

WPŁYW ŻYWIENIA ŚLIMAKÓW Z RODZAJU *HELIX* CZYSTĄ CELULOZĄ NA WYNIKI ODCHOWU I SKŁAD TREŚCI MIKROBIOCENOTYCZNEJ PRZEWODU POKARMOWEGO*

Andrzej Łysak^{1,2}, Karol Węglarzy³, Maciej Ligaszewski²,
Zofia Mach-Paluszkiwicz², Wiesław Barabasz⁴

¹Krakowska Szkoła Wyższa im. Frycza Modrzewskiego, Wydział Zarządzania i Marketingu,
ul. Herlinga-Grudzińskiego 1, 30-705 Kraków

²Instytut Zootechniki, Dział Genetyki i Hodowli Zwierząt, 32-083 Balice k. Krakowa

³Zakład Doświadczalny Instytutu Zootechniki, Grodziec Śląski Sp. z o.o., 43-083 Świątoszówka

⁴Akademia Rolnicza, Katedra Mikrobiologii, al. Mickiewicza 24/28, 30-059 Kraków

*W pracy przedstawiono wyniki badań nad wpływem żywienia ślimaków z rodzaju *Helix* czystą celulozą. Materiał doświadczalny stanowiły dwie grupy wiekowe ślimaków: juvenilne i dojrzałe somatycznie. Kontrolę stanowiły równe wiekowo osobniki żywione pełnoporcjową mieszanką standardową. Stwierdzono, że mikroflora przewodu pokarmowego młodych ślimaków nie posiada zdolności modyfikacji składu gatunkowego biocenozy bakteryjnej do potrzeb trawienia celulozy. Zdolność ta pojawia się natomiast u ślimaków starszych, o czym świadczą przyrosty masy ciała z grupy doświadczalnej, porównywalne z kontrolną oraz wysoki stopień aktywności celulolitycznej mikroorganizmów przewodu pokarmowego ślimaków żywionych czystą celulozą.*

Ślimaki lądowe z rodzaju *Helix* w swoim zdecydowanie roślinożernym trybie odżywiania się dysponują mechanizmami enzymatycznymi ułatwiającymi wykorzystanie polisacharydów roślinnych jako energetyczne źródła pożywienia. Lazariadou-Dumitriadou i Daguzan (1978) stwierdzili w treści pokarmowej ślimaka lądowego *Euparypha pisana* obecność enzymów hydrolizujących polisacharydy roślinne. Zdolności celulolityczne w przewodzie pokarmowym objętego niniejszymi badaniami *Helix aspersa aspersa* mierzyli Fonolla i Sanz (1984). Stwierdzili oni, że zwierzęta te są zdolne strawić 90 mg włókna surowego na 1 g wagi ciała na dobę. Lynd i in. (2002) zajmowali się zasadami wykorzystania mikroorganizmów celulolitycznych w technologii utylizacji odpadów zawierających celulozę. Podobne badania dotyczące utylizacji papieru gazetowego prowadzili już wcześniej Cumings i in. (1994). Tych kilka przykładów publikacji wskazuje, że zagadnienie rozkładu i wykorzystania celulozy jako surowca organicznego ma liczne aspekty i badane jest z bardzo różnych punktów widzenia.

* Praca wykonana w ramach projektu badawczego nr 6P 06 2003C/06 249, finansowanego przez KBN.

Celem pracy było określenie wpływu żywienia ślimaków z rodzaju *Helix* czystą celulozą, oznaczenie jego wpływu na przyrosty masy ciała i przeżywalność oraz zbadanie składu mikrobiocenotycznego bakterii zasiedlających układ pokarmowy winniczka.

Materiał i metody

Badania prowadzono na 3 gatunkach z rodzaju *Helix*: winniczek (*Helix pomatia*), duży szary (*Helix aspersa maxima*) i mały szary (*Helix aspersa aspersa*). W czasie doświadczenia żywiono je czystą celulozą zgodnie z technologią wychowu kuwetowego. Grupę kontrolną stanowiły ślimaki żywione pełnoporcjową mieszanką sypką, używaną w hodowli fermowej. Doświadczenie prowadzono w cyklu dwumiesięcznym, w dwóch etapach:

— w doświadczeniu I materiałem doświadczalnym był wylęg wszystkich ślimaków wspomnianych gatunków, których żywienie zróżnicowano pod względem jakościowym po 4. tygodniu życia.

— w doświadczeniu II materiałem doświadczalnym były ślimaki dorastające z nie wywiniętą jeszcze wargą muszli. Były to *Helix pomatia* w wieku 1+ (po pierwszej hibernacji zimowej) oraz *Helix aspersa maxima* i *Helix aspersa aspersa* przed osiągnięciem dojrzałości rozrodczej.

Prowadzone obserwacje dotyczyły:

- przyrostu masy ciała w okresie doświadczalnego żywienia,
- procentu śmiertelności od czasu rozpoczęcia doświadczenia do jego zakończenia,
- składu mikrobiocenotycznego drobnoustrojów zasiedlających przewód pokarmowy.

W badaniach mikrobiologicznych zastosowano standardowe metody badawcze i powszechnie używane metody analizy z zastosowaniem wybiórczych podłoży mikrobiologicznych, specyficznych dla każdej grupy mikroorganizmowej. W celu izolacji określonych grup mikroorganizmów, w trakcie sekcji osobników pobranych losowo z poszczególnych grup doświadczalnych pobierano treść pokarmową z końcowego odcinka przewodu pokarmowego i w całości przenoszono ją do płynu fizjologicznego. Następnie mieszano i w ilości 1 ml nanoszono na płytki Petriego z odpowiednimi wybiórczymi pożywkami. Hodowle prowadzono w warunkach tlenowych i beztlenowych, w temp 28°C. Do izolacji drobnoustrojów zastosowano następujące podłoża:

- agar MPA — podłoże ogólne dla bakterii,
- podłoże Kinga B — dla bakterii *Pseudomonas*,
- podłoże Chapmanna dla gronkowców,
- podłoże SS dla chorobotwórczych pałeczek,
- podłoże Czapeka dla grzybów,
- agar brzczkowy — podłoże dla grzybów.

Wyniki

W doświadczeniu I u młodych osobników żywionych celulożą, w porównaniu ze ślimakami grupy kontrolnej żywionymi mieszanką standardową, stwierdzono spadek masy ciała i wysoką śmiertelność. Różnice te obrazują wartości zestawione w tabeli 1.

Tabela 1. Wyniki hodowlane juvenilnych stadiów z gatunków *H. pomatia*, *H. aspersa maxima* i *H. aspersa aspersa*

Table 1. Breeding results of juvenile *H. pomatia*, *H. aspersa maxima* and *H. aspersa aspersa* snails

Gatunek ślimaka Snail species	Sposób żywienia Feeding method	% śmiertelności % mortality	Przyrosty masy ciała (g/szt.) Weight gains (g/snail)
<i>Helix aspersa aspersa</i>	celuloza cellulose	100,0	-1,49
	mieszanka paszowa feed mixture	21,1	9,28
<i>Helix aspersa maxima</i>	celuloza cellulose	91,7	-1,91
	mieszanka paszowa feed mixture	10,0	8,54
<i>Helix pomatia</i>	celuloza cellulose	99,5	-0,75
	mieszanka paszowa feed mixture	43,9	2,55

Z powyższego zestawienia wynika, że u młodych osobników wszystkich badanych gatunków najwyraźniej nie wytworzyły się jeszcze w przewodzie pokarmowym zdolności trawienia celulozy. Niższe przyrosty dla winniczka w grupie kontrolnej pozwalają również sądzić o niższej w tym stadium rozwoju osobniczego predyspozycji tego gatunku do standardowej mieszanki sypkiej, opracowanej specjalnie dla obu gatunków *Aspersa*.

U ślimaków ze wszystkich grup doświadczalnych *Helix aspersa* stwierdzono jednakowy skład taksonomiczny biocenozy bakteryjnej. Były to następujące taksony: *Bacillus polymyxa*, *Bacillus subtilis*, *Bacteroides amylophilus*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Clostridium butiricum*, *Lactobacillus sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas stutzeri*, *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.*, *Salmonella sp.* Różnice w mikroflorze przewodu pokarmowego spowodowane różnicą w żywieniu ślimaków miały jedynie charakter ilościowy. U ślimaków żywionych celulożą intensywność występowania stwierdzonej biocenozy bakteryjnej w przypadku *Helix aspersa aspersa* była przeszło półtorakrotnie mniejsza, a u *Helix aspersa maxima* przeszło 2,5-krotnie mniejsza, niż u ślimaków żywionych mieszanką paszową (tab. 2). Z powodu prawie 100% śmiertelności *Helix pomatia* pobór prób bakteriologicznych od osobników tego gatunku nie został przeprowadzony.

Tabela 2. Ilość bakterii przewodu pokarmowego młodych ślimaków z gatunku *Helix aspersa*
 Table 2. Amount of digestive bacteria in juvenile *Helix aspersa* snails

Gatunek ślimaka Snail species	Sposób żywienia Feeding method	Ogólna liczba bakterii (tys./cm ⁻³) Total bacteria count (thous./cm ⁻³)
<i>Helix aspersa aspersa</i>	celuloza cellulose	220
	mieszanka paszowa feed mixture	570
<i>Helix aspersa maxima</i>	celuloza cellulose	150
	mieszanka paszowa feed mixture	550

Tabela 3. Wyniki hodowlane dorastających ślimaków z gatunków *Helix aspersa* i *Helix pomatia*
 Table 3. Breeding results of growing *Helix aspersa* and *Helix pomatia* snails

Gatunek ślimaka Snail species	Sposób żywienia Feeding method	% śmiertelności % mortality	Przyrosty masy ciała (g/szt.) Weight gains (g/snail)
<i>Helix aspersa aspersa</i>	celuloza cellulose	0,0	0,6
	mieszanka paszowa feed mixture	3,7	2,9
<i>Helix aspersa maxima</i>	celuloza cellulose	0,0	0,3
	mieszanka paszowa feed mixture	34,0	0,3
<i>Helix pomatia</i>	celuloza cellulose	36,7	1,2
	mieszanka paszowa feed mixture	0,0	0,9

W doświadczeniu II dorastające osobniki żywione celulożą wykazały, w zestawieniu ze ślimakami żywionymi mieszanką paszową, dodatnie przyrosty oraz porównywalne śmiertelności, również u *Helix pomatia* (tab. 3). W grupie ślimaków starszych zdolność do wykorzystania celulozy w celach pokarmowych była wyraźnie widoczna. Wszystkie ślimaki z grup doświadczalnych wykazywały przyrosty masy ciała oraz mniejszą śmiertelność w porównaniu z młodszą grupą wiekową z doświadczenia I.

Nie stwierdzono różnic jakościowych w składzie drobnoustrojów zasiedlających przewód pokarmowy ślimaków grupy doświadczalnej i kontrolnej. Dominujące rodzaje bakterii to: *Bacillus*, *Butyrivibrio*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Salmonella*. Różnice w mikroflorze prze-

wodu pokarmowego obu grup miały jednak wyraźny charakter ilościowy. Skład ilościowy bakterii przewodu pokarmowego, bakterii beztlenowych w biocenozie bakteryjnej oraz aktywności celuloリティcznej u ślimaków z doświadczenia drugiego przedstawia tabela 4.

Tabela 4. Skład ilościowy bakterii przewodu pokarmowego ślimaków dorastających z doświadczenia drugiego

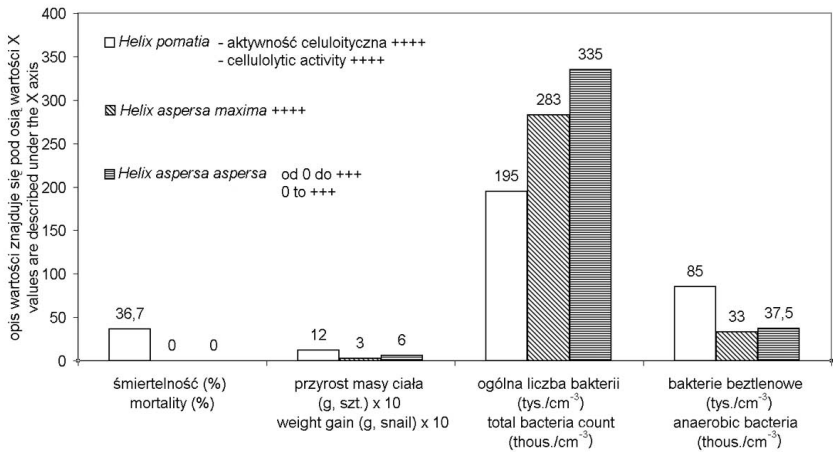
Table 4. Quantitative composition of digestive bacteria in growing snails in the second experiment

Gatunek ślimaka Snail species	Sposób żywienia Feeding method	Ogólna liczba bakterii (tys./cm ⁻³) Total bacteria count (thous./cm ⁻³)	Bakterie beztlenowe (tys./cm ⁻³) Anaerobic bacteria (thous./cm ⁻³)	Aktywność celuloリティczna Cellulolytic activity
<i>Helix aspersa aspersa</i>	celuloza cellulose	335	37,5	0 — +++
	mieszanka paszowa feed mixture	283	22,5	+
<i>Helix aspersa maxima</i>	celuloza cellulose	283	33	++++
	mieszanka paszowa feed mixture	123	17,5	+
<i>Helix pomatia</i>	celuloza cellulose	195	85	++++
	mieszanka paszowa feed mixture	225	15	0 — +

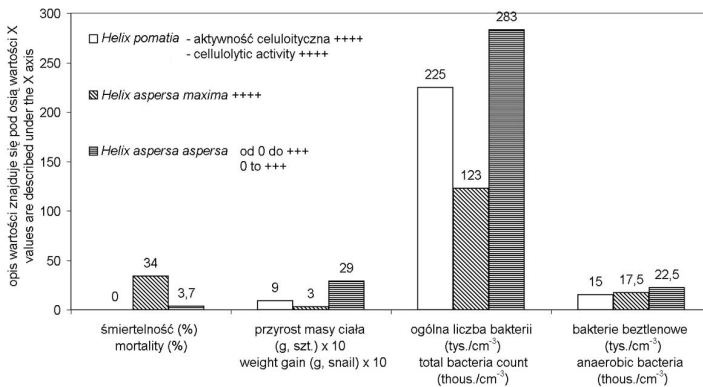
Omówienie wyników

W wyniku przeprowadzonych wstępnych badań żywieniowych nad możliwością wykorzystywania czystej celulozy przez wybrane gatunki winniczka (*Helix*) wykazano, że badane gatunki mają w przewodzie pokarmowym wyspecjalizowaną mikroflorę umożliwiającą im korzystanie z tego związku. U dorastających *Helix aspersa aspersa* i *Helix aspersa maxima* żywionych celulozą intensywność występowania stwierdzonej biocenozy bakteryjnej była w porównaniu z grupą kontrolną odpowiednio o 15,8 i 45,4% wyższa. Natomiast w przypadku *Helix pomatia* ogólna ilość bakterii była wyższa w grupie żywionej mieszanką paszową o 12,2%.

Ogólna ilość bakterii beztlenowych odpowiedzialnych za trawienie celulozy była wyższa w grupie doświadczalnej w porównaniu z kontrolną. U trzech badanych gatunków porównanie to przedstawiało się następująco: u *Helix pomatia* bakterie beztlenowe stanowiły 43% w ogólnej liczbie bakterii, podczas gdy u kontroli 6,7%. W przypadku *Helix aspersa aspersa* odpowiednio 11,2 i 7,9%. Natomiast u *Helix aspersa maxima* ilości procentowe bakterii beztlenowych były zbliżone.



Rys. 1. Efekt żywienia czystą celulozą ślimaków z rodzaju *Helix*
Figure 1. Effect of feeding pure cellulose to *Helix* snails



Rys. 2. Efekt porównawczy żywienia ślimaków z rodzaju *Helix* paszą standardową
Figure 2. Effect of feeding standard feed to *Helix* snails

Stwierdzona u *Helix pomatia* wysoka zdolność modyfikacji składu gatunkowego mikroflory przewodu pokarmowego do potrzeb trawienia celulozy wynika niewątpliwie z jego utrwalonych preferencji pokarmowych w naturalnym środowisku bytowania. W niniejszej pracy udało się wykazać w sposób niezaprzeczalny, że osobniki tego gatunku potrafią wykorzystać czystą celulozę nie tylko jako źródło zapotrzebowania energetycznego, ale także białko mikroorganizmów rozkładają-

cych ten produkt stanowi prawdopodobnie źródło potrzebnych do wzrostu i rozwoju ślimaków związków azotowych.

Nasuwa się, w wyniku relacjonowanych rezultatów, potrzeba kontynuacji tego kierunku badań w selekcji lepiej wyspecjalizowanych szczepów mikroorganizmów (*Butyrivibrio* i *Clostridium*), wykazujących lepsze właściwości celulolityczne i to zarówno na ślimakach, jak i na zwierzętach wyższych.

Być może, właściwości wydajnego trawienia celulozy przez winniczka mogłyby zostać wykorzystane do produkcji probiotyków w formie kultur szczepów bakteryjnych wspomagających trawienie celulozy, a przez to umożliwiających lepsze wykorzystanie paszy, na przykład u przeżuwaczy. Ten aspekt stwierdzonych w niniejszej pracy zależności wart jest dalszych obserwacji.

Podsumowując uzyskane wyniki można stwierdzić, że mikroflora przewodu pokarmowego młodych ślimaków badanych gatunków nie posiada jeszcze zdolności modyfikacji składu gatunkowego swej flory do wąsko wyspecjalizowanego spektrum pokarmowego, jakim jest celuloza. Zdolność ta pojawia się u ślimaków starszych, o czym świadczą przyrosty masy ciała, porównywalne z kontrolą śmiertelności oraz wysoki stopień aktywności celulolitycznej mikroorganizmów bytujących w ich przewodach pokarmowych. (rys. 1 i 2).

Piśmiennictwo

- Cummings S.P., Stewart C.S. (1994). Newspaper as substrate for cellulolytic landfill bacteria. *J. Appl. Bacteriol.*, 76: 196–202.
- Fonolla J., Sanz M. (1984). Etude de la capacite cellulolytique de l'ecargot *Helix aspersa* nourri avec des rations semisyntetyques. *Ann. Zootech.*, 33 (1): 99–110.
- Lazaridou-Dumitriadou M., Daguzan M. (1978). Consommation alimentaire. Et bilan de differentes energetique chez *Euparypha pisana* (Müller) (*Gasteropode, pulmone*). *Ann. Nutr. Alim.*, 32: 1317–1350.
- Lynd L.R., Weimer P.J., Zyl W.H. van, Pretorius I.S. (2002). Microbial cellulose utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microb. Mol. Biol. Rev.*, 66, 3: 506–577.

Zatwierdzono do druku 9 V 2006

ANDRZEJ ŁYSAK, KAROL WEGLARZY, MACIEJ LIGASZEWSKI,
ZOFIA MACH-PALUSZKIEWICZ, WIEŚLAW BARABASZ

Effect of feeding *Helix* snails with pure cellulose on rearing performance and composition of microbiocenotic digesta

SUMMARY

The results of studies on the effect of feeding pure cellulose to *Helix* snails are presented. Two age groups of snails, juvenile and somatically mature, were investigated. The control group were snails of the same age, which were fed a complete standard diet. It was found that the digestive microflora of juvenile

snails is unable to modify the species composition of the bacterial biocenosis for the purpose of cellulose digestion. This ability appeared in older snails, as evidenced by the weight gains of the experimental snails, which were comparable with those of the control snails, and the high cellulolytic activity of digestive microorganisms in snails receiving pure cellulose.

Key words: edible snail (*Helix*), feeding, use of pure cellulose