie, amoniaku, możliwej do metabolizowania w ich komórkach. Ryzobia posiadają zdolność redukcji azotu cząsteczkowego dzięki enzymowi - nitrogenazie. Zaledwie dzięki kilku kilogramom tego enzymu rośliny motylkowane wiążą w przybliżeniu 90 mln ton azotu rocznie (Vance 1998). Wiązanie azotu atmosferycznego (N_2) odbywa się w brodawkach korzeniowych (Rys. 1), które powstają z komórek wewnętrznych warstw kory pierwotnej korzeni roślin motylkowatych.

Proces ten możliwy jest między określonym rodzajem bakterii i gospodarza roślinnego. Z uwagi na to pierwszym jego etapem jest rozpoznanie, które polega na wymianie sygnałów chemicznych między ryzobium, a rośliną. Korzenie roślin wydzielają flawonoidy oraz betainy, które to aktywują geny *nod* ryzobiów. Geny te kodują około 25 białek, które to wymagane są do syntezy oraz eksportu czynnika Nod. Bakterie przenikają do wnętrza korzenia przez ścianę komórkową i tworzą brodawki korzeniowe, w procesie formowania których uczestniczą czynniki Nod odpowiedzialne za inicjację zmian w korzeniu rośliny na wczesnym etapie powstawania brodawki m.in. deformację włósnika korzeniowego, czy inicjację podziału komórek w korze korzenia, prowadzące do powstania merystemu i zaczątką guzka. (Gage i in. 2004). Ryzobia różnią się od innych żywych i symbiotycznych mikroorganizmów wiążących azot zdolnością do wytwarzania cząsteczek czynnika Nod. Inne symbiotyczne *loci* także uczestniczą w procesach związanych z tą symbiozą np. *nif* biorące udział w wiązaniu azotu (Beukes i in. 2016).



Rys. 1. Zdjęcie przedstawia brodawki korzeniowe, wytworzone w wyniku symbiozy z ryzobium (https://pl.wikipedia.org/wiki/Plik:Medicago_italica_root_nodules_2.JPG).

2. Bioróżnorodność ryzobiów

Nazwa ryzobia pochodzi od nazwy rodzajowej *Rhizobium*, która to jeszcze na początku lat osiemdziesiątych obejmowała wszystkie bakterie z grupy. Aktualnie dzięki wykorzystaniu biologii molekularnej i analizie m.in. genu 16S rRNA klasyfikacja filogenetyczna bakterii brodawkowych jest bardziej różnorodna (Tab. 1) (Martyniuk, 2008).

Tab. 1. Rodzaje bakterii brodawkowych i rośliny, z którymi tworzą symbiozę (na podstawie – Martyniuk 2008).

Rodzaj	Roślina - gospodarz
<i>Rhizobium</i>	<i>Pisum, Viciae, Lathyrus, Lens, Trifolium, Phaseolus</i>
<i>Mesorhizobium</i>	<i>Lotus</i>
<i>Sinorhizobium</i>	<i>Medicago, Melilotus, Trigonella</i>
<i>Azorhizobium</i>	<i>Sesbania</i>
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Glycine, Lupinus</i>
<i>Allorhizobium</i>	<i>Neptunia</i>

W obecnej systematyce ryzobia nie tworzą jednego klastra taksonomicznego. Są one rozmieszczone w odlegle spokrewnionych klasach *Alphaproteobacteria* oraz *Betaproteobacteria* (Tab. 2). W związku z tym ryzobia w obrębie klasy mieszają się z patogenami roślinnymi i zwierzęcymi oraz bakteriami fotosyntetyzującymi i wiele niesymbiotycznych bakterii jest bliżej spokrewnionych z ryzobiami niż te same ryzobia z innymi ryzobiami (Young i Haukka 1996). Ryzobia można podzielić również ze względu na tempo wzrostu: na szybko lub umiarkowanie rosnące rodzaje *Rhizobium*, *Allorhizobium*, *Sinorhizobium* i *Mesorhizobium* oraz wolno rosnące *Bradyrhizobium* i *Azorhizobium*.

Ryzobia kolonizują zarówno nisze glebowe jak i brodawki korzeniowe. Izolaty ryzobiów są jednak zazwyczaj pobierane z brodawek, a więc większość gatunków zdeponowanych w bazach to szczepy brodawkowe. Jest to jednak tylko niewielka część bakterii symbiotycznych. Zastosowanie starterów specyficznych dla *nodD* ujawniło większą różnorodność sekwencji w DNA glebowym niż było znalezione w izolatach pochodzących z brodawek korzeniowych (Zézé i in. 2001). Gen *nodD* jest wszechobecny u ryzobiów. Ze względu na różne kopie *nodD* i ich różne preferencje dotyczące

flawonoidów, symbiotyczne cechy *nodD* często różnią się w zależności od gatunku (Perret i in. 2000). Geny *nodD* jak i geny *syrM*, *nolA*, *nolR* oraz *nodVW* w obecności flawonoidów regulują aktywność genów nodulacji (Spaink i in. 1987; Perret i in. 2000). Geny nodulacji (*nod*, *nol* i *noe*) są niezbędne do rozpoczęcia infekcji i tworzenia brodawek korzeniowych. Oprócz nich w symbiozie tej kluczowymi genami są geny wiązania azotu (*nif* i *fix*), odpowiadające za kodowanie i kontrolowanie aparatu wiążącego azot. Najlepiej zbadanymi genami wiązania azotu u ryzobiów są *nifH* oraz *nifD*. Geny te są składnikami operonu *nifHDK*. Gen *nifH* koduje dwie identyczne podjednostki składnika II denitrogenazy. U ryzobiów może on występować w wielu kopiach, jednak ich sekwencjonowanie wykazało, że są praktycznie identyczne. Gen *nifD* koduje podjednostki alfa składnika I w nitrogenazie (Parker i in. 2002; Ueda i in. 1995). Do badania różnorodności ryzobiów i ich ewolucji zazwyczaj stosuje się trzy zestawy markerów DNA, które są ukierunkowane odpowiednio na *loci* związane z wiązaniem azotu oraz powstawaniem brodawek. Wynika to z tego, że *loci* determinujące wiązanie azotu (*nif* i *fix*) oraz nodulację (*nod*) znajdują się na elementach ruchomych (tj. wyspach symbiotycznych lub plazmidach) (Beukes i in. 2013).

Tab. 2. Lista znanych gatunków bakterii ryzobialnych i nie-ryzobialnych tworzących brodawki korzeniowe (na podstawie - Dresler-Nurmi i in. 2005).

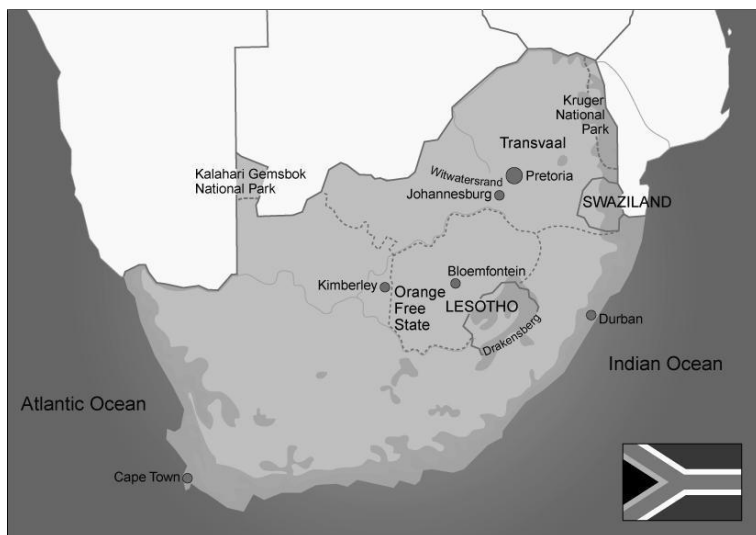
<i>α-Rhizobia</i>	<i>Bradyrhizobiaceae</i>	<i>Blastobacter</i> <i>B. denitrificans</i> <i>Bradyrhizobium</i> <i>B. canariense</i> <i>B. elkanii</i> <i>B. japonicum</i> <i>B. liaoningense</i> <i>B. yuanmingense</i>
	<i>Brucellaceae</i>	<i>Ochrobactum</i> <i>O. lupini</i>
	<i>Hyphomicrobiaceae</i>	<i>Azorhizobium</i> <i>A. caulidonas</i> <i>A. doebereinae</i> <i>Devosia</i> <i>D. neptunia</i>
	<i>Methylobacteriaceae</i>	<i>Methylobacterium</i> <i>M. nodulans</i>
	<i>Rhizobiaceae</i>	<i>Allorhizobium</i> <i>A. undicola</i> <i>Ensifer</i> <i>E. adhaerens</i> <i>Rhizobium</i> <i>R. etli</i> <i>R. gallicum</i> <i>R. giardinii</i> <i>R. galegae</i> <i>R. hainanense</i> <i>R. huautlense</i> <i>R. indigoferae</i>

	<i>R. leguminosarum</i> <i>R. loessense</i> <i>R. lusitanum</i> <i>R. mongolense</i> <i>R. sullae</i> <i>R. tropici</i> <i>R. yanglingense</i> Sinorhizobium <i>S. americanum</i> <i>S. arboris</i> <i>S. fredii</i> <i>S. kostiense</i> <i>S. kummerowiae</i> <i>S. medicae</i> <i>S. meliloti</i> <i>S. morelense</i> <i>S. saheli</i> <i>S. terangae</i> <i>S. xinjiangense</i>
	Phyllobacteriaceae Mesorhizobium <i>M. amorhae</i> <i>M. chacoense</i> <i>M. ciceri</i> <i>M. huakuii</i> <i>M. loti</i> <i>M. mediterraneum</i> <i>M. plurifarum</i> <i>M. septentrionale</i> <i>M. temperatum</i> <i>M. tianshanense</i> Phylobacterium <i>P. trifolii</i>
<i>β-Rhizobia</i>	Burkholderiaceae Burkholderia <i>B. caribensis</i> <i>B. mimosarum</i> <i>B. phymatum</i> <i>B. tuberum</i> Cupriavidus <i>C. taiwanensis</i>
	Oxalobacteriaceae Herbaspirillum <i>H. lusitanum</i>

3. Bioróżnorodność ryzobiów na terenach Południowej Afryki

Pomimo dużej bioróżnorodności roślin motylkowatych na terenach Południowej Afryki, symbionty roślinne pochodzące z tego obszaru są dość słabo zbadane (Lock 1989). Ich różnorodność i rozmieszczenie mogą zależeć oprócz dostępności konkretnego gospodarza roślinnego od warunków środowiskowych, takich jak pH, czy zasobność w składniki odżywcze gleby (Garau i in. 2009). Na rozmieszczenie ryzobiów, a dokładniej gatunków *Burkholderia* szczególnie wpływ wydają się mieć

czynniki środowiskowe takie jak geologia i wysokość nad poziomem morza, a w szczególności wpływ wysokości na temperaturę i/lub opady deszczu (Bontemps i in. 2010). Na terenie Południowej Afryki (Rys. 2) oprócz powszechnie występujących α -ryzobiów z brodawk korzeniowych możemy wyizolować również β -ryzobia. Bakterie te należą do rodziny *Burkholderiaceae*, która nie była pierwotnie utożsamiana z wiązaniem azotu. Przedstawiciele tej rodziny byli wcześniej poznani jako patogeny roślin wywołujące np. zgniliznę cebuli oraz zakażenia zwierząt i człowieka powodujące między innymi zakażenia szpitalne.



Rys. 2. Obszar Południowej Afryki (<https://www.usnews.com/static-atlas/assets/img/news/best-countries/globes/South%20Africa.png>).

β -ryzobia zostały odkryte stosunkowo niedawno. Za pomocą analizy filogenetycznej sekwencji genów 16S rRNA wykazano istnienie ryzobiów niepasujących do którejkolwiek z głównych opisanych gałęzi ryzobiów z podklasy α -Proteobakterii, a należących do podklasy β -Proteobakterii (Moulin i in. 2001). W ciągu ostatnich lat wraz ze wzrostem badań nad rodzimymi roślinami motylkowatymi Południowej Afryki odkryto wiele beta-ryzobiów należących do rodzaju *Burkholderia* (Mishra i in. 2012). Jednym z pierwszych rozpoznanych gatunków β -ryzobiów była *Paraburkholderia tuberum* (Sawana i in. 2014), zgłoszona jako symbiont południowoafrykańskiej rośliny motylkowej *Aspalathus carnosus* (Lemaire i in. 2016). Od tego czasu zgłoszono liczne izolaty *Paraburkholderia* z brodawk korzeniowych pochodzących z Południowej Afryki. Badania prowadzone na izolatach bakterii brodawkujących rośliny z rejonu Południowej Afryki wykazały znaczną różnorodność tych izolatów oraz to, że należą one zarówno do α -ryzobiów jak i β -ryzobiów.

W badaniach przeprowadzonych na izolatach bakteryjnych pochodzących z *Vachellia karroo* (Beukes i in. 2019), spośród 88 zebranych izolatów 66 należało do różnych rodzajów w *Alphaproteobacteria*, a 19 zostało umieszczonych w *Betaproteobacteria*. Bakterie te rozdzieliły się na 26 przypuszczalnych gatunków z przedstawicielami alfa-ryzobiowych rodzajów *Ensifer*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* i *Bradyrhizobium* oraz beta-ryzobiowego rodzaju *Paraburkholderia*.

W badaniach prowadzonych na symbiontach ryzobiowych związanych z piętnastoma gatunkami roślin motylkowatych rodzimych dla Prowincji Przylądkowej Zachodniej (WCP) w Afryce Południowej również odkryto β -ryzobia (Beukes i in. 2013). Wśród analizowanych roślin strączkowych znalazły się trzy gatunki z plemienia *Hypocalyptae* (*Hypocalyptus sophoroides*, *Hypocalyptus oxalidifolius* i *Hypocalyptus coluteoides*) oraz wybrane gatunki z pokrewnego plemienia *Podalyriaceae*. Zbiór *Burkholderia* wyizolowanych z brodawk korzeniowych roślin z rodzajów *Hypocalyptus*, *Virgilia*, *Podalyria* i *Cyclopia* badanych w tym badaniu był nieoczekiwanie zróżnicowany. Ta różnorodność prawdopodobnie reprezentuje jednak tylko niewielką część znacznie

większej puli bakterii z rodzaju *Burkholderia* zdolnej do tworzenia brodawek w roślinach strączkowych.

4. Podsumowanie

Na terenach Południowej Afryki ryzobia wykazują szczególną różnorodność. Oprócz powszechnie występujących α -ryzobiów na terenach tych dużą część izolatów stanowią do niedawna nieodkryte β -ryzobia. Może być to związane z dużą różnorodnością roślin motylkowatych na tych terenach, bądź z odpowiednimi warunkami gleby m.in. pH, zasobnością w składniki odżywcze, czy warunkami atmosferycznymi t.j. opadami deszczu, czy temperaturą. Odpowiednie warunki mogą decydować o sukcesie ekologicznym różnych grup ryzobiów. Możliwe jest też, że bioróżnorodność i charakterystyka rozmieszczenia ryzobiów zależy od kompatybilności między symbiontami. Warunkuje to fakt, że początek symbiozy jest możliwy dopiero po rozpoznaniu odpowiedniego gospodarza, który to proces przebiega z udziałem specyficznych czynników Nod. Z pewnością wymaga to wciąż dalszych badań mających na celu poznanie bioróżnorodności ryzobiów oraz czynników determinujących zależności symbiotyczne. Przeglądając najnowsze doniesienia naukowe, można zwrócić uwagę na to, że dzięki analizie z użyciem markerów DNA odkrywane są wciąż nowe gatunki ryzobiów, a w szczególności β -ryzobiów. Poznanie bioróżnorodności ryzobiów w odniesieniu do warunków środowiskowych, w których występują, może pomóc nam lepiej zrozumieć zależności występujące między nimi a gospodarzem roślinnym.

5. Literatura

- Beukes CW, Venter SN, Law IJ i.in. (2013) South african papilionoid legumes are nodulated by diverse burkholderia with unique nodulation and nitrogen-fixation Loci. PloS one 8(7), e68406.
- Beukes CW, Stępkowski T, Venter SN i.in. (2016) Crotalariaeae and Genisteeae of the South African Great Escarpment are nodulated by novel *Bradyrhizobium* species with unique and diverse symbiotic loci. Molecular Phylogenetics and Evolution 100, 206–218.
- Beukes CW, Boshoff FS, Phalane FL i.in. (2019) Both Alpha- and Beta-Rhizobia Occupy the Root Nodules of *Vachellia karroo* in South Africa. Frontiers in Microbiology 10, 1195.
- Bontemps C, Elliott GN, Simon MF i.in. (2010) *Burkholderia* species are ancient symbionts of legumes. Mol Ecol. 19(1), 44-52.
- Dresler-Nurmi A, Fewer DP, Räsänen LA i.in. (2007) The Diversity and Evolution of Rhizobia. Microbiology Monographs 8:3-41.
- Gage DJ (2004) Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. Microbiol Mol Biol Rev. Jun;68(2):280-300.
- Garau G, Yates RJ, Deiana P i.in. (2009) Novel strains of nodulating *Burkholderia* have a role in nitrogen fixation with papilionoid herbaceous legumes adapted to acid, infertile soils. Soil Biol Biochem 41, 125–134.
- Lemaire B, Chimphango SBM, Stirton C i.in. (2016) Biogeographical patterns of legume-nodulating *Burkholderia* spp.: from African Fynbos to continental scales. Appl. Environ. Microbiol 82:5099–5115.
- Lock JM (1989) Legumes of Africa: a check-list. UK: Royal Botanic Gardens, Kew.
- Martyniuk S.(2008) Znaczenie procesu biologicznego wiązania azotu atmosferycznego w rolnictwie ekologicznym, Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering 53(4).
- Mishra RP, Tisseyre P, Melkonian R i.in. (2012) Genetic diversity of *Mimosa pudica* rhizobial symbionts in soils of French Guiana: investigating the origin and diversity of *Burkholderia phymatum* and other beta-rhizobia. FEMS Microbiol Ecol 79(2): 487-503.
- Moulin L, Munive A, Dreyfus B i.in. (2001) Nodulation of legumes by members of the β -subclass of Proteobacteria. Nature 411: 948–950.
- Parker MA, Lafay B, Burdon J i.in. (2002) Conflicting phylogeographic patterns in rRNA and *nifD* indicate regionally restricted gene transfer in *Bradyrhizobium*. Microbiol 148:2557–2565.
- Perret X, Staehelin C, Broughton WJ (2000) Molecular basis of symbiotic promiscuity. Microbiol Mol Biol Rev 64: 180–201.

- Sawana A, Adeolu M, Gupta RS (2014) Molecular signatures and phylogenomic analysis of the genus *Burkholderia*: proposal for division of this genus into the emended genus *Burkholderia* containing pathogenic organisms and a new genus *Paraburkholderia* gen. nov. harboring environmental species. *Front. Genet.* 5: 429.
- Spaink HP, Wijffelman CA, Pees E i.in. (1987) Rhizobium nodulation gene *nodD* as a determinant of host specificity. *Nature* 328: 337–340.
- Ueda T, Suga Y, Yahiro N i.in. (1995) Genetic diversity of N₂-fixing bacteria associated with rice roots by molecular evolutionary analysis of *nifD* library. *Can J Microbiol* 41: 235–240.
- Vance CP (1998) Legume symbiotic nitrogen fixation: agronomic aspects. W: *The Rhizobiaceae*, Eds: H.P. Spaink, A. Kondorosi, P.J.J. Hooykaas, Kluwer Acad. Pub. 509-530.
- Young JPW, Haukka KE (1996) Diversity and phylogeny of rhizobia. *New Phytol* 133:87–94.
- Zézé A, Mutch LA, Young JP (2001) Direct amplification of *nodD* from community DNA reveals the genetic diversity of *Rhizobium leguminosarum* in soil. *Environ Microbiol* 3: 363–370.