

AUTOREFERAT

OPIS DOROBKU I OSIĄGNIĘĆ NAUKOWYCH

DR INŻ. EWA PECKA-KIEŁB

UNIwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Katedra Biostruktury i Fizjologii Zwierząt

Wrocław, Grudzień 2016

Spis treści

1. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe	3
2. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych	4
3. Prace stanowiące szczególne osiągnięcie naukowe wynikające z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.)	5
3.1.1 Jednotematyczny cykl publikacji	5
3.1.2 Tytuł osiągnięcia naukowego.....	5
3.1.3 Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego.....	5
3.2 Opis szczególnych osiągnięć naukowych pt. „Ocena właściwości fizykochemicznych siary i mleka, wybranych gatunków zwierząt gospodarskich”	6
3.2.1 Skład oraz udział frakcji białkowych w siarze i mleku kłaczy	9
3.2.2 Parametry technologiczne siary i mleka krów w zależności od wybranych czynników	10
3.2.3 Wnioski końcowe	15
4. Towarzyszące osiągnięcie naukowo-badawcze po uzyskaniu tytułu doktora nauk rolniczych pod tytułem: „Fermentacja <i>in vitro</i> w przewodzie pokarmowym wybranych gatunków zwierząt”	16
4.1 Zmiany przebiegu procesów fizjologicznych w żwaczu krów i owiec w zależności od ilości zastosowanego suszonego wywaru z kukurydzy	17
4.2 Analiza profilu fermentacji <i>in vitro</i> w treści przewodu pokarmowego wybranych gatunków zwierząt dziko żyjących.....	21
4.3 Wpływ Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Cr^{2+} wprowadzonych do soi metodą biosorbcji w na wybrane parametry fermentacji w jelicie ślepym w warunkach <i>in vitro</i> u kur niosek.....	23
4.4 Wnioski końcowe	26

1. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe

Urodziłam się 17 grudnia 1982 roku w Tarnowie. W roku 1996 ukończyłam szkołę podstawową, a następnie naukę kontynuowałam w technikum weterynaryjnym w Trzcianie k/Rzeszowa. Po ukończeniu szkoły średniej i uzyskaniu świadectwa dojrzałości, studia licencjackie o specjalności Chemia Stosowana rozpoczęłam w 2002 roku w Państwowej Wyższej Szkole Zawodowej w Tarnowie, gdzie 3 lutego 2006 roku zdałam egzamin licencjacki, na podstawie pracy pt. „Porównanie dokładności i precyzji w oznaczaniu jonów chlorkowych metodą Mohra i chromatografii jonowej HPIC” pod opieką dr. Marka Meusa.

W 2002 r. podjęłam studia niestacjonarne na Wydziale Biologii i Hodowli Zwierząt Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, kierunek zootechnika.

W 2006 roku ukończyłam roczny Kurs Pedagogiczny na Państwowej Wyższej Szkole Zawodowej w Tarnowie.

W lutym 2006 roku zostałam przyjęta na Wydział Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, specjalność chemia środowiska. 11 czerwca 2007 roku uzyskałam tytuł magistra chemii, broniąc pracę pod tytułem: „Stabilność chemiczna kompozytowych materiałów katodowych otrzymanych na bazie spinelu litowo-manganowego podstawionego siarką” pod kierunkiem dr. Marcina Molendy.

We wrześniu 2007 roku rozpoczęłam studia doktoranckie na Wydziale Biologii i Hodowli Zwierząt w Zakładzie Hodowli Bydła i Produkcji Mleka. 23. lipca 2009 roku uzyskałam tytuł mgr inż. zootechniki. Pracę magisterską pt. „Wpływ zastosowania w żywieniu krów suszonego wywaru z kukurydzy na ich wydajność i cechy fizyko-chemiczne mleka” wykonałam pod opieką prof. dr hab. Andrzeja Zachwiei.

Pod kierunkiem prof. dr hab. Andrzeja Zachwiei w latach 2007-2011 wykonałam pracę doktorską pt. Zmiany właściwości fizyko-chemicznych siary i mleka w stanach zapalnych gruczołu mlekowego krów w zależności od genetycznego polimorfizmu κ-kazeiny. Obrona pracy doktorskiej odbyła się 16 stycznia 2012 na Wydziale Biologii i Hodowli Zwierząt Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.

2. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

9. listopada 2009 roku rozpoczęłam pracę, jako starszy technik w Zakładzie Fizjologii Zwierząt na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej. Zajmowałam się badaniami związanymi z fizjologią przewodu pokarmowego zwierząt przeżuwających oraz monogastrycznych. Wykonywałam fermentację *in vitro* treści żwacza, jelita ślepego i okrężnicy, testując pasze oraz dodatki paszowe. Oznaczenia produktów fermentacji wykonywałam na chromatografie gazowym firmy Agilent Technology GC/FID/TCD. Do osiągnięć laboratoryjnych w Zakładzie Fizjologii Zwierząt mogę zaliczyć walidację i wdrożenie metody oznaczania metanu na chromatografie gazowym.

Od 1.10. 2013 roku rozpoczęłam pracę na ½ etatu jako asystent oraz na ½ etatu jako specjalista w Zakładzie fizjologii Zwierząt.

W dniach 11-12.04.2013 roku uczestniczyłam w Panelu Ekspertów w projekcie WROVASC–Zintegrowane Centrum Medycyny Sercowo-Naczyniowej, współfinansowanego przez Unię Europejską w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka na lata 2007-2013, a od 7.12.2012 do 31.12.2013 roku byłam przedstawicielem wykonawcy, którym jest Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu Zakład Fizjologii Zwierząt na wykonanie dwóch zdań w tym projekcie.

Od dnia 1. Października 2014 roku zostałam zatrudniona na pełnym etacie asystenta, nadal wykonując analizy na chromatografie gazowym. Od 6.10.2014 roku do 6.04.2015 odbyłam staż na Słowacji (The University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice Department of Animal Husbandry, Institute of nutrition, dietetics and feed production). Staż był finansowany z projektu „Ustawiczne all inclusive”, współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego - Kapitał ludzki Narodowa Strategia Spójności. Po odbytym stażu zagranicznym awansowałam na etat adiunkta (1.10.2015).

Całość mojego dorobku naukowego obejmuje 28 oryginalnych prac, w tym 20 prac w czasopismach wyróżnionych w *Journal Citation Reports* (JCR), 1 artykuł popularno-naukowy, 8 rozdziałów w monografiach. Łącznie przedstawiłam 68 komunikatów i referatów na zjazdach oraz konferencjach krajowych i międzynarodowych. Sumaryczna liczba punktów za publikacje według listy MNiSW wynosi 516 a suma IF=14,195. Całkowita liczba cytowań wszystkich prac w bazie *Web of Science* wynosi 32, a indeks Hirscha = 4.

3. Prace stanowiące szczególne osiągnięcie naukowe wynikające z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.)

3.1.1 Jednotematyczny cykl publikacji. Osiągnięcie naukowe obejmuje 5 publikacji o łącznym IF= 2,819 i 85 punktów MNiSW.

3.1.2 Tytuł osiągnięcia naukowego:

„Ocena właściwości fizyko-chemicznych siary i mleka, wybranych gatunków zwierząt gospodarskich”

3.1.3 Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego

3.1.3 a) Pecka E., Dobrzański Z., Zachwieja A., Szulc T., Czyż K. 2012: Studies of composition and major protein level in milk and colostrum of mares. *Animal Science Journal* (83) 162-168 (I-1)¹

3.1.3 b) Pecka E., Zachwieja A., Góralska-Kowalska M. 2012: Poziom wybranych makroelementów oraz selenu w siarze krów w zależności od ich wieku oraz liczby komórek somatycznych. [Level of selectes macroelements and selenium in colostrum of cows depending on their age and amount of somatic cells]. *Przemysł Chemiczny* 91/5, 926-928 (I-2)¹

3.1.3 c) Zielak-Steciwko A., Pecka E., Kęsek M., Kuczaj M., Szulc T. 2014: Changes in the proportion of proteins reactions depending on lactoferrin polymorphism gene and the somatic Cells Count in the milk of Polish Holstein-Frisian and Polish Red-White cattle. *Veterinarija ir zootechnika/Lithuania* ISSN 1392-2130, T.66 (88) 83-89 (I-3)¹

3.1.3 d) Pecka-Kielb E., Vasil M., Zachwieja A., Zawadzki W., Elecko J., Zigo F., Illek J., Z. Farkašova Z. 2016: An effect of mammary gland infection caused by *Streptococcus uberis* on composition and physicochemical changes of cows' milk. *Polish Journal of Veterinary Sciences* Vol. 19, No. 1, 49–55 (I-4)¹

3.1.3 e) Vasil M., Pecka-Kielb E., Zachwieja A., Zawadzki W., Elecko J., Zigo F., Illek J., Z. Farkašova Z. 2016: „Effects of udder infections with *Staphylococcus xylosus* and

¹ numeracja wg załącznika nr 4

Staphylococcus warneri on the composition and physicochemical changes in cows milk“
Polish Journal of Veterinary Sciences Vol. 19, No. 4, 841–848 (I-5)¹

Oświadczam, że w/w publikacjach, w zdecydowanej większości, opisane badania były moją autorską koncepcją, byłam głównym wykonawcą badań oraz autorem tekstu. Oświadczenia współautorów wszystkich prac zostały umieszczone w załączniku nr 7.

3.2 Opis szczególnych osiągnięć naukowych pt. „Ocena właściwości fizykochemicznych siary i mleka, wybranych gatunków zwierząt gospodarskich”

Siara to pierwsza wydzielina gruczołu mlekowego ssaków. Posiada ona właściwości nutraceutyczne, immunodelujące, antyoksydacyjne, bakteriobójcze i bakteriostatyczne (Lindner i wsp. 2011). Zawiera cytokiny oraz hormony wzrostu, które wpływają na rozwój jelit u nowonarodzonych zwierząt (Palm i wsp. 2013, Hyrslova i wsp. 2016). Zaitsev i Markova (2011) wykazali, że siara charakteryzuje się wyższym poziomem wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA), przy obniżonym udziale jednonienasyconych (MUFA) oraz nasyconych (SFA) długołańcuchowych kwasów, w porównaniu do mleka.

Białka kazeinowe siary stanowią główne źródło wapnia i fosforu oraz aminokwasów dla nowo narodzonych ssaków (Rollema 1992). W 100-u g siary poziom metioniny kształtuje się w przedziale od 1,98 do 2,41 g natomiast cysteiny od 1,79 do 2,35 g (Zándoki i wsp. 2006). Białka kazeinowe zawierają selen a najwyższy poziom tego mikroelementu stwierdzono w β -kazeinie, niższy w α -, κ -, najniższy zaś w γ -kazeinie (Van Dael i wsp. 1991). Poziom związków mineralnych w siarze jest wystarczający dla prawidłowego funkcjonowania i rozwoju cieląt. W literaturze napotkano wyniki badań analizujących wpływ modyfikacji żywienia poprzez stosowanie mineralnych i mineralno-witaminowych dodatków paszowych na poziom związków mineralnych w wydzielinie gruczołu mlekowego (Fisher i wsp. 1994, Holtenius i wsp. 2008, Castillo i wsp. 2013). Stwierdzono również zmiany poziomu związków sodu, wapnia, potasu, chloru w mleku w zależności od liczby komórek somatycznych (Ogola i wsp. 2007). Jednak w dostępnym piśmiennictwie nie napotkano badań opisujących wpływ stanu zdrowia wymion na zawartość selenu w siarze i mleku.

Siara krów, może być konserwowana, a następnie wykorzystywana jako źródło immunoglobulin, składników mineralnych i substancji biologicznie czynnych nie tylko w żywieniu cieląt ale również innych gatunków zwierząt oraz w diecie człowieka (Boudry i wsp. 2008 Pandey i wsp. 2011, Hyrslova i wsp. 2016). W przemyśle farmaceutycznym siara

stosowana jest jako dodatek do produkcji preparatów probiotycznych stymulujących odporność organizmu (Hyrsova i wsp. 2016). Związki mineralne oraz tłuszcz, kazeina, laktoza spełniają funkcje ochronną dla immunoglobulin oraz TGF- β -2 w procesie konserwacji siary (Elfstrand i wsp. 2002). Skład siary podobnie jak i mleka zależy jest od wielu czynników: stadium laktacji, predyspozycji zwierzęcia, stanu jego zdrowia, warunków utrzymania i żywienia (Moreno-Rojas i wsp. 1993, Hyrslova i wsp. 2016). W praktyce dąży się do uzyskania siary o zwiększonym udziale związków mineralnych oraz immunoglobulin.

Skład i właściwości wydzieliny gruczołu mlekowego ssaków są obecnie szczegółowo analizowane. Jednak dane dotyczą głównie mleka krowiego, które stanowi 85% mleka spożywanego na całym świecie, a w mniejszym stopniu, koziego czy owczego. Badania dotyczące właściwości mleka innych gatunków zwierząt, takich jak kłaczki czy wielbłądy są rzadkie, mimo ich interesującego składu oraz wysokich walorów odżywczych (Konuspayeva i wsp. 2009). Mleko kłaczki stosowane jest jako żywność funkcjonalna dla dzieci które nie tolerują mleka krowiego (Potočnik i wsp. 2011). Jakość siary oraz mleka kłaczki determinuje stan zdrowia ich źrebiąt. Podobnie jak u bydła właściwości fizykochemiczne siary i mleka kłaczki są zmienne w czasie laktacji, zależą od wielu czynników, takich jak rasa, wiek, żywienie, długości rui, stan zdrowia, a także od indywidualnych cech zwierzęcia (Csapó i wsp. 1995, Naert i wsp. 2013).

Mleko i jego produkty charakteryzują się wysoką wartością odżywczą i stanowią podstawowy element diety człowieka. Poza mlekiem spożywczym istotny udział w strukturze produkcji i spożycia produktów mlecznych stanowią sery, najstarszy wyrób mleczny (Dobrzański i wsp. 2005, Barłowska i wsp. 2011).

Zawartość białka, tłuszczu, węglowodanów, udział frakcji białkowych, w tym kazein, określa biologiczne i technologiczne właściwości mleka. Cechy te determinowane są zarówno przez czynniki genetyczne jak i środowiskowe (Pecka i wsp. 2013, Krížová i wsp. 2016).

Intensywna selekcja bydła prowadzona w kierunku wysokiej wydajności przyczyniła się do obniżenia wartości biologicznej mleka surowego i pogorszenia jego parametrów technologicznych, głównie poprzez obniżenie odporności, czego skutkiem są występujące schorzenia zwierząt (Barłowska i wsp. 2012).

Zapalenie gruczołu mlekowego (mastitis) to najczęstsze schorzenie krów mlecznych na świecie, które niesie ze sobą ogromne skutki ekonomiczne (Hoeben i wsp. 1999, Rerk-u-suke i wsp. 2008). Mastitis może być wynikiem infekcji różnymi gatunkami drobnoustrojów, głównie szczepów *Streptococcus* i *Staphylococcus* (Lidiane i wsp. 2012). Patogeny bakteryjne powodujące zapalenie wymienia klasyfikowane są na zakaźne i środowiskowe (Lipman i wsp.

1995, Albenzio i wsp. 2002). Spośród bakterii środowiskowych w mleku często spotykane są bakterie *Streptococcus uberis*, odpowiedzialne za kliniczne i subkliniczne mastitis zarówno u małych jak i dużych przeżuwaczy (Rerk-u-suke i wsp. 2008). Natomiast według innych autorów gronkowce kolagulazo-negatywne (CNS) takie jak: *S. epidermidis*, *S. chromogenes*, *S. simulans*, *S. xylosus* i *S. warneri* są najbardziej rozpowszechnioną grupą bakterii powodujących subkliniczne mastitis (Rayala-Schultz i wsp. 2009, Sawant i wsp. 2009, Awale i wsp. 2012).

Wraz z wzrostem liczby bakterii patogennych w mleku wzrasta liczba komórek somatycznych, zmieniają się również jego właściwości fizyko-chemiczne (Santos i wsp. 2004, Rerk-u-suke i wsp. 2008). Zainfekowane bakteriami z rodzaju *Streptococcus* wymię może skutkować wydłużonym czasem koagulacji białek mleka, wyższym udziałem białek serwatkowych. Rośnie również wartość stosunku białek serwatkowych do kazein (Leitner i wsp. 2006). Wzrost przepuszczalności bariery krew-mleko w trakcie trwającego stanu zapalnego skutkuje zwiększonym przepływem białek surowicy i enzymów krwi, co może prowadzić do proteolizy białek mleka (Forsbäck i wsp. 2004). Wiele szczepów bakterii posiada cechy psychrotrofów psujących produkty żywnościowe. Fermentują one laktozę i mogą wywołać fermentację pseudomlekową, niepożądaną w przemyśle serowarskim. Istnieje również liniowa zależność pomiędzy zawartością tłuszczu i białka w mleku a wydajnością produkcji sera. Znaczący wpływ na ilość wytworzonego sera ma także poziom kwasowości (pH) oraz zawartość κ -kazeiny (Verdier-Metz i wsp. 2001).

Obecność patogenów, obniżony poziom kazein, pH, niska termostabilność, wysoki poziom mocznika w mleku mogą skutkować wydłużeniem czasu krzepnięcia sera, podwyższoną wilgotnością skrzepu, zmniejszoną wydajnością serowarską, co w konsekwencji wiąże się z większymi stratami produkcyjnymi, wzrostem kosztów produkcji i ceny produktu końcowego.

Siara i mleko charakteryzuje się obecnością laktoferyny, która ze względu na swoje właściwości, odgrywa istotną rolę w absorpcji żelaza przez błonę śluzową jelita, bierze udział w procesie aktywacji fagocytów i ma istotny wpływ na odpowiedź immunologiczną organizmu. Ponadto laktoferynę charakteryzuje działanie bakteriostatyczne i bakteriobójcze oraz właściwości antynowotworowe (Yoshida i wsp. 2000, Alderova i wsp. 2008).

Genetyka molekularna stwarza możliwości szybkiego postępu w zakresie poprawy składu mleka oraz jego przydatności technologicznej, poprzez identyfikację genów determinujących cechy ilościowe zwierząt (Litwińczuk i wsp. 2006). U bydła w obrębie polimorfizmu genu laktoferyny występują dwa warianty genetyczne A i B, kodujące trzy

genotypy AA, AB i BB (Seyfert i Kuhn 1994). Inni autorzy wykazują zależność pomiędzy liczbą komórek somatycznych w mleku a genotypem laktoferyny (Wojdak-Maksymiec i wsp. 2006). Najwyższą liczbę komórek somatycznych stwierdzono w mleku krów z genotypem BB, a najniższą u krów z genotypem AA (Zahao i wsp. 2008, Changhong i wsp. 2009). Jednak w dostępnej literaturze nie znaleziono wyników badań dotyczących zmian składu podstawowego oraz udziału frakcji białkowych mleka krów, w zależności od genetycznego polimorfizmu laktoferyny przy rosnącej liczbie komórek somatycznych w wydzielinie gruczołu mlekowego.

3.2.1 Skład oraz udział frakcji białkowych w siarze i mleku klaczy

W pierwszym etapie badań (3.1.3 a) analizowano właściwości fizykochemiczne siary i mleka klaczy oraz określono udział frakcji białkowych: albuminy surowiczej, β -kazeiny, γ -kazeiny, α -laktoalbuminy, immunoglobulin klasy G, w zależności od stadium laktacji. Uzyskane wyniki badań były cytowane przez Q. Ashton Acton, PhD w eBook pt. Milk Proteins – Advances in Research and Application- Editions 2012. Według Q. Ashton Acton, PhD (ScholarlyEditions Atlanta Georgia) eBook zawiera najnowsze doniesienia z 2012 roku w zakresie białek mleka, które mogą wpłynąć na stan wiedzy w tej dziedzinie.

W doświadczeniu materiał do badań stanowiły próbki siary i mleka pobrane od 12. klaczy rasy Arabskiej. Siarę pobrano 2. godzin po porodzie. Próbki mleka pobierano dwukrotnie: w 3 i 6 tygodniu laktacji. Analizę pobranych próbek przeprowadzono w trzech grupach, zależnie od stadium laktacji: I - siara, II - mleko pobrane w 3 tygodniu laktacji, III - mleko klaczy w 6 tygodniu laktacji. W uzyskanych próbach określono zawartość: tłuszczu, białka ogólnego, laktozy, suchej masy, suchej masy beztłuszczowej, mocznika, liczbę komórek somatycznych, ogólna liczbę drobnoustrojów, pH, °SH, gęstość, oporność, termostabilność, obliczono stosunek tłuszczu do białka. Oznaczono również udział frakcji białkowych: albuminy surowiczej, β -kazeiny, γ -kazeiny, α -laktoalbuminy, immunoglobulin klasy G.

W okresie laktacji cechy fizyko-chemiczne wydzieliny gruczołu mlekowego klaczy ulegają istotnym zmianom. Poziom składników podstawowych, takich jak białko, sucha masa i sucha masa beztłuszczowa, mleka klaczy ulegał obniżeniu ($P \leq 0,01$) w porównaniu do siary. Odwrotną tendencję zaobserwowano dla zawartości laktozy. Odnotowano wzrost ($P \leq 0,01$) poziomu mocznika w kolejnych tygodniach laktacji. Mleko

klaczy charakteryzowało się niższą ogólną liczbą drobnoustrojów oraz LKS, przy jednoczesnym wzroście oporności w porównaniu do siary. Stwierdzono zmiany udziału poszczególnych frakcji białek i ich wzajemne proporcje w siarze i mleku. Odnotowano wyższy ($P \leq 0,01$) poziom immunoglobulin klasy G w siarze klaczy (grupa I, 55,54% co stanowi 84 g/l), w porównaniu do mleka z grup II i III (odpowiednio 38,98% czyli 8,06 g/l i 41,14% czyli 8,43 g/l). Siara charakteryzowała się niższym ($P \leq 0,05$) poziomem γ -kazeiny (9,77 %) w odniesieniu do mleka klaczy pobranego w trzecim tygodniu laktacji (14,63 %). Zaobserwowano zwiększony udział procentowy serum albuminy, β – kazeiny, oraz α -laktoalbuminy w mleku w porównaniu do siary.

Analizując uzyskane rezultaty można stwierdzić, że mleko klaczy pozyskane w trzecim i szóstym tygodniu laktacji charakteryzuje się porównywalną wartością technologiczną. Siara klaczy odznacza się dobrą jakością dla źrebiąt, ze względu na zwiększony udział immunoglobulin klasy G, wysoki poziom białka, suchej masy, obniżony udział serum albumin i α -laktoalbuminy.

3.2.2 Parametry technologiczne siary i mleka krów w zależności od wybranych czynników.

Biorąc pod uwagę doniesienia naukowe dotyczące wartości odżywczej, pierwszej wydzieliny gruczołu mlekowego oraz możliwości wykorzystania jej w żywieniu nie tylko zwierząt, ale i ludzi². Podjęto badania określające udział wybranych makroelementów oraz selenu w siarze krów w zależności od ich wieku i liczby komórek somatycznych w siarze (3.1.3 b). W dostępnej literaturze nie znaleziono wyników podobnych badań, dlatego oznaczenie selenu w siarze może stanowić wartość poznawczą pracy.

Badania przeprowadzono w stadzie krów rasy polskiej holsztyńsko fryzyjskiej odmiany czarno-białej. Podstawą żywienia krów była mieszanka pełnoporcjowa TMR. Doświadczeniem objęto 62 krowy. Siarę do analiz pobrano w trakcie pierwszego pełnego doju po porodzie. Następnie poddano ją mrożeniu (-20 °C). Badane cechy siary analizowano w 2 grupach wiekowych: (I grupa – krowy po 1 wycieleniu; II grupa – krowy po 2 i 3 wycieleniu), w zależności od liczby komórek somatycznych (LKS) w siarze: do 0,4 mln/ml –

² according to - unit3.2.

1 grupa, od 0,401 do 1 mln/ml – 2 grupa, i powyżej 1 mln/ml – 3 grupa. W próbach siary określono liczbę komórek somatycznych oraz oznaczono zawartość sodu, potasu, fosforu, magnezu, wapnia, selenu .

W badanych próbkach odnotowano wysoki udział składników mineralnych. Siara zawierała: 3,01-3,47 g/l wapnia; 2,80-3,59 g/l fosforu; 0,28-0,43 sodu; g/l; 0,15-0,18 g/l magnezu; 2,20 – 2,79 g/l potasu oraz 27,20-35,64 µg/l selenu.

W siarze krów pierwiastek o LKS powyżej 1 mln/ml odnotowano około 22% obniżenie ($P \leq 0,01$) poziomu fosforu w porównaniu do prób siary o najniższej LKS. Podobną tendencję stwierdzono w siarze krów wieloródek. Najwyższy poziom magnezu oraz wapnia charakteryzował siarę krów wieloródek o LKS do 0,4 mln/ml (III), natomiast najniższy siarę krów pierwiastek o LKS powyżej 1 mln/ml. Zaobserwowano obniżenie zawartości magnezu i wapnia w siarze wraz ze wzrostem LKS niezależnie od wieku krów. W siarze krów wieloródek wraz ze wzrostem liczby komórek somatycznych stwierdzono obniżenie poziomu potasu. Najwyższy poziom sodu (0,43 g/l) zaobserwowano w siarze krów pierwiastek o LKS powyżej 1 mln/ml. W grupie pierwiastek stwierdzono wyższą zawartość sodu (o 0,13 g/l) wraz z rosnącą liczbą komórek somatycznych. Najniższy poziom selenu zmierzono w siarze krów pierwiastek o LKS powyżej 1 mln/ml (27,20 µg/l), a najwyższy w siarze o liczbie komórek somatycznych do 0,4 mln/ml, pozyskanej od krów wieloródek (35,64 µg/l). Wykazano obniżenie zawartości selenu w siarze krów wraz ze wzrostem poziomu komórek somatycznych w grupie krów pierwiastek o prawie 5%, natomiast wieloródek obniżenie to wynosiło ponad 15% (**3.1.3 b**).

Uzyskane wyniki badań, wykazały zmiany w poziomie wapnia, fosforu, magnezu, sodu i potasu oraz selenu w siarze w zależności od wieku oraz poziomu komórek somatycznych, które determinują wartość biologiczną siary. Stwierdzono ujemną zależność pomiędzy poziomem wapnia, magnezu i selenu a zawartością komórek somatycznych w wydzielinie gruczołu mlekowego. Biorąc pod uwagę poziom wybranych makroelementów i selenu można stwierdzić, że siarę o najwyższej ich zawartości można pozyskać od krów starszych o LKS nieprzekraczającej 0,4 mln/ml. Charakteryzuje się ona najwyższą wartością w tym zakresie i po przeprowadzeniu odpowiedniego procesu technologicznego np. liofilizacji, może stanowić formę mineralnego suplementu diety człowieka wspomagającego dodatkowo mechanizm antyoksydacyjny (**3.1.3 b**).

Analizując dostępne dane literaturowe² dotyczące właściwości laktoferyny oraz zakresu badań nad wpływem polimorfizmu tego białka na jakość mleka, podjęto badania nad określeniem wpływu polimorfizmu laktoferyny i liczby komórek somatycznych, na udział

poszczególnych frakcji białek mleka: albuminy surowiczej, α -kazeiny, β -kazeiny, κ -kazeiny, α -laktoalbuminy (3.1.3 c). W kolejnym doświadczeniu, materiał stanowiły próbki mleka pobrane od dwóch odmian krów rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej: czerwono-białej (RW – stado 1) i czarno-białej (HO - stado 2). Zwierzęta wybrano na zasadzie analogów uwzględniając wiek, wydajność i stadium laktacji. Krowy utrzymywano w systemie alkierzowym, w oborze wolnostanowiskowej. Próby mleka zostały pobrane podczas doju kontrolnego w ramach prowadzonej oceny wartości użytkowej. W mleku oznaczono skład podstawowy, określono stężenie laktoferyny oraz udział wybranych frakcji białkowych. Dodatkowo wyizolowano DNA w celu określenia polimorfizmu laktoferyny. Populację krów podzielono biorąc pod uwagę polimorfizm genu laktoferyny: genotyp AA Lf i genotyp AB Lf oraz liczbę komórek somatycznych (LKS) w mleku: 1 grupa – do 400 tys. LKS/ml i 2 grupa powyżej 400 tys. LKS/ml.

Wyodrębniono dwa genotypy genu laktoferyny (Lf): AA i AB, których frekwencja w populacji odmiany RW wynosiła odpowiednio, 32,61 % i 67,39 %, natomiast dla odmiany HO wynosił odpowiednio, 67,42 % i 32,58 %. Genotyp BB nie został wykryty. Zawartość białka w mleku krów o genotypie AA Lf i LKS do 400 tys./ml u obu odmian była polskiego holsztyńsko-fryzyjskiego była wyższa w porównaniu do mleka krów o genotypie AB Lf. W mleku krów o LKS powyżej 400 tys./ml zaobserwowano odwrotną tendencję. Mleko krów odmiany czerwono-białej o genotypie AB Lf charakteryzowało się wyższym poziomem tłuszczu w porównaniu do mleka krów o genotypie AA Lf, podobnej zależności nie stwierdzono dla odmiany czarno-białej. Stwierdzono wyższy poziom laktozy w mleku krów odmiany czarno-białej o genotypie AA Lf w stosunku do mleka krów o genotypie AB Lf tej samej odmiany.

Procentowy udział α -kazeiny, β -kazeiny oraz albuminy surowiczej, niezależnie od odmiany rasy i genotypu laktoferyny, kształtował się na wyższym poziomie w mleku krów o liczbie komórek somatycznych do 400 tys./ml. Zaobserwowano wyższy ($P \leq 0,01$) udział α -kazeiny oraz niższy ($P \leq 0,05$) poziom β -kazeiny w mleku krów odmiany czerwono-białej w stosunku do mleka krów odmiany czarno-białej.

Udział albuminy surowiczej był wyższy w mleku krów odmiany czarno-białej o genotypie AB laktoferyny, w którym stwierdzono również wyższy udział κ -kazeiny oraz zaobserwowano obniżenie udziału tej frakcji w próbach o zawartości komórek somatycznych powyżej 400 tys./ml. Stężenie laktoferyny było wyższe ($P \leq 0,05$) w mleku krów o LKS powyżej 400 tys./ml w stosunku do mleka krów o niższej liczbie komórek somatycznych niezależnie od rasy.

Podsumowując można stwierdzić, że na zmianę udziału frakcji białkowych w mleku krów w większym stopniu wpływa poziom komórek somatycznych niż polimorfizm LF oraz odmiana krów (3.1.3 c).

W kolejnym doświadczeniu podjęto analizę wpływu *Streptococcus uberis*, *Staphylococcus xylosus* i *Staphylococcus warneri* na zmiany składu i cech fizyko-chemicznych mleka krów (3.1.3 d, 3.1.3 e). W dostępnej literaturze nie napotkano badań charakteryzujących zmiany jakości mleka pod wpływem infekcji *Streptococcus uberis*, *Staphylococcus xylosus* i *Staphylococcus warneri*, w tak szerokim, kompleksowym zakresie analitycznym, co można uznać za mocną stronę pracy.

Badania przeprowadzono w stadzie krów rasy Slovak Pied (z udziałem genów rasy HF), w 2. i 3. laktacji po ukończeniu 4. miesiąca doju. Próby mleka pobrano z doju ćwiartkowego. W uzyskanych próbach wykonano badania mikrobiologiczne oraz określono: skład podstawowy mleka, ogólną liczbę drobnoustrojów, liczbę komórek somatycznych, właściwości fizyko-chemiczne. Wykonano również analizę udziału frakcji białkowych oraz profilu kwasów tłuszczowych (3.1.3 d, 3.1.3 e).

W badaniach własnych stwierdzono wpływ infekcji bakteryjnej *Streptococcus uberis* na wzrost ($P < 0,01$) liczby komórek somatycznych, udział tłuszczu oraz suchej masy. Próby mleka z ćwiartek zainfekowanych *S. uberis* charakteryzowały się wyższą ($P < 0,05$) ogólną liczbą drobnoustrojów i białka ogólnego, w porównaniu do prób mleka pobranych z gruczołu mlekowego niezainfekowanego (3.1.3 d). Odnotowano wpływ zakażenia bakteryjnego *Staphylococcus xylosus* i *Staphylococcus warner* na wzrost ($P < 0,05$) poziomu komórek somatycznych i obniżenie ($p < 0,01$) poziomu białka w mleku. Najniższy poziom białka, tłuszczu i suchej masy, jak i najniższy udział kazeiny uzyskano w próbach, w których stwierdzono obecność *S. warneri* (3.1.3 e).

Udział frakcji białkowych w mleku krów zdrowych i zainfekowanych *S. uberis*, *S. xylosus* i *S. warner* różnił się nieznacznie. Największe zaobserwowane zmiany dotyczyły udziału procentowego α -kazeiny. W zainfekowanych próbach mleka udział tej frakcji był wyższy niż w mleku krów zdrowych. Podobnie kształtowała się zawartość IgG₁, w grupach zainfekowanych poziom tej frakcji również wzrastał (3.1.3 d, 3.1.3 e).

W mleku krów zdrowych stwierdzono wyższy ($P < 0,05$) poziom κ -kazeiny w porównaniu do mleka krów zainfekowanych *S. uberis*, Odnotowano także niższy poziom β -kazeiny, α -laktoalbuminy oraz serum albuminy w mleku zainfekowanym (3.1.3 d).

Mleko krów zainfekowane *S. warner* charakteryzowało się niższym poziomem β -kazeiny, α -laktoalbuminy, albuminy surowiczej oraz wyższym udziałem κ -kazeiny w

porównaniu do mleka krów nie niezainfekowanych. Nieznacznie inny był udział tych frakcji w mleku zainfekowanym *S. xylosus*: poziom κ -kazeiny i albuminy surowiczej był niższy, podczas gdy zawartość α -laktoalbuminę była wyższa w porównaniu do mleka krów nie zainfekowanych (3.1.3 e). Infekcja *S. uberis* nie wpłynęła na zmianę kwasowości mleka. Obecność *Staphylococcus xylosus* łączyła się ze wzrostem pH, natomiast obecność *Staphylococcus warneri* skutkowała obniżeniem tej wartości ($p < 0,01$). Nie zaobserwowano różnic pomiędzy zainfekowanym mlekiem a mlekiem krów zdrowych dla wartości innych analizowanych cech: gęstości oraz oporności (3.1.3 d, 3.1.3 e).

Stwierdzono istotne ($P < 0,05$) obniżenie udziału kwasu C13:0 oraz wzrost poziomu kwasów C18:0, C18:1n7t i CLA w mleku zainfekowanym *S. uberis*, w porównaniu do prób mleka krów zdrowych. Zaobserwowano wyższy udział kwasów C14:1, C15:0, C16:0 w mleku krów, w którym stwierdzono obecność *S. uberis* (3.1.3 d).

Stwierdzono obniżony ($P < 0,05$) udział kwasów C8:0, C10:0, sumy nasyconych kwasów tłuszczowych oraz zmniejszony ($P < 0,01$) udział kwasów C14:0 i C20:1 w mleku krów zakażonych *S. xylosus* i *S. warner* (3.1.3 e). W mleku krów zainfekowanych *S. uberis* zaobserwowano obniżenie poziomu kwasów C18:2n6t i C18:3n3, natomiast w mleku krów zainfekowanym *S. xylosus* i *S. warner* odnotowano odwrotną zależność. Udział C20:4n6 w mleku krów zdrowych kształtował się na poziomie ok. 0,60g/100g tłuszczu, natomiast w mleku krów zainfekowanych *S. uberis* i *S. xylosus* zawartość tego kwasu była niższa aż o 0,48 g/100g tłuszczu, z kolei przy infekcji *S. warneri* obniżenie jego poziomu wynosiło 0,18 g/100g tłuszczu (3.1.3 d, 3.1.3 e). Mleko krów zdrowych, charakteryzowało się wyższym ($P < 0,05$) udziałem kwasu EPA w porównaniu do mleka krów zakażonych *S. xylosus* i *S. warner* (3.1.3 e).

Streptococcus uberis, *Staphylococcus xylosus* i *Staphylococcus warner* powodujące zapalenie gruczołu mlekowego mogą powodować straty finansowe nie tylko w stadach produkcyjnych, ale przede wszystkim mogą wpływać na obniżenie jakości mleka (3.1.3 d, 3.1.3 e). Pomimo stwierdzonego pozytywnego wpływu *Streptococcus uberis* na zwiększenie zawartości białka, tłuszczu oraz suchej masy obserwowano jednocześnie zwiększoną liczbę drobnoustrojów, komórek somatycznych oraz obniżony poziom κ -kazeiny, co istotnie determinuje niższą przydatność surowca mlecznego w produkcji serowarskiej (3.1.3 d). Podobne niekorzystne zmiany wykazano przy infekcji *Staphylococcus xylosus* i *Staphylococcus warneri*, obserwowano wzrost liczby drobnoustrojów i LKS oraz obniżenie zawartości białka, tłuszczu oraz suchej masy. Dodatkowo *Staphylococcus xylosus* wpłynął negatywnie na obniżenie udziału κ -kazeiny (3.1.3 e)

3.2.3. Wnioski końcowe

Podsumowując przedstawiony cykl badań dotyczący oceny właściwości fizyko-chemicznych siary i mleka wybranych gatunków zwierząt gospodarskich można stwierdzić, że :

- w porównaniu do mleka w sianie kłaczy wykazano wyższy poziom białko, suchej masy i suchej masy beztłuszczowej, immunoglobulin klasy G oraz niższy serum albuminy i β – kazeiny (3.1.3 a),
- mleko kłaczy pozyskane w trzecim i szóstym tygodniu laktacji charakteryzuje się porównywalną wartością analizowanych cech technologicznych (3.1.3 a),
- poziom wapnia, magnezu, potasu i seleniu obniża się przy jednoczesnym wzroście zawartości sodu, wraz z zwiększoną liczbą komórek somatycznych w sianie krów (3.1.3 b),
- siara krów wieloródek charakteryzuje się lepszym profilem makroelementów i seleniu w porównaniu do siary krów pierwiastek (3.1.3 b),
- na poziom tłuszczu i udział frakcji białkowych w mleku krów w większym stopniu wpływa poziom komórek somatycznych niż polimorfizm Lf (3.1.3 c),
- infekcja *Streptococcus uberis* skutkuje zwiększeniem zawartości białka, tłuszczu, suchej masy w mleku krów, natomiast patogeny *Staphylococcus xylosus* i *Staphylococcus warneri* wpływają na obniżenie wartości tych parametrów (3.1.3 d, 3.1.3 e),
- obecność *Streptococcus uberis*, *Staphylococcus xylosus* i *Staphylococcus warneri* łączy się ze wzrostem liczby drobnoustrojów oraz LKS w mleku (3.1.3 d, 3.1.3 e),
- mleko zainfekowane *Streptococcus uberis* i *Staphylococcus xylosus* charakteryzuje się obniżonym poziomem κ -kazeiny, co istotnie wpływa na zmniejszoną przydatność technologiczną (3.1.3 d, 3.1.3 e).

Uzyskane rezultaty wskazują na istotne zmiany w wydzielinie gruczołu mlekowego przy wzroście liczby komórek somatycznych oraz przy infekcji patogenami: *Streptococcus uberis*, *Staphylococcus xylosus* i *Staphylococcus warneri*. Jednak bardziej negatywne zmiany fizyko-chemiczne mleka wywołuje *Staphylococcus xylosus* niż pozostałe patogeny.

Stwierdzono, że stan zdrowia gruczołu mlekowego krów, określany liczbą komórek somatycznych w większym stopniu determinuje udział frakcji białkowych w mleku niż polimorfizm laktoferyny.

Ze względu na wartość technologiczną mleka oraz dobrą jakość siary dla nowo narodzonych zwierząt, ważna jest analiza udziału frakcji białkowych. Siara krów o niskiej liczbie komórek somatycznych charakteryzuje się optymalnym profilem makroelementów oraz selenu i może być wykorzystana w żywieniu nie tylko cieląt, ale także człowieka. W dostępnej literaturze brak jest informacji dotyczących wpływu infekcji *Streptococcus uberis*, *Staphylococcus xylosus* i *Staphylococcus warneri* oraz polimorfizmu laktoferyny na zmiany udziału białek w wydzielinie gruczołu mlekowego. Również przedstawiane wyniki badań prowadzonych w zakresie zmian poziomu frakcji białkowych siary i mleka kłaczy są ograniczone. Z tych powodów przedstawione wyniki w cyklu publikacji jedno tematycznych mogą być przydatne i wykorzystane przez hodowców i w przetwórstwie. Wnoszą istotne, nowe wartości poznawcze i aplikacyjne w zakresie produkcji siary i mleka o wysokiej jakości technologicznej.

4. Towarzystające osiągnięcie naukowo-badawcze po uzyskaniu tytułu doktora nauk rolniczych pod tytułem: „Fermentacja *in vitro* w przewodzie pokarmowym wybranych gatunków zwierząt”

W pracy naukowej zajmuję się zarówno oceną jakości technologicznej siary oraz mleka, jak również procesami fermentacji, zachodzącymi w przewodzie pokarmowym zwierząt gospodarskich oraz dziko żyjących.

Przedstawiam wykaz prac, które uważam za towarzyszące osiągnięcie naukowo-badawcze:

4 a) Pecka-Kielb E., Zawadzki W., Zachwieja A., Michel O., Mazur M., Mišta D. 2015: In vitro study of the effect of corn dried distillers grains with solubles on rumen fermentation in sheep. *Polish Journal of Veterinary Sciences* 18 (4), 751-758 (II-A11)²

4 b) Mišta D., Pecka E., Zachwieja A., Zawadzki W., Bodarski R., Paczyńska K., Tumanowicz J., Kupczyński R., Adamski M. 2014: In Vitro Ruminant Fluid Fermentation as Influenced by Corn-Derived Dried Distillers' Grains with Solubles, *Folia Biologica Krakow*, Volume 62, Number 4, pp. 345-351 (II-A10)²

4 c) Pecka-Kielb E., Bujok J., Mišta D., Króliczewska B., Górecka J., Zawadzki W. 2016: *In Vitro* Study of Caecal and Colon Microbial Fermentation Patterns in Wild Boar (*Sus scrofa scrofa*). *Folia Biologica Krakow*, Number 1, (64): 31-36 (II-A14)²

4 d) Mišta D., Króliczewska B., Marounek M., **Pecka E.**, Zawadzki W., Nicpoń J. 2015: In Vitro Study and Comparison of Caecal Methanogenesis and Fermentation Pattern in the Brown Hare (*Lepus europaeus*) and Domestic Rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *PLoS ONE*, January 28, 1-12 (II-A12)²

4 e) Janeczek M., Chojnacka K., Yasar Toker N., **Pecka E.**, Czerski A., Witkowska Z., Chrószcz A., Zawadzki W., Korczyński M. 2012: The Effect of Cu^{2+} , Fe^{2+} and Cr^{3+} in Mineral Additives Enriched with Biosorption Process Form on Chosen Parameters of *in vitro* Caecal Fermentation in Laying Hens (Lohmann Brown). *Journal of animal and veterinary advances*, 11 (21): 3991-3998 (II-A5)²

4 f) Janeczek M., Chojnacka K., Yasar Toker N., **Pecka E.**, Czerski A., Witkowska Z., Chrószcz A., Zawadzki W., Opaliński S., 2012: The Effect of Dietary Zinc (II) Chelate and Zinc (II) Enriched Soybean Meal on Selected Parameters of *in vitro* Caecal Fermentation of Laying Hens. *Journal of animal and veterinary advances*, 11 (21): 4051-4057 (II- A4)²

4.1 Zmiany przebiegu procesów fizjologicznych w żwaczu krów i owiec w zależności od ilości zastosowanego suszonego wywaru z kukurydzy.

Jakość technologiczna siary i mleka determinowana jest również przez produkty powstałe w procesach fermentacji treści pokarmowej przez mikroorganizmy w żwaczu (tabela 1). Najważniejszymi produktami fermentacji są: lotne kwasy tłuszczowe (LKT), amoniak i metan. Podstawowymi LKT są kwas octowy, kwas propionowy oraz kwas masłowy. LKT pokrywają ok. 80 % potrzeb energetycznych zwierząt (Heinhrisch i Varga 1996). Wraz ze wzrostem produkcji LKT, wydajność mleczna krów rośnie (Piva i wsp. 1993). Poziom LKT skorelowany jest z poziomem długołańcuchowych rozgałęzionych kwasów tłuszczowych w mleku. Jak wykazano, można zastosować matematyczne przeliczniki określające poziom LKT w żwaczu, znając profil rozgałęzionych kwasów tłuszczowych w mleku (Vlaeminck i wsp. 2006). Kwas octowy powstający w żwaczu w minimalnym stopniu wykorzystywany jest w wątrobie w celu wytworzenia ATP. Stanowi główne źródło acetylo-CoA, wpływa na syntezę lipidów w mleku (Linn 1988). Kwas propionowy powstający w żwaczu, transportowany jest do krwiobiegu, a następnie do wątroby, gdzie stanowi prekursor glukozy. Podstawową

² numeracja wg załącznika nr 4

jednostką budulcową do produkcji laktozy w siarze i mleku jest glukoza. Kwas propionowy wpływa również na ograniczenie rezerw tłuszczowych, zwiększa koncentrację trójglicerydów i insuliny, a także zmniejsza zagrożenie wystąpienia stłuszczenia wątroby (Heinrich i Varga 1996). Kwas masłowy to prekursor energii i ciał ketonowych (Linn 1988). Izo-kwasy powstają w wyniku katabolizmu aminokwasów przez mikroflorę żwacza, a ich obecność świadczy o aktywności drobnoustrojów proteolitycznych (Mac Farlane i Gibson 1995, Benedeti i wsp. 2015). Rozkład białka w żwaczu oraz strawność jelitowa wpływa na jego zawartość w siarze i mleku.

Amoniak produkowany w żwaczu, ze względu na toksyczność dla przeżuwacza, transportowany jest do wątroby i tam przekształcany w mocznik, którego część przedostaje się do mleka (Abdoun i wsp. 2006). Poziom mocznika w mleku determinuje jego jakość, a co za tym idzie przydatność technologiczną (Henao-Velásquez i wsp. 2014).

Proces zwiększonej metanogenezy w żwaczu jest zjawiskiem niekorzystnym. Wysoka ilość emitowanego metanu powoduje straty energii, co skutkuje obniżeniem produkcji mlecznej (Johnson i Johnson 1995, Stewart i wsp. 1997). Zmniejszone proporcje udziału kwasu octowego do propionowego wpływają na obniżenie produkcji metanu (Stewart i wsp. 1997).

Obecnie w rolnictwie panuje trend na wprowadzanie dodatków paszowych oraz pasz obniżających emisję metanu (Yan i wsp. 2006, McGinn i wsp. 2009). Suszony wywar z kukurydzy (DDGS) może być również rozpatrywany jako pasza wpływająca na profil fermentacji w żwaczu, bowiem stwierdzono jego wykorzystanie w dawkach pokarmowych skutkowało obniżeniem produkcji metanu (Behlke i wsp. 2008, Zhang i wsp. 2010, Segers i wsp. 2013). DDGS to główny uboczny produkt przemysłu biopaliwowego. Obecnie DDGS jest jednym z najbardziej ekonomicznych i szeroko rozpowszechnionych dodatków paszowych w Stanach Zjednoczonych. Charakteryzuje się wysoką wartością energetyczną (od 3674 do 4336 kcal/kg suchej masy), zawartością białka (od 27 do 33% s.m.) i lizyny (od 0,60 do 1,1% s.m.), stosunkowo wysoką zawartością fosforu (0,57 do 0,85% s.m.) i wysokim stopniem strawności (50 do 68%) (Shurson 2011). Wyniki dotychczasowych badań stanowią przesłanki do podjęcia kolejnych prób weryfikacji wpływu DDGS-u na profil fermentacji w żwaczu.

Podsumowując można stwierdzić, że profil fermentacji w żwaczu jest wykładnikiem jakości siary i mleka oraz wydajności mlecznej przeżuwaczy. Dlatego w badaniach własnych oceniono jakość wydzieliny gruczołu mlekowego oraz stymulowano procesy fermentacyjne w żwaczu w celu uzyskania pożądanego profilu produktów fermentacji. Skupiono się na

fermentacji dokonano analizy wytworzonych gazów przy użyciu chromatografu gazowego (Agilent Technologies 7890A GC System) z detektorem TCD oraz FID. Analizowano również ogólne stężenie lotnych kwasów tłuszczowych (LKT) oraz udział procentowy poszczególnych kwasów: octowego, propionowego, izomasłowego, masłowego, izowalerianowego i walerianowego, współczynniki: NGR, FE, CY (**4 a**, **4 b**). Opracowanie metodyki analiz chromatograficznych wykonywanych w ramach przedstawionych doświadczeń, z użyciem chromatografu gazowego Agilent Technologies 7890A GC System oraz dostosowanie do warunków w naszym Zakładzie, zostało wykonane przy udziale własnym.

Wykazano wpływ zastosowania w substracie DDGS-u na obniżenie ($P < 0,001$) ilości wytwarzanego gazu w procesach fermentacyjnych krów (**4 a**). U owiec zaobserwowano odwrotną zależność ($P < 0,01$) (**4 b**). DDGS jako substrat u krów spowodował około 28% redukcji ($P < 0,05$) emisji metanu podczas fermentacji *in vitro* (**4 a**). U owiec nie stwierdzono istotnego wpływu zastosowania DDGS-u na ilość produkowanego metanu w warunkach fermentacji *in vitro*. Zaobserwowano jednak niewielkie ograniczenie emisji (o 3% w porównaniu do grupy C) w grupie zawierającej w swoim składzie 30% DDGS (**4 b**). Uzyskane obniżenie produkcji metanu w procesie fermentacji w żywcu należy uznać za korzystne zjawisko, bowiem emisja tego gazu łączy się ze stratami energii i może skutkować obniżeniem wielkości produkcji mlecznej przeżuwaczy.

U krów i owiec odnotowano wpływ DDGS-u na nieznaczne obniżenie produkcji LKT, jednak ich ilość mieściła się w normach fizjologicznych (**4 a**, **4 b**). Stwierdzono nieznaczny spadek poziomu kwasu octowego przy jednoczesnym wzroście poziomu kwasu propionowego w treści żywca u krów, dla których stosowano jako substrat dodatek DDGS (**4 a**). Podobną zależność zaobserwowano u owiec. Zastosowany substrat wpłynął na wzrost ($P < 0,01$) poziomu kwasu propionowego. Najwyższą jego zawartość odnotowano w próbach D3 i D4, w których udział DDGS był najwyższy. Nieznacznemu obniżeniu uległ poziom kwasu octowego (**4 b**). Uzyskane rezultaty świadczą o korzystnym wpływie DDGS na profil udział najważniejszych lotnych kwasów w treści żywca. Zastosowany substrat zarówno w przypadku prób treści żywca krów, jak i owiec, wpłynął na poziom kwasów: izomasłowego, izowalerianowego. Wraz ze zwiększoną dawką DDGS w substracie obniżał się poziom tych kwasów. Konsekwencją obniżenia produkcji izo-kwasów jest obniżony rozkład białka w żywcu, co u tej grupy zwierząt jest pożądane (**4 a**, **4 b**). U krów inne wskaźniki obliczone na podstawie LKT (NGR, FE i CY) nie wykazały znaczących zmian w wyniku zastosowanego

DDGS. U owiec jedynie na wartość współczynnika sprawności fermentacji (FE) znaczący wpływ miał dodany substrat, powodował on wzrost poziomu współczynnika.

Do głównych osiągnięć przedstawionych badań można zaliczyć:

- zmniejszenie produkcji kwasu octowego,
- wzrost udziału kwasu propionowego i masłowego,
- obniżenie emisji metanu, amoniaku.

Biorąc pod uwagę uzyskane rezultaty można stwierdzić, że częściowe zastąpienie paszy treściwej DDGS-em, nie ma negatywnego wpływu na profil fermentacji w żwaczku krów i owiec w warunkach *in vitro*, a wykazane zmiany profilu fermentacji mogą skutkować wyższą wydajnością mleczną oraz pożądanym składem siary i mleka.

4.2 Analiza profilu fermentacji *in vitro* w treści przewodu pokarmowego wybranych gatunków zwierząt dziko żyjących.

Mikrobiologiczna fermentacja w przewodzie pokarmowym zwierząt jest anatomiczną adaptacją charakterystyczną dla danego gatunku zwierząt i zależy przede wszystkim od wielkości zwierzęcia oraz jego naturalnej diety (Pagan 2011). Poznanie procesów fermentacji mikrobiologicznej zachodzącej w przewodzie pokarmowym zwierząt jest od lat przedmiotem wielu badań (Marounek i wsp. 2002, Fortun-Lamothe i Boullier, 2004, Józefiak 2004). Najważniejszą komorą fermentacyjną u zwierząt monogastrycznych, do których zaliczamy również dziki, drób, króliki i zające to jelito ślepe. Stężenie końcowych produktów fermentacji bakteryjnej w jelicie grubym, do których zaliczamy: lotne kwasy tłuszczowe (LKT) oraz zawartość gazów, a szczególnie metanu, odzwierciedla aktywność jelitowej mikroflory, która warunkuje prawidłowy przebieg procesów zachodzących w tym odcinku przewodu pokarmowego (Fortun-Lamothe i Boullier, 2004).

Bez obecności właściwie rozwiniętej flory jelitowej procesy trawienia, przemiany materii oraz aktywność układu odpornościowego nie mogłyby przebiegać właściwie. Enzymy trawienne produkowane przez mikroorganizmy pozwalają na usprawnienie trawienia składników pokarmowych, które bez ich udziału nie zostałyby wykorzystane (Barowicz, 2011).

Celem pracy była analiza:

- wybranych parametrów fermentacji mikrobiologicznej zachodzącej w jelicie ślepym i okrężnicy dzików żyjących w stanie wolnym (4 c),

- aktywność mikrobiologicznej w jelicie ślepym zająca szaraka (*Lepus europaeus*) i porównanie do aktywności bakterii u królika (*Oryctolagus cuniculus*) (4 d).

Materiał do badań stanowiła treść jelita ślepego i okrężnicy pobrana od 9. dzików (4 c) oraz treść jelita ślepego pobrana od 14. królików i 14. zające (4 d).

Próby treści przydzielono do grup: C (kontrolna), w której treść jelit inkubowano bez dodatków oraz grupę S (substrat), gdzie do inkubowanej treści dodano otręby pszenne. U dzików próby poddano 12 i 24-godzinnej, a u królików i zające 12-godzinnej, beztlenowej fermentacji *in vitro* w temperaturze 39°C. Po zakończeniu fermentacji dokonano analizy wytworzonych gazów przy użyciu chromatografu gazowego (Agilent Technologies 7890A GC System) z detektorem TCD oraz FID. W świeżej treści oraz inkubowanej u dzików, zające i królików analizowano stężenie ogólne lotnych kwasów tłuszczowych (LKT) oraz udział procentowy poszczególnych kwasów: octowego, propionowego, izomasłowego, masłowego, izowalerianowego, walerianowego. Obliczono wzajemny stosunek kwasu octowego do propionowego i propionowego do masłowego. Oznaczono również poziom amoniaku (4 c, 4 d). Dodatkowo u dzików oznaczono poziom kwasu heksanowego i heptanowego. Ponadto obliczono wskaźnik utylizacji LKT wyrażony poprzez stosunek kwasów nieglikogennych do glikogennych (NGR) (4 c).

U dzików wartość pH treści świeżej jelita ślepego i okrężnicy kształtowała się na zbliżonym poziomie i wynosiła (odpowiednio): 5,73±0,41, 5,74±0,38. Całkowite stężenie LKT w próbkach jelita ślepego i okrężnicy wzrosło po 12 i 24 godzinach fermentacji w odniesieniu do świeżej treści ($P < 0,001$). Zaobserwowano również wpływ dodatku otrąb pszennych na wzrost produkcji LKT (4 c). Podobną zależność zauważono u królików i zające, substrat wpłynął na zwiększenie produkcji LKT w treści jelita ślepego zarówno u królików, jak i zające. Odnotowano niższą ($P < 0,05$) produkcję LKT u zające w odniesieniu do królików (4 d).

Profil kwasów w jelicie ślepym i okrężnicy dzika charakteryzuje się najwyższym udziałem kwasu octowego, niższym propionowego i najniższym masłowego, w ogólnej puli tych trzech najważniejszych LKT (4 c). U zające w jelicie ślepym oznaczono najwyższy udział kwasu octowego, następnie masłowego i propionowego. U zające stwierdzono wyższą ($P < 0,01$) produkcję kwasu propionowego i izo-masłowego w porównaniu do królików (4 d).

U dzików zastosowany substrat wpłynął na obniżenie stężenie kwasu octowego, kosztem kwasu propionowego i masłowego, zarówno w jelicie ślepym jak i okrężnicy. W jelicie ślepym oraz okrężnicy dzików produkcja metanu wzrosła zarówno w czasie trwania

fermentacji, jak i pod wpływem dodanego substratu. W jelicie ślepych produkcja metanu kształtowała się na poziomie od 2,11 do 3,91 mmol/kg, a w okrężnicy od 1,78 do 4,67 mmol/kg treści jelit. Produkcja gazu była wyższa w okrężnicy (od 6 do 43%) w porównaniu do jego ilości w jelicie ślepych (4 c).

Uzyskane wyniki wskazują, że ilość wytwarzanego gazu w treści jelita ślepego była wyższa ($P < 0,05$) u królików w porównaniu z zajęciami. Stwierdzono w jelicie ślepych zajęciami znacznie niższą ($P < 0,001$) produkcję metanu niż u królika. U zajęciami produkcja metanu podczas inkubacji kształtowała się na poziomie ok. 2 mmol/kg, podczas inkubacji u królika produkcja tego gazu wynosiła ok. 13,5 mmol/kg treści jelita ślepego (4 d).

U dzików w świeżej treści jelita ślepego poziom amoniaku był wyższy niż w próbkach po 12. i 24.h fermentacji i kształtował się na poziomie 1,47 mmol/kg w jelicie ślepych oraz 0,94 mmol/kg w okrężnicy (4 c). W próbkach inkubowanych bez otrąb pszenicznych, zaobserwowano niewielką tendencję do wzrostu produkcji amoniaku u zajęciami (10,75 mmol / kg), w odniesieniu do królików (6,58 mmol / kg) (4 d).

Uzyskane rezultaty wskazują, że u dzików, zajęciami i królików w jelicie grubym procesy mikrobiologicznej fermentacji prowadzi do produkcji w największym stężeniu kwasu octowego. U dzików i królików dodanie otrąb pszenicznych jako substratu w procesie fermentacji ogranicza udział kwasu octowego, a zwiększa ilość kwasu masłowego i propionowego. Mikroflore jelita ślepego u zajęciami szaraka produkuje mniej metanu, lotnych kwasów tłuszczowych oraz więcej kwasu propionowego i izomasłowego w porównaniu do królika. Populacje mikroorganizmów zasiedlające jelito grube dzików, królików i zajęciami wykazują aktywność metanogenną. Ponadto, obecność amoniaku i izo-kwasów w jelicie grubym może wskazywać na proteolityczną aktywność mikroflory tej części przewodu pokarmowego.

4.3 Wpływ Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Cr^{2+} wprowadzonych do soi metodą biosorpcji w na wybrane parametry fermentacji w jelicie ślepych kur niosek w warunkach *in vitro*.

Mineralne dodatki paszowe stosowane dla drobiu występują w postaci soli nieorganicznych, które charakteryzują się niską biodostępnością dla zwierząt. Formy organiczne mikroelementów odznaczają się dziesięciokrotnie wyższą dostępnością dla organizmu, ale są zdecydowanie droższe. Obecnie poszukuje się tanich rozwiązań stosowanych w procesach technologicznych, w celu uzyskania lepiej przyswajalnych przez

zwierzęta produktów organicznych zawierających mikroelementy. Do takich metod można zaliczyć wprowadzanie związków mineralnych do paszy przy użyciu procesu biosorbcji (Chojnacka 2007).

Wprowadzony dodatek paszowy w żywieniu kur nie powinien wpływać negatywnie na florę bakteryjną przewodu pokarmowego, a w konsekwencji na procesy fermentacyjne w jelicie ślepy, których produktami są m.in. lotne kwasy tłuszczowe (LKT) i metan (Macfarlane i Gibson 1995). Wytwarzane w przewodzie pokarmowym lotne kwasy tłuszczowe (LKT) są ważnym źródłem energii dla wielu zwierząt, a ponadto mogą być substratami lub aktywatorami wielu przemian metabolicznych. Lotne kwasy tłuszczowe są produktami beztlenowej fermentacji bakteryjnej, głównie włókna pokarmowego i skrobi odpornej. Dostępność energii (MJ/kg) z włókna określona na podstawie wytwarzania LKT u kur wynosi około 9% (Kirchgeßner i wsp.1999, Józefiak 2004). Najważniejszym zadaniem gospodarki kwasowo-zasadowej u drobiu jest utrzymanie wartości pH na stałym poziomie, w przeciwnym razie dochodzi do obniżenia wskaźników produkcyjnych. Lotne kwasy tłuszczowe wpływając na pH treści jelit, pełnią rolę bioregulatorów (Mroz i wsp. 2006).

Celem podjętych badań była analiza wpływu stosowanych mikroelementów wprowadzonych do śrutki sojowej w procesie biosorbcji, na porfil fermentacji w jelicie ślepy kur. Ocena procesów fermentacyjnych przy użyciu metod *in vitro* pozwala na określenie możliwości zastosowania uzyskanych biosorbentów jako alternatywnego źródła mikroelementów.

Materiał do badań stanowiła treść jelita ślepego pobrana od kur z linii Hy-Line Brown, w wieku 22 tygodni. Pobrane próby podzielono na grupy: C- grupa kontrolna zastosowano mieszankę pełnoporcjową (4 e, 4 f), grupa Fe - pasza z wprowadzonym żelazem w formie organicznej, grupa Cr - pasza z dodatkiem chromu, grupa Cu - pasza z dodatkiem miedzi (4 e), I- pasza z wprowadzonym cynkiem metodą biosorbcji, grupa II- pasza z cynkiem w formie chelatu (4 f). Fermentację przeprowadzono w warunkach beztlenowych przez 4 i 6-godzin w temperaturze 39°C. Następnie wykonano analizę emisji metanu, zmierzono pH treści, określono ogólne stężenie LKT oraz udział procentowy kwasu octowego, propionowego, izomasłowego, masłowego, izowalerianowego i walerianowego (4 e, 4 f).

W czwartej godzinie fermentacji w treści jelita kur zaobserwowano wyższą ($P \leq 0,01$) wartość pH w próbach z dodatkiem żelaza oraz chromu, w porównaniu do prób z dodatkiem miedzi oraz grupy kontrolnej. W szóstej godzinie fermentacji wartość pH treści jelitowej po dodaniu chromu (Cr 6h) kształtowała się na wyższym ($P \leq 0,01$) poziomie w porównaniu do

pozostałych grup (C 6h, Fe 6h, Cu 6h) (4 e). Stosowanie preparatu z cynkiem, uzyskanego metodą biosorbcji (I) wpłynęło na wzrost wartości pH treści jelita ślepego, w porównaniu do grupy kontrolnej (C) oraz grupy gdzie stosowano cynk w postaci chelatu (II), niezależnie od czasu fermentacji (4 f).

W treści jelita ślepego kur najniższy (134,97 mmol/kg) poziom lotnych kwasów tłuszczowych stwierdzono w 4. godzinie fermentacji, w grupie z dodatkiem żelaza (Fe 4h). Natomiast najwyższy (223,95 mmol/kg) odnotowano w 6. godzinie fermentacji przy zastosowanym dodatku chromu (Cr 6h). Przy zastosowaniu dodatku mineralnego w postaci chromu zaobserwowano w treści jelita ślepego kur wzrost ilości LKT, niezależnie od godziny fermentacji (4 e).

Stosowanie cynku w postaci chelatu organicznego (II) w fermentacji treści jelita ślepego kur spowodowało zwiększenie produkcji LKT w 4. godzinie o 14,43 mmol/kg treści, a w 6. godzinie o 9,98 mmol/kg, w porównaniu do grupy kontrolnej. Natomiast zastosowanie cynku w preparacie po biosorbcji (I) wpłynęło na obniżenie poziomu lotnych kwasów tłuszczowych (4 f).

W 6. godzinie fermentacji treści jelita ślepego kur stosowane dodatki mikroelementów spowodowały obniżenie procentowego udziału kwasu octowego (4 e, 4 f). W analizowanej treści jelita ślepego dodatek żelaza, chromu i cynku wprowadzonego metodą biosorbcji, wpłynął na wzrost produkcji kwasu propionowego, natomiast dodatek miedzi spowodował obniżenie udziału tego kwasu, w porównaniu do grupy kontrolnej, niezależnie od czasu fermentacji (4 e).

W grupie kontrolnej i w grupie Cu zaobserwowano wzrost o 47,65% i 13,38% produkcji metanu pomiędzy 4. a 6. godziną fermentacji. W pozostałych grupach doświadczalnych odnotowano odwrotną tendencję. W 6. godzinie fermentacji w grupie kontrolnej (C 6h) stwierdzono wyższą ($P \leq 0,05$) produkcję metanu, w porównaniu do produkcji treści jelita ślepego przy zastosowaniu chromu (II 6h) i miedzi (III 6h). W próbach pobranych w 4. godzinie fermentacji zawartość metanu kształtowała się na wyższym poziomie przy zastosowaniu żelaza (Fe 4h) w porównaniu do pozostałych grup (4 e). W grupie kontrolnej (C) zaobserwowano zwiększoną ($P \leq 0,05$) o 29,42 mmol/kg l produkcję metanu pomiędzy 4. a 6. godziną fermentacji (4 f).

Przeprowadzone badania wykazały, że zastosowana soja, w której mikroelementy zostały wprowadzone metodą biosorbcji nie wpłynęła negatywnie na produkty fermentacji jelita ślepego u kur. Biorąc pod uwagę poziom wybranych produktów fermentacji zaobserwowano najkorzystniejszy wpływ stosowanej paszy z dodatkiem miedzi.

Wprowadzenie na drodze biosorbcji mikroelementów (miedź, cynk oraz chrom) skutkowało ograniczeniem produkcji metanu. Ze względu na dobrą akumulację żelaza, miedzi i cynku podczas procesów technologicznych w paszach, otrzymane związki (biosorbenty) mogą być stosowane dla zwierząt jako alternatywne źródło mikroelementów, w miejsce dostępnych na rynku form nieorganicznych.

4.4 Wnioski końcowe

Uzyskane wyniki zamieszczone w przedstawionych jako towarzyszące osiągnięcie naukowo-badawcze pracach wskazują, że:

- uzyskany profil fermentacji żwaczu po częściowym zastąpieniu paszy treściwej DDGS-em może skutkować wyższą wydajnością mleczną oraz pożądanym składem siary i mleka,
- mikroflora jelita ślepego zająca szaraka produkuje mniej metanu, lotnych kwasów tłuszczowych oraz więcej kwasu propionowego i izomasłowego w porównaniu do królika,
- populacje mikroorganizmów zasiedlające jelito grube dzików, królików i zajęcy wykazują aktywność metanogenną,
- obecność amoniaku i izo-kwasów w jelicie grubym dziko żyjących zwierząt wskazuje na aktywność proteolityczną mikroflory przewodu pokarmowego,
- soja wzbogacona w procesie biosorbcji pierwiastkami takimi jak miedź, cynk i chrom i zastosowana w fermentacji *in vitro* treści jelita ślepego kur, powoduje ograniczenie emisji metanu.

Wrocław, 8 grudzień 2016 roku

dr inż. Ewa Pecka-Kiełb

Ewa Pecka-Kiełb