

Autoreferat

wraz z informacjami o dorobku naukowym i upowszechnianiu badań

Rola kwasów tłuszczowych i immunomodulatorów w diecie ryb oraz
ich związek z jakością biologiczną podchowyanego materiału

Agata Kowalska

1. Dane personalne

Imię i nazwisko: Agata Kowalska

Miejsce Pracy: Instytut Rybactwa Śródlądowego im. Stanisława Sakowicza
ul. Oczapowskiego 10
10-719 Olsztyn
e-mail: a.kowalska@infish.com.pl

2. Stopnie naukowe oraz posiadane dyplomy z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytuł rozprawy doktorskiej

stopień naukowy doktora nauk rolniczych w dyscyplinie rybactwo uzyskany w Instytucie Rybactwa Śródlądowego im. Stanisława Sakowicza w Olsztynie w 2008 roku;

tytuł rozprawy doktorskiej: „Wpływ żywienia na efekty podchowu juwenalnego sandacza, *Sander lucioperca* (L.)”; praca doktorska wyróżniona przez Radę Naukową Instytutu

tytuł zawodowy magistra inżyniera rybactwa, specjalność biotechnologia w hodowli zwierząt, uzyskany na Wydziale Ochrony Środowiska i Rybactwa Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie w 2001 roku; dyplom ukończenia studiów z wyróżnieniem

dyplom Międzywydziałowego Studium Pedagogicznego uzyskany na Wydziale Pedagogiki i Wychowania Artystycznego Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie w 2001 roku

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

2008 – obecnie – adiunkt, Zakład Akwakultury, Instytut Rybactwa Śródlądowego im. Stanisława Sakowicza w Olsztynie

2003 – 2008 – asystent, Zakład Akwakultury, Instytut Rybactwa Śródlądowego im. Stanisława Sakowicza w Olsztynie

2002 – 2003 – specjalista inżynierijno-techniczny, Samodzielna Pracownia Akwakultury, Instytut Rybactwa Śródlądowego im. Stanisława Sakowicza w Olsztynie

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.)

Osiągnięcie naukowe będące podstawą wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego pod tytułem:

ROLA KWASÓW TŁUSZCZOWYCH I IMMUNOMODULATORÓW W DIECIE RYB ORAZ ICH ZWIĄZEK Z JAKOŚCIĄ BIOLOGICZNĄ PODCHOWYWANEGO MATERIAŁU

tworzy cykl następujących publikacji (autorzy, tytuł publikacji naukowej, nazwa czasopisma, rok wydania, wolumin, strony; *impact factor* (IF) czasopisma zgodny z rokiem opublikowania, liczba punktów za publikację (MNiSW) wg listy obowiązującej w roku opublikowania:

4.1. Zakęś Z., Demska-Zakęś K., **Kowalska A.**, Hancz C., Jarmołowicz S. Impact of diets supplemented with rapeseed, soy, and sunflower oils on growth rates and the histological picture of the livers of juvenile pikeperch, *Sander lucioperca* (L.). Arch. Pol. Fish. 2010, 18: 67–75 (MNiSW₂₀₁₀ 6)

4.2. Zakęś Z., **Kowalska A.**, Jankowska B., Demska-Zakęś K., Hancz C., Jarmołowicz S. Impact of feeding juvenile pikeperch (*Sander lucioperca* (L.)) diets supplemented with

vegetable oils on proximate body composition and fatty acid profile. Arch. Pol. Fish. 2010, 18: 135–147 (MNiSW₂₀₁₀ 6)

4.3. **Kowalska A.**, Zakęś Z., Siwicki A.K., Jankowska B., Jarmołowicz S., Demska-Zakęś K. Impact of diets with different proportions of linseed and sunflower oils on the growth, liver histology, immunological and chemical blood parameters, and proximate composition of pikeperch *Sander lucioperca* (L.). Fish Physiol. Biochem. 2012, 38(2): 375–388 (IF=1,545; MNiSW₂₀₁₂ 20)

4.4. **Kowalska A.**, Zakęś Z., Siwicki A.K., Terech-Majewska E., Jankowska B., Jarmołowicz S., Głabski E. Impact of brewer's yeast extract and levamisole in diets with vegetable oils on the growth, chemical composition, and immunological and biochemical blood parameters of pikeperch (*Sander lucioperca*). Czech J. Anim. Sci. 2015, 60(11): 498–508 doi: 10.17221/8558-CJAS (IF=1,183; MNiSW₂₀₁₅ 30)

4.5. **Kowalska A.**, Kowalski R.K. The effect of cyclooxygenase (COX) inhibitors on Japanese medaka (*Oryzias latipes*) reproduction parameters fed feed with high level of arachidonic acid (20:4 n-6). Aquac. Inter. 2014, 22: 185–193 (IF=0,984; MNiSW₂₀₁₄ 20)

Praca finansowana w ramach projektu badawczego przyznanego przez MNiSW (N N311 25 11 37, 2009–2012), w którym dr inż. Agata Kowalska była kierownikiem.

Wkład wnioskodawcy w wymienione publikacje obejmuje: autorstwo/współautorstwo hipotez i koncepcji badań, nadzór i przeprowadzenie części doświadczalnej, analizę i opracowanie wyników oraz napisanie w całości większości manuskryptów (załączono stosowne oświadczenia współautorów; Załącznik 3 i 4).

5. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Omówienie problemu badawczego

Przedstawiane osiągnięcie naukowe stanowi jednotematyczny cykl publikacji poświęconych roli kwasów tłuszczowych i immunomodulatorów w diecie ryb oraz określeniu ich związku z jakością biologiczną podchowyanego materiału. Lipidy diety, a szczególnie kwasy tłuszczowe (FA) są preferowanym przez ryby źródłem energii metabolicznej koniecznej zarówno dla ich wzrostu jak i reprodukcji (Jobling i in. 2001). Kwasy tłuszczowe są również prekursorami ikozanoidów, związków zaangażowanych m.in. w odpowiedź immunologiczną i rozród ryb (Sargent i in. 2002). Odpowiedni udział poszczególnych kwasów tłuszczowych w diecie warunkuje prawidłowy wzrost, przebieg tarła czy reakcje immunologiczne (Izoquirodo i in. 2001, Montero i in. 2003).

Za niezbędne kwasy tłuszczowe (EFA) w diecie ryb uznaje się wielonienasycone kwasy tłuszczowe (PUFA) z szeregu n-6 (n-6 PUFA) i n-3 (n-3 PUFA) do których należą kwas linolowy (LA, C18:2 n-6) i kwas linolenowy (ALA, C18:3 n-3) lub ich pochodne, tj. kwasy o wyższym stopniu nienasycenia i dłuższych łańcuchach węglowych (HUFA), takie jak kwas arachidonowy (ARA, C20:4 n-6), ikozapentaenowy (EPA, C20:5 n-3) i

dokozaheksaenowy (DHA, C22:6 n-3) (Furuita i in. 2003). Synteza HUFA w organizmie ryb zależy nie tylko od gatunku, ale co równie istotne od aktywności enzymów i ilości ich substratów (ALA/LA) w diecie (Xu i Kestemont 2002, Jankowska i in. 2003). Okazało się także, że istnieje zależność między ilością kwasów tłuszczowych nasyconych (SFA), takich jak kwas mirystynowy (C14:0) i palmitynowy (C16:0) w diecie, a absorpcją i metabolizmem kwasów tłuszczowych w wątrobie ryb (Parpoura i Alexis 2001, Kowalska i in. 2010, 2011b). Wiadomo, że na potrzeby energetyczne wykorzystywane są przede wszystkim kwasy tłuszczowe jednonienasycone (MUFA), w tym kwas oleinowy (C18:1 n-9), które to dominują w tłuszczu okołojelitowym (Sargent i in. 2002, Kowalska i in. 2010). Kwasy PUFA mają tendencje do kumulacji w innych tkankach (mięśniowej, wątrobowej) (Stubhaugh i in. 2005), a niektóre gatunki posiadają zdolność ich biokonwersji do HUFA (Jankowska i in. 2003). Jest to ważne z punktu widzenia immunologii ryb, gdyż ikozanoidy są syntetyzowane z 20 węglowych kwasów tłuszczowych. Synteza ta odbywa się na szlaku cyklooksygenaz, na który silnie oddziaływać mogą takie czynniki zewnętrzne jak żywienie, w tym skład lipidowy diety (Bell i Sargent 2003).

Dotychczas dominującym źródłem kwasów tłuszczowych w paszach dla ryb był tran, (bezpośrednie źródło HUFA w diecie ryb), który od kilku lat sukcesywnie zastępuje się tańszymi i łatwiej dostępnymi olejami roślinnymi (Turchini i in. 2009, FAO 2013). Różnice w zawartości kwasów tłuszczowych pomiędzy tranem a olejami roślinnymi są znaczące (Tabela 1; NRC 1993, Zambiasi 2007, Orsavova i in. 2015). Biorąc pod uwagę podstawowe funkcje kwasów tłuszczowych z rodziny n-3, n-6 i n-9 w organizmie ryb (Tabela 2; Sargent i in. 2002) wnioskuje się, że wspomniana modyfikacja diety może znacząco wpływać na jakość podchowyanego materiału, tj. stan zdrowotny i zdolność do odpowiedzi immunologicznej ryb oraz wskaźniki podchowu, w tym efekty ich rozrodu.

Tabela 1. Ilość wybranych kwasów tłuszczowych (% wszystkich kwasów tłuszczowych) w tranie i olejach roślinnych (NRC 1993, Zambiasi i in. 2007, Orsavova i in. 2015) wykorzystywanych w diecie ryb

Kwasy tłuszczowe	Tran	Olej sojowy	Olej rzepakowy	Olej słonecznikowy	Olej lniany	Olej palmowy	Olej kokosowy	Oliwa z oliwek
C14:0 <i>Kwas mirystynowy</i>	7,5	0,1	0	0,1	0,1	1,1	19,9	0
C16:0 <i>Kwas palmitynowy</i>	17,6	9,6	4,6	6,2	4,8	42,7	0	10,8
C18:1 n-9 <i>Kwas oleinowy</i>	6,6	23,4	63,3	28,0	21,4	39,4	6,2	75,6
C18:2 n-6 <i>Kwas linolowy LA</i>	1,3	52,9	19,6	62,2	15,2	10,6	1,6	7,0
C18:3 n-3 <i>Kwas linolenowy ALA</i>	0,7	7,6	1,2	0,2	54,2	0,2	0	0,7
C20:4 n-6 <i>Kwas arachidonowy ARA</i>	1,0	0	0	0	0	0	0	0
C20:5 n-3 <i>Kwas ikozapentaenowy EPA</i>	14,0	0	0	0	0	0	0	0
C22:6 n-3 <i>Kwas dokozaheksaenowy DHA</i>	9,5	0	0	0	0	0	0	0
Wskaźnik n3/n6	10,5	0,1	0,1	0,0	3,4	0,0	-	0,1

Tabela 2. Podstawowe funkcje wybranych kwasów tłuszczowych w organizmie ryb (Sargent i in. 2002)

Kwasy tłuszczowe	Znaczenie
C16:0 <i>Kwas palmitynowy</i> C18:1 n-9 <i>Kwas oleinowy</i>	Źródło energii metabolicznej
C18:2 n-6 <i>Kwas linolowy LA</i> C18:3 n-3 <i>Kwas linolenowy ALA</i>	Niezbędne kwasy tłuszczowe u ryb, substraty dla enzymów desaturacyjnych, prekursor kwasów tłuszczowych o długich łańcuchach węglowych ($\geq C20$) i wyższym stopniu nienasylenia
C20:4 n-6 <i>Kwas arachidonowy ARA</i>	Prekursor ikozanoidów, substancji organicznych związanych z procesami rozrodczymi, układem immunologicznym i nerwowym, osmoregulacją, główny substrat dla enzymu cyklooksygenazy
C20:5 n-3 <i>Kwas ikozapentaenowy EPA</i> C22:6 n-3 <i>Kwas dokozaheksaenowy DHA</i>	Niezbędne kwasy tłuszczowe u ryb, składniki błon komórkowych, feromonów, hormonów, witamin, pigmentu

Poszukiwanie innych niż tran źródeł lipidów w paszach komercyjnych wynika z wyczerpania zasobów mórz i oceanów i ograniczonej dostępności tłuszczu rybiego, spotęgowanej dodatkowo rosnącym zapotrzebowaniem na ten komponent dynamicznie rozwijającej się akwakultury (Martins i in. 2010). Należy podkreślić, że już sama intensyfikacja produkcji, która sprzyja szybkiemu rozprzestrzenianiu się infekcji, jest czynnikiem stresogennym dla ryb, a zmiana żywienia dodatkowo predysponuje do pogorszenia odporności organizmu (Burka i in. 1997, Oliva-Teles 2012). Ponadto w okresie intensywnego wzrostu ryb i rozrodu, zwłaszcza w czasie formowania się gamet występuje wzmożone zapotrzebowanie na specyficzne kwasy tłuszczowe, a zapewnienie ich podaży w diecie jest kluczowe dla uzyskania korzystnych efektów podchowu (Burce i in. 1999, Izhizaki i in. 2001, Furuita i in. 2003, Görgün i Akpinar 2007). Zachowanie odpowiedniego poziomu EFA w paszy mogłoby być zapewnione przez odpowiednie źródło lipidów i/lub dodatkową suplementację pasz o konkretne kwasy tłuszczowe istotne na danym etapie ontogenezy, wykorzystując np. odpowiednie ekstrakty (Kowalska i Zakęś 2009). Może się także okazać, że przy modyfikacji żywienia zasadne będzie wykorzystanie dodatkowych suplementów (np. immunomodulatorów), mających ukierunkowane korzystne działanie na organizm ryb i niwelujących efekty deficytów HUFA w ich diecie (Oliva-Teles 2012, Ringø i Song 2016).

Obecny rozwój akwakultury opiera się nie tylko na intensyfikacji produkcji, ale i wprowadzaniu do hodowli nowych gatunków. W systemach recyrkulacyjnych (RAS) prowadzi się ostatnio podchów sandacza *Sander lucioperca* i wykorzystuje komercyjne pasze pstrągowe (Zakęś 2009). Jako że poznano wymagania pokarmowe dot. zawartości podstawowych komponentów, tj. białka, lipidów i węglowodanów w diecie tego gatunku (Nyina-Wamwiza 2005) możliwe jest prowadzenie bardziej zaawansowanych badań żywieniowych (np. stanowiących wskazane osiągnięcie naukowe). Jednocześnie wraz z promowaniem w badaniach naukowych zasady zastąpienia, zredukowania i udoskonalenia (tzw. 3R z ang., *Replacement, Reduction, Refinement*) pożądane staje się zaprojektowanie doświadczeń z wykorzystaniem organizmów modelowych. Ich udział w badaniach obniża koszty testowania np. drogich i innowacyjnych suplementów i stwarza możliwość prowadzenia bardziej dokładnych analiz. Aspekt ekonomiczny jest zasadny szczególnie w pionierskich badaniach. W badaniach sprzyjających rozwojowi akwakultury z dużym powodzeniem wykorzystuje się jako modelowy gatunek medakę (ryżanka japońska *Oryzias latipes*) (Ishikawa 2000). Wyniki badań na modelowym organizmie ryb mogą okazać się użyteczne zwłaszcza w podchowach gatunków nowych w akwakulturze.

W związku z powyższym podjęto badania dot. wpływu kwasów tłuszczowych diety i innowacyjnych immunomodulatorów na efekty podchowu sandacza i medaki. Posiadają one duży potencjał aplikacyjny. Zakładają ulepszenie warunków podchowu ryb i jakości uzyskiwanego materiału, co ma kluczowe znaczenie dla wzrostu produkcji zwłaszcza nowych gatunków w akwakulturze.

Cel naukowy osiągnięcia oraz wyniki badań wraz z omówieniem ich wykorzystania

Głównym celem planowanych badań zawartych w pięciu pracach stanowiących opisywane osiągnięcie naukowe było ograniczenie negatywnych skutków modyfikacji zawartości kwasów tłuszczowych diety ryb, wynikającej z zastępowania tłuszczu rybiego olejami roślinnymi w paszach wykorzystywanych w ich podchowcie.

Cele szczegółowe następujących po sobie badań prezentują poniższe publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego.

Celem szczegółowym pierwszego eksperymentu opisanego w pierwszej z wybranych prac [pozycja 4.1; Zakęś Z., Demska-Zakęś K., Kowalska A., Hancz C., Jarmolowicz S. **Impact of diets supplemented with rapeseed, soy, and sunflower oils on growth rates and the histological picture of the livers of juvenile pikeperch, *Sander lucioperca* (L.). Arch. Pol. Fish. 2010, 18: 67–75]** była weryfikacja hipotezy badawczej wiążącej bezpośrednio źródło lipidów w paszy ze wzrostem ryb, retencją tłuszczu i zmianami histologicznymi w narządzie wątroby.

W paszach doświadczalnych źródłem lipidów był tran (grupa CD) lub łatwo dostępne na rynku oleje roślinne, takie jak olej rzepakowy (grupa RO), olej sojowy (grupa SO) i olej słonecznikowy (grupa SFO). Całkowita zawartość tłuszczu w paszach była zbliżona (19%), przy czym oleje roślinne stanowiły 84% ich udziału (160 g kg⁻¹ paszy; reszta pochodziła głównie z mączki rybnej). Zawartość białka, tłuszczu i węglowodanów w paszach eksperymentalnych mieściła się w przedziale wartości rekomendowanych dla gatunku stanowiącego materiał doświadczalny (sandacz, Nyina-Wamwiza i in. 2005). Ryby podchowiano w systemach recyrkulacyjnych (RAS), a żywienie testowanymi paszami trwało 55 dni.

W dniu zakończenia eksperymentu nie stwierdzono istotnego wpływu paszy z różnym źródłem lipidów na dobowy i względny przyrost masy ciała (odpowiednio DGR i SGR) oraz współczynnik kondycji ryb (K). Nie zaobserwowano także wpływu jakości tłuszczu na retencję energii (ANER) i białka (ANPR). Oleje sojowy i słonecznikowy w diecie sandacza odegrały już jednak istotną rolę w retencji tłuszczu (ALR). W grupach SFO i SO różnica w

wartości ALR była znacząca (61 vs 90%). Istotnym był fakt, że duża przyswajalność testowanego tłuszczu implikowała bardziej zaawansowane zmiany patologiczne w narządzie wątroby. Liczne duże wakuole lipidowe oraz ogniska nekrozy i degeneracji dotyczyły w szczególności grupy SO.

Podsumowując wyniki eksperymentu stwierdza się, że oleje rzepakowy (z dominacją MUFA), sojowy (z dominacją n-6 PUFA, ale i znaczną obecnością n-3 PUFA) i słonecznikowy (z dominacją n-6 PUFA, ale bez znacznej ilości n-3 PUFA) w diecie sandacza nie wpływają na tempo wzrostu ryb w okresie 55 dni zadawania takiej paszy. Żywienie ryb paszą suplementowaną olejem sojowym i słonecznikowym determinowało istotnie retencję tłuszczu. Olej sojowy najsilniej implikował zmiany patologiczne wątroby.

Wiedząc, że wątroba jest narządem, w którym zachodzi metabolizm kwasów tłuszczowych zasadne było przeanalizowanie składu chemicznego testowanych pasz z różną dominacją poszczególnych kwasów tłuszczowych w odniesieniu do składu chemicznego podstawowego, zawartości kwasów C18 i ich pochodnych (\geq C20) w całym ciełe ryb, mięsie, trzewiach i wątrobie. Dałoby to podstawy do wnioskowania o zdolności ich biokonwersji w ciełe sandacza i tendencji do kumulacji w tkankach, czego wymiernym efektem jest wartość wskaźnika n3/n6 i ilość korzystnych dla organizmu ryby i konsumenta kwasów HUFAs.

Wyniki analiz składu chemicznego pasz i tkanek sandacza przedstawiono w drugiej z wybranych prac [pozycja 4.2; Zakęś Z., Kowalska A., Jankowska B., Demska-Zakęś K., Hancz C., Jarmołowicz S. **Impact of feeding juvenile pikeperch (*Sander lucioperca* (L.)) diets supplemented with vegetable oils on proximate body composition and fatty acid profile. Arch. Pol. Fish. 2010, 18: 135–147].** Celem szczegółowym eksperymentu było zbadanie wpływu żywienia paszą z dominacją kwasów C18 na skład chemiczny podstawowy i profil kwasów tłuszczowych w całym ciełe ryby, filecie, trzewiach i wątrobie. Skład pasz był analogiczny do podanego w wyżej przywoływanej publikacji [pozycja 4.1]

Stwierdzono, że pasze eksperymentalne (suplementowane RO, SO, SFO) nie wpływają na zawartość tłuszczu, białka, wody, popiołu w całym ciełe ryb, filetach i trzewiach. Istotnie zmieniają już jednak ilość białka w wątrobie, znacząco zwiększając przy tym zawartość tłuszczu. Dominacja C18 w diecie rzutuje na wzrost ilości tych kwasów (oleinowego i linolenowego w grupie RO oraz linolowego w grupach SO i SFO) w mięsie ryb, ale nie zmienia zawartości DHA. Z kolei w wątrobie ryb ilość pochodnych 18C (ARA, EPA, DPA, DHA) we wszystkich grupach (RO, SO, SFO) była już znacząco niższa. Wysoka zawartość n-6 PUFA w diecie ryb zdecydowała o niekorzystnej, niższej wartości wskaźnika n3/n6 w całym ciełe, filecie, trzewiach i wątrobie ryb.

Pomimo, że kwasy tłuszczowe w diecie sandacza nie wpłynęły na podstawowe wskaźniki hodowlane, a uzyskane wartości wskaźników ALR i ANER w grupach SFO, SO i RO wskazały jednocześnie na wysoką przyswajalność pasz z roślinnym źródłem lipidów i z dominacją jednego kwasu 18C, to analizy histologiczne [pozycja 4.1] nie pozwoliły na jednoznaczne rekomendowanie tego rodzaju tłuszczu w paszy. Przemiany lipidowe, które zachodzą w narządzie wątroby mogły być bowiem zaburzone i wpływać na stwierdzone różnice międzygrupowe w ilości kwasów tłuszczowych w tkankach [pozycja 4.2]. U mniejszych ryb drapieżnych (pstrąg tęczowy *Oncorhynchus mykiss*, labraks *Dicentrarchus labraks*) dominacja kwasów MUFA (cecha np. oleju rzepakowego) w diecie wywołuje zbliżony lub większy stopień degeneracji tego narządu, nawet w krótszym okresie żywienia niż stwierdzone w grupie SO (Parpoura i Alexis 2001, Caballero i in. 2002, pozycja 4.1). Schulz i in. (2005) wskazali z kolei, że o ile olej sojowy w paszy sandacza istotnie obniża wartość wskaźnika wątrobowosomatycznego (HSI), to u ryb żywionych paszą z olejem lnianym lub z tranem wartości te są zbliżone. W związku z powyższym zasadne było przetestowanie efektu suplementacji pasz mieszaniną oleju słonecznikowego i oleju lnianego, jako źródła kwasów n-6 i n-3 PUFA, w różnych proporcjach. Przemawiał za tym także fakt zdolności sandacza do biokonwersji prekursorów (LA i ALA obecnych w ww. olejach) do wysocenieńasyconych kwasów tłuszczowych HUFA (Jankowska i in. 2003). Odpowiednia mieszanka tych olejów mogłaby okazać się więc właściwa w żywieniu sandacza. Mając na uwadze konkurencję kwasów tłuszczowych 18C z rodziny n-3 i n-6 o enzymy desaturacyjne uczestniczące w syntezie HUFA (Jankowska i in. 2003) oraz funkcje HUFA u ryb (Sargent i in. 2002) pożądane było przeprowadzenie kolejnych bardziej zaawansowanych badań z uwzględnieniem ilości poszczególnych kwasów tłuszczowych w diecie i tkankach ryb w odniesieniu do ich stanu zdrowotnego.

Celem głównym trzeciej pracy wchodzącej w skład opisywanego osiągnięcia naukowego [pozycja 4.3; Kowalska A. Zakęś Z. Siwicki A.K., Jankowska B., Jarmolowicz S., Demska-Zakęś K. **Impact of diets with different proportions of linseed and sunflower oils on the growth, liver histology, immunological and chemical blood parameters, and proximate composition of pikeperch *Sander lucioperca* (L.)**. *Fish Physiol. Biochem.* 2012, 38(2): 375–388] było porównanie wpływu różnego stosunku wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA) z szeregu n-3 i n-6 w diecie sandacza na wzrost, skład chemiczny tkanek, zmiany histologiczne wątroby, parametry immunologiczne i chemiczne krwi ryb.

Na podstawie wcześniejszych badań założono, że żywienie sandacza paszą suplementowaną olejem roślinnym (olejem lnianym lub słonecznikowym) stanowiącym ok. 80% całkowitej ilości tłuszczu w paszy wysokotłuszczowej (około 190 g tłuszczu kg^{-1} paszy) niekorzystnie zmieni strukturę histologiczną narządów wewnętrznych i biochemiczne parametry krwi (**pozycja 4.1**, Kowalska i in., 2010, 2011b). Powyższe przesłanki skłoniły do zastosowania w eksperymencie mniejszej i mieszczącej się w zakresie rekomendowanych wartości dla sandacza (Nyina-Wamwiza i in. 2005) ilości tłuszczu w paszy (130 g kg^{-1} paszy), z dominującą zawartością olejów roślinnych (67 g kg^{-1} paszy). Nie bez znaczenia był też fakt, że produkty roślinne mogą być potencjalnie nieatrakcyjne smakowo dla ryb, hamować przyswajalność nutrietów z diety i w konsekwencji niekorzystnie wpływać na jakość biologiczną materiału, w tym stan zdrowotny ryb (Jobling 2001, Hardy i Barrows 2002). Uznano więc, że ilość tłuszczu oparta głównie o komponenty roślinne powinna być ograniczona do bezpiecznie niskiego poziomu, tj. mieszczącego się w zakresie rekomendowanych wartości i zapewniającego prawidłowe tempo wzrostu ryb.

W związku z powyższym w eksperymencie wykorzystano 2 różne oleje roślinne: słonecznikowy – bogaty w kwas linolowy (C18:2 n-6, LA) i lniany – bogaty w kwas linolenowy (C18:3 n-3, ALA). Testowano cztery pasze, tj. z olejem słonecznikowym (grupa 100SFO) lub lnianym (grupa 100LO) w ilości 67 g kg^{-1} paszy i dwie mieszanki tych olejów w ilości odpowiednio 47 i 20 g kg^{-1} paszy (grupa 70SFO/30LO) lub 20 i 47 g kg^{-1} paszy (grupa 30SFO/70LO). Ryby żywiono taką paszą przez 56 dni.

Różny stosunek n3/n6 diety (zakres 0.36-2.15) otrzymany przez zastosowanie odmiennej proporcji oleju lnianego i słonecznikowego w paszy nie wpłynął na wzrost ryb (DGR i SGR) i współczynnik pokarmowy pasz (FCR). Również wartości wskaźników trzewiowo- (VSI) i wątrobowosomatycznego (HSI) jak i morfometria hepatocytów były podobne w czterech grupach żywieniowych. Mogło się to wiązać z zastosowaną mniejszą ilością tłuszczu (13%) niż we wcześniejszych eksperymentach (19%; **pozycja 4.1**, Kowalska i in. 2010, 2011b). Zmiany patologiczne wątroby sandacza obserwowano wcześniej przy niskiej zawartości kwasów mirystynowego (141 g kg^{-1} FA), palmitynowego (90 g kg^{-1} FA), EPA i DHA (51 g kg^{-1} FA) i bardzo wysokiej ALA (355 g kg^{-1} FA) (Kowalska i in. 2011b). W niniejszym eksperymencie żadna z testowanych pasz nie wykazała deficytu wyżej wymienionych FA, a ilość ALA nie przewyższała 235 g kg^{-1} FA. Uzyskane wyniki mogły też wskazywać na zawartości kwasów ALA, EPA i DHA w paszach, przy których zachowana jest właściwa struktura histologiczna narządu wątroby.

Różna zawartość ALA i LA w paszy wpłynęła na istotne różnice międzygrupowe w ilości tych kwasów w całym ciecie, trzewiach, filecie i wątrobie ryb. Nie determinowała jednak zawartości ich pochodnych (ARA, EPA, DHA) w filecie i wątrobie. Ilość DHA w filetach była znacząco wyższa ($167\text{--}176\text{ g kg}^{-1}\text{ FA}$) niż w testowanych paszach ($43\text{--}50\text{ g kg}^{-1}\text{ FA}$). Wynika to z preferencji kumulowania go w mięśniach ze względu na funkcje jaką pełni w metabolizmie fosfolipidów (Jobling 2001, Sargent i in. 2002) oraz możliwości syntezy z EPA (Jankowska i in. 2003, Turchini i in. 2009). Jakkolwiek synteza ta mogła jednocześnie implikować niską zawartość EPA w filetach ($54\text{--}60\text{ g kg}^{-1}\text{ FA}$), to niewątpliwie jego ilość wynikała głównie z roślinnego źródła tłuszczu w diecie ryb.

Wyniki badań wykazały, że to wysoka zawartość ALA i/lub LA w paszy powoduje obniżenie komórkowej odpowiedzi immunologicznej sandacza zależnej od fagocytów i limfocytów. Obniżenie odpowiedzi immunologicznej wiązało się też ze zbliżoną zawartością ALA i LA w wątrobie (grupa 100LO). Konkurencja tych kwasów o enzymy mogła zahamować biokonwersję do ARA, prekursora ikozanooidów związanych z odpornością ryb. Bardzo wysoka ilość LA w wątrobie (grupa 100SFO), kwasu który ma tendencje do kumulacji w tkankach mogła spotęgować z kolei procesy oksydacyjne przez co obniżyła funkcje obronne organizmu (Stubhaugh i in. 2005, Lin i Shiau 2007). W przypadku sandacza przetestowana w eksperymencie mieszanka olejów dostarcza takiej ilości prekursorów, która prawdopodobnie nie wyklucza wzajemnych przemian EFA i pozwala uniknąć ww. niekorzystnych skutków dominacji ALA i LA.

Podsumowując, poprzez zastosowanie mieszanki olejów słonecznikowego i lnianego jako źródła tłuszczu w paszy można uniknąć niekorzystnej dla sandacza dominacji kwasu ALA i LA w diecie. Analiza odporności humoralnej nie pozwoliła jednak wnioskować jednoznacznie o braku negatywnego wpływu żywienia taką paszą. Stwierdzono bowiem istotne różnice międzygrupowe w aktywności ceruloplazminy (Cp), lizozymu i gammaglobulin. Wyniki mogły sugerować, że różnice te wynikały z niskiego poziomu n-3 PUFA (wzrost aktywności Cp w grupie 100SFO) lub ilości ALA, LA przy jednocześnie niskiej zawartości EPA i DHA (wpływ na aktywność lizozymu w grupie 100LO). Jednakże porównując uzyskane wyniki z naszymi wcześniejszymi badaniami (Siwicki i in. 2006), w których ryby karmiono paszą z rybim źródłem tłuszczu, aktywność np. lizozymu we krwi sandacza we wszystkich grupach żywieniowych była ponad dwukrotnie niższa (zakres $21\text{--}32\text{ mg L}^{-1}$) niż w cytowanym eksperymencie (blisko 50 mg L^{-1}). Zastosowanie mieszanki olejów w paszach dla ryb może więc obniżać odporność humoralną i osłabiać mechanizmy obronne ryb. Wiedząc, że istnieje związek między n-3/n-6 diety a syntezą ikozanooidów (Bell i Sargent

2003) oraz mając udokumentowane wyniki wpływu dwóch różnych immunomodulatorów (syntetyczny i naturalny) na układ odpornościowy ryb hodowlanych w akwakulturze (Oliva-Teles 2012) za zasadne uznano wykorzystanie ich w diecie z olejami roślinnymi w celu ustalenia możliwości poprawy parametrów immunologicznych. Zainteresowanie budziły także przytoczone w ww. pracy doniesienia naukowe o korzystnym wpływie tych suplementów na przyswajalność nutrietów i tempo wzrostu ryb. Powyższe przesłanki skłoniły do przeprowadzenia kolejnego eksperymentu.

W kolejnym eksperymencie [pozycja 4.4; Kowalska A., Zakęś Z., Siwicki A.K., Terech-Majewska E., Jankowska B., Jarmołowicz S., Głabski E. **Impact of brewer's yeast extract and levamisole in diets with vegetable oils on the growth, chemical composition, and immunological and biochemical blood parameters of pikeperch (*Sander lucioperca*)**. Czech J. Anim. Sci. 2015, 60(11): 498–508, doi: 10.17221/8558-CJAS] za celowe uznano zweryfikowanie hipotezy, że dodatek dwóch różnych immunomodulatorów: syntetycznego (levamisol) i naturalnego (ekstrakt komórek drożdży) do paszy z olejami roślinnymi istotnie poprawi immunologiczne, hematologiczne i chemiczne parametry krwi sandacza oraz pozytywnie wpłynie na skład chemiczny ciała i wzrost ryb.

Oleje słonecznikowy i lniany mogą zastąpić tran w diecie sandacza i są dobrym źródłem energii metabolicznej, gdyż nie obniżają tempa wzrostu, współczynnika kondycji oraz efektywności wykorzystania takich pasz i nie powodują zmian w strukturze tkanki wątrobowej [pozycja 4.3]. Niemniej jednak zmieniają skład chemiczny tkanek ryb i ilość/aktywność związków pełniących ważne funkcje w układzie immunologicznym (Lin i Shiau 2007, pozycja 4.3). Wzbogacanie pasz w substancje, które stymulują układ odpornościowy może zabezpieczyć organizm przed negatywnymi skutkami modyfikacji ich diety, jakim jest obniżenie odporności ryb. Ponadto niektóre substancje w diecie, które aktywują procesy komórkowej i humoralnej odpowiedzi immunologicznej mogą też korzystnie zmienić wskaźniki podchowu (Oliva-Teles 2012).

Substancją syntetyczną stymulującą reakcje immunologiczne ryb jest levamisol (tetrahydro-2,3,5,6 phenylo-6 imidazo thiazol), który w ilości 250 lub 300 mg kg⁻¹ paszy podnosi odporność i tempo wzrostu karpia *Cyprinus carpio* i sumika *Clarias fuscus* (Gopalakannan i Arul 2006, Li i in. 2006). Naturalnym i innowacyjnym immunomodulatorem rozpowszechnianym ostatnio w hodowli zwierząt jako NuPro (Altach Inc., USA) jest z kolei ekstrakt pozyskany z wyselekcjonowanych linii komórkowych drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. W naszych pionierskich badaniach (Jarmołowicz i in. 2012, 2013) ustalono dawkę

(40 g NuPro kg⁻¹ paszy), która podnosi aktywność lizozymu, poziom gammaglobulin, aktywność fagocytów i makrofagów oraz odpowiedź limfocytów u młodocianego sandacza przetrzymywanego w RAS. Jak wskazują Li i Gatlin (2006) taki komponent diety korzystnie wpływa na asymilację i utylizację pozostałych nutrientów. Fakt ten mógłby mieć istotne znaczenie podczas modyfikacji diety polegającej zwłaszcza na zastępowaniu tranu czy mączki rybnej komponentami roślinnymi, o niższej strawności.

W związku z powyższym zbadano wpływ przetestowanych wcześniej dawek levamisolu i NuPro na wskaźniki podchowu i chemiczny skład ciała oraz parametry immunologiczne, hematologiczne i biochemiczne krwi sandacza, w którego diecie tran zastąpiono ustaloną **[pozycja 4.3]** mieszanką olejów słonecznikowego i lnianego (VO). Cztery grupy ryb żywiono paszą z tranem (69 g kg⁻¹ paszy; grupa FO) lub mieszanką olejów lnianego i słonecznikowego (69 g olejów kg⁻¹ paszy; grupa VO), które dodatkowo suplementowano levamisolem (0,3 g kg⁻¹ paszy; grupa LOR) lub NuPro (40 g kg⁻¹ paszy; NOR). Ryby karmiono 56 dni.

Testowane immunomodulatory w paszy z olejami roślinnymi wykorzystane w żywieniu sandacza nie wpłynęły na końcową masę ciała ryb, współczynnik K, FCR, VSI i HSI. Można przypuszczać, że potencjał wzrostu sandacza w systemach recyrkulacyjnych został osiągnięty, a dodane immunomodulatory do paszy z olejami roślinnymi przy zachowaniu rekomendowanej ilości tłuszczu, białka i węglowodanów nie decydują o tempie wzrostu sandacza.

Niższą zdolność bójczą makrofagów i proliferację limfocytów u sandacza powoduje deficyt EFA, a bardzo wysoki poziom n-3 PUFA w diecie działa immunosupresyjnie **[pozycja 4.3]**. Lin i Shiau (2007), Berge i in. (2009) podobny efekt tłumaczą z kolei konkurencją kwasów n-3 PUFA z kwasem arachidonowym (ARA, C20:4 n-6) o enzymy, która to osłabia syntezę leukotrienów i funkcje makrofagów. U sandacza odpowiednia mieszanka olejów roślinnych w paszy (zakres n3/n6 = 0,7-1,3) nie zaburza prawdopodobnie takiej biokonwersji PUFA, która osłabia odpowiedź immunologiczną ryb **[pozycja 4.3 i 4.4]**. W grupach VO i FO wskaźniki odporności komórkowej i humoralnej były podobne. Levamisol (0,3 g kg⁻¹ paszy) lub NuPro (40 g kg⁻¹ paszy) podawany w paszy z roślinnym źródłem tłuszczu silnie zastymulował aktywność fagocytów, proliferację limfocytów i istotnie podniósł poziom lizozymu oraz gammaglobulin u sandacza. W związku z tym rekomenduje się ich wykorzystanie w prewencji chorób ryb narażonych na czynniki stresogenne osłabiające ich odporność, tj. hodowanych w akwakulturze i karmionych paszą z olejami roślinnymi. Uzyskane dla Cp wartości (marker zmian patologicznych w narządzie wątroby i zaburzeń

metabolizmu lipidów u sandacza; Kowalska i in. 2010, 2011b) wskazują na efektywne i bezpieczne stosowanie testowanych suplementów.

Kwasy PUFA są podatne na utlenienie, a produkty ich oksydacji limitują wartość odżywczą i jakość nutrietów, zwłaszcza białek, witamin (Sargent i in. 2002). Komórki drożdży jako ważne źródło aminokwasów, nukleotydów, witamin (Oliva-Teles 2012) mogą więc suplementować dietę ryb narażonych na deficyty tych komponentów. W tym eksperymencie mogło się to manifestować np. najkorzystniejszymi parametrami biochemicznymi krwi ryb. Badania [pozycja 4.4] wykazały korzystny wpływ ekstraktu komórek drożdży na aktywność aminotransferazy asparaginowej (AST), alaninowej (ALT), fosfatazy alkalicznej (ALP) oraz poziom cholesterolu i bilirubiny. Dodatek immunomodulatorów nie miał z kolei wpływu na parametry hematologiczne.

Dotychczas nie udokumentowano wpływu immunomodulatorów w diecie ryb z olejami roślinnymi na metabolizm kwasów tłuszczowych mierzony składem chemicznym ich ciała. Podobne ilości poszczególnych kwasów tłuszczowych w ciele ryb w grupach VO, VOL i VON mogą wskazywać na brak wpływu levamizolu i NuPro na asymilację/akumulację kwasów tłuszczowych. Zbyt wysoka ilość kwasu oleinowego (C18:1 n-9), LA czy ALA w paszy może zmieniać aktywność lipogenez u ryb, nasilać procesy oksydacyjne i zaburzać metabolizm lipidów (Menoyo i in. 2007). U sandacza takie ograniczone wykorzystanie dostarczonego źródła tłuszczu wynikające z nadpodaży kwasów 18C manifestowało się fluktuacjami w zawartości lipidów w ciele ryb i wartościach wskaźników VSI i HSI (Kowalska i in. 2010, 2011b). W dwóch ostatnich eksperymentach [pozycja 4.3 i 4.4] takich różnic nie stwierdzono, co wiąże się najprawdopodobniej z zastosowaniem takiej mieszanki olejów roślinnych, która dostarczyła odpowiedniej ilości kwasów 18C.

Podsumowując, stwierdza się, że żywienie juwenalnego sandacza paszą z roślinnym źródłem tłuszczu o ustalonym wskaźniku n3/n6 i wzbogaconą o levamisol (0,3 g kg⁻¹ paszy) lub NuPro (40g kg⁻¹ paszy) istotnie podnosi immunologiczną odpowiedź komórkową i humoralną ryb. Biorąc pod uwagę ilość 18C PUFA w paszy z olejami roślinnymi i potencjalne negatywne skutki procesów oksydacyjnych dodatek ekstraktu komórek drożdży (NuPro) może stanowić cenne źródło pożądanых nutrientów. W grupie NOR uzyskano nie tylko najlepsze wskaźniki immunologiczne, ale także hematologiczne i biochemiczne krwi ryb. Pozytywny wpływ zwłaszcza NuPro w diecie sandacza może być powiązany z efektywną przemianą/wykorzystaniem nutrietów lub wzbogaceniem paszy o dodatkowe substancje. Nie wpływa to jednak na wskaźniki podchowu ryb i skład chemiczny ich ciała.

Ostatnia publikacja wchodząca w skład osiągnięcia naukowego [pozycja 4.5; Kowalska A., Kowalski R. The effect of cyclooxygenase (COX) inhibitors on Japanese medaka (*Oryzias latipes*) reproduction parameters fed feed with high level of arachidonic acid (20:4 n-6). *Aquac. Inter.* 2014, 22: 185–193] zakładała weryfikację hipotezy badawczej wiążącej bezpośredni wpływ kwasu ARA w diecie ze wzrostem i przeżywalnością ryb w początkowym etapie ontogenezy. Ocenie poddano potencjał oddziaływania ARA w obecności immunomodulatorów na aktywność enzymu cyklooksygenazy i jakość pozyskanego materiału.

Ilość kwasów tłuszczowych, zwłaszcza prekursorów (ALA i LA) kwasów HUFA (EPA, DHA, ARA) w paszy wpływa na jakość biologiczną młodocianych ryb, w tym stan zdrowotny i skład chemiczny tkanek [pozycja 4.1, 4.2, 4.3, 4.4]. W początkowym etapie ontogenezy i procesie rozrodu szczególnie istotny jest kwas arachidonowy ARA (Sargent i in. 2002, Bell i Sargent 2003). Pozytywny wpływ suplementacji paszy tym kwasem na organizm został już potwierdzony (Izoquirodo i in. 2001) lecz zależność ta mogła wynikać nie tyle z bezpośredniej zawartości ARA w diecie, a z jego biokonwersji do ikozanoidów (Furuita i in. 2003). Zasadniczym enzymem katalizującym taką biokonwersję ARA do ikozanoidów jest cyklooksygenaza. U medaki - gatunku modelowego zidentyfikowano dwa geny dla cyklooksygenazy 1 (konstytutywna COX1) i jeden dla cyklooksygenazy 2 (indukowana COX2) (Fujimori i in. 2011). Wiadomo, że substratem dla COX są HUFA, spośród których ARA odgrywa najważniejszą rolę, i że to ilość substratu dla cyklooksygenazy decyduje o jej aktywności i ekspresji genu tego enzymu (Fujimori i in. 2011).

Wcześniejsze badania własne pokazały, że immunomodulatory w diecie ryb zarówno te o działaniu supresyjnym jak i o działaniu stymulującym zaburzają jakość biologiczną tarlaków i rozwój ryb w początkowym etapie ontogenezy (Kowalska i in. 2011a). Istniejący w akwakulturze trend modyfikacji pasz i intensyfikacja produkcji wymusza ich suplementację w ekstrakty bogate w HUFA (Kowalska i Zakęś 2009) i immunomodulatory (Oliva-Teles 2012). Brak dostępnych informacji dot. wpływu immunomodulatorów i wysokiego udziału HUFA w diecie ryb na aktywność cyklooksygenazy i jakość materiału oraz wyniki wcześniej prowadzonych badań (pozycja 4.4, Kowalska i in. 2011a) skłoniły do przeprowadzenia kolejnego eksperymentu. Za celowe uznano zbadanie wpływu diety ryb z wysoką zawartością ARA i substancjami o odmiennym działaniu immunomodulującym na aktywność enzymu COX w wątrobie ryb oraz jakość materiału we wczesnym etapie ontogenezy. Ponadto

interesujące było, czy inhibitory COX1 lub COX2 (resveratrol i NS-398) mogą zniwelować korzystny wpływ wysokiej dawki ARA w paszy na jakość uzyskanego materiału.

Ze względu na dobrze poznaną biologię i udokumentowaną obecność genów enzymów COX1 i COX2, proste techniki przetrzymywania ryb i embrionów, przebieg i synchronizację tarła, promowaną zasadę 3R w planowaniu doświadczeń jako materiał badawczy wybrano medakę. Przemawiał za tym także aspekt ergonomiczny i ekonomiczny, głównie wykorzystanie mniejszej biomasy ryb i wynikającej z tego ilości kosztownych suplementów diety. Ważne było to, że medakę uznano za wzorowy gatunek modelowy w tego typu badaniach (Kinoshita i in. 2009). Ponadto fototermiczna stymulacja rozrodu tego gatunku sprzyja aplikacji uzyskanych wyników u rodzimych ryb hodowlanych, w tym nowych gatunków w akwakulturze.

Dojrzałe płciowo osobniki podzielono na cztery grupy, które żywiono paszą z wysoką zawartością kwasu arachidonowego (ARA, C20:4 n-6 w ilości 2% wszystkich kwasów tłuszczowych, grupa A) lub taką paszą suplementowaną resveratrolem (grupa AR) lub NS-398 (grupa ANS) w ilości 20 mg kg⁻¹ masy ciała dzień⁻¹. Grupę kontrolną stanowiły osobniki karmione komercyjną paszą dedykowaną dla gatunku i bez żadnej dodatkowej suplementacji (grupa C, ilość ARA równa 0,4% wszystkich kwasów tłuszczowych). Po dwóch tygodniach żywienia testowanymi paszami analizowano jakość tarlaków i gamet, a następnie jakość uzyskanego od nich potomstwa.

Kwas arachidonowy w paszy ryb (2%) i suplementacja immunomodulatorami o działaniu supresyjnym (NS-398) czy stymulującym (resveratrol) nie zmieniły udziału trących się ryb i płodności samic. Taki efekt obserwowano jednak, lecz po zastosowaniu wyższej dawki inhibitora COX i/lub inhibicji ukierunkowanej jednocześnie na obie izoformy enzymu COX (Flippin i in. 2007). Testowany w eksperymencie innowacyjny immunostymulator – resveratrol, podany w paszy, zadziałał podobnie jak immunosupresor (NS-398) istotnie obniżając przeżywalność embrionów i procent wyklucia pomimo wysokiego udziału ARA w diecie. Od tarlaków z grupy A uzyskano największy odsetek wyklutych larw. Ponadto po 2 tygodniach podchowu przeżywalność i masa ciała potomstwa ryb żywionych paszą z wysoką zawartością ARA, ale bez dodatku immunomodulatorów były istotnie najwyższe.

Potwierdzono, że wysoka ilość kwasu ARA w diecie może podnosić jakość podchowowanego materiału (Furuita i in. 2003), lecz należy uwzględnić obecność czynników zewnętrznych wykazujących inhibicje względem COX (Hong i in. 2007, Hashimoto i in. 2009), gdyż mogą one skutecznie zablokować stymulujący wpływ ARA na aktywność cyklooksygenazy [pozycja 4.5]. Nawet wysoka ilość ARA w diecie (2%), która u ryb istotnie

podnosi jakość materiału (Bell i Sargent 2003, Furuita i in. 2003) nie zrekompensowała supresyjnego oddziaływania immunomodulatorów względem COX [pozycja 4.5]. Korzystny wpływ tego kwasu w diecie będzie zależny od aktywności cyklooksygenazy warunkującej jego biokonwersję. Dlatego dodatek innowacyjnego immunomodulatora, tj. resveratrolu do paszy nie jest wskazany w przypadku hodowli stad tarłowych. Ponadto może on osłabić dobroczynny wpływ innych kosztownych suplementów (np. ekstraktów HUFA) wykorzystywanych w zmodyfikowanej diecie ryb w celu podniesienia efektów tarła/podchowu czy jakości larw.

Podsumowując stwierdza się, że jakość ryb w początkowym etapie ontogenezy można poprawić podnosząc zawartość ARA w paszy tarłakowej lecz kluczowa dla jakości biologicznej materiału jest wysoka aktywność enzymu biorącego udział w jego biokonwersji [pozycja 4.5]. Wysoka ilość kwasu arachidonowego podnosi aktywność enzymu cyklooksygenazy w wątrobie samic, co wiąże się z lepszą wydajnością rozrodczą tarłaków mierzoną wielkością i przeżywalnością potomstwa. Dodatkowa suplementacja paszy testowanymi immunomodulatorami obniża jakość biologiczną ryb w początkowym etapie ontogenezy i eliminuje korzystne oddziaływanie ARA [pozycja 4.5]. Uzyskane wyniki jakkolwiek mają charakter poznawczy, to mogą przyczynić się do modyfikacji zaleceń w komercyjnym żywieniu ryb. Obecnie w akwakulturze wykorzystuje się bowiem szereg substancji immunomodulujących w celu poprawy ich stanu zdrowotnego, przy czym dużym zainteresowaniem wśród suplementów cieszy się ostatnio resveratrol. Jakkolwiek stosowanie immunomodulatorów i prewencja wydaje się być lepszym rozwiązaniem niż stosowanie leków, to możliwości ich wykorzystania w akwakulturze, podobnie jak leków mogą być ograniczone. W kontekście uzyskanych wyników ten aspekt wydaje się szczególnie ważny.

Podsumowując wyniki badań opisane w pięciu artykułach naukowych wchodzących w skład osiągnięcia naukowego [pozycja 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5] stwierdza się, że ilość ARA w paszy decyduje o przeżywalności i wzroście ryb we wczesnym etapie ontogenezy, a ilość kwasów 18C o parametrach immunologicznych, hematologicznych i składzie chemicznym ich tkanek w kolejnych etapach wzrostu. Alternatywne dla tranu roślinne źródła tłuszczu w paszach dla ryb mogą ograniczać rozwój akwakultury ryb drapieżnych. Minimalizacja tego zjawiska jest możliwa poprzez zachowanie wysokiego poziomu ARA w diecie tarłaków, a w kolejnych etapach podchowu ryb poprzez dobór źródła tłuszczu mieszczącego się w odpowiednim zakresie n3/n6 i bez dominacji n-6 PUFA. Tak ukierunkowana modyfikacja kwasów tłuszczowych diety nie eliminuje niekorzystnych wskaźników odporności

humoralnej stadiów młodocianych. Rozwiązaniem jest suplementacja pasz z olejami roślinnymi immunomodulatorami, które podnoszą status zdrowotny ryb. Takie żywienie niweluje ryzyko wystąpienia chorób związanych z intensyfikacją produkcji i może przyczynić się do wyraźnego wzrostu wydajności akwakultury rodzimych gatunków ryb drapieżnych. Jednakże wykorzystanie immunomodulatorów może być ograniczone w przypadku hodowli tarlaków i larw ryb, gdyż mogą one hamować korzystny wpływ HUFA na jakość podchowyanego materiału. Rekomendowanie innowacyjnych immunomodulatorów w akwakulturze ryb karmionych paszą suplementowaną zwłaszcza drogimi ekstraktami HUFA będzie zasadne jedynie w przypadku stwierdzenia braku ich niekorzystnego wpływu na metabolizm kwasów tłuszczowych.

Bibliografia

- Bell J.G., Sargent J.R. 2003. Arachidonic acid in aquaculture feeds: current status and future opportunities. *Aquaculture* 218: 491–499.
- Berge G.M., Witten P.E., Baeverfjord G., Vegusdal A., Wadsworth S., Ruyter B. 2009. Diets with different n-6/n-3 fatty acid ratio in diets for juvenile Atlantic salmon, effects on growth, body composition, bone development and eicosanoid production. *Aquaculture* 296: 299–308.
- Burce M., Oyen F., Bell G., Asturiano J.F., Farndale B., Carrillo M., Zanuy S., Ramos J., Bromage N. 1999. Development of broodstock diets for the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) with special emphasis on the importance of n-3 and n-6 highly unsaturated fatty acids to reproductive performance. *Aquaculture* 177: 85–97.
- Burka J.F., Hammel K.L., Horsberg T.E., Johnson G.R., Rainnie D.J., Speare D.J. 1997. Drugs in salmonid aquaculture - a review. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 20(5): 333–49.
- Caballero M.J., Obach A., Rosenlund G., Montero G., Gisvold M., Izquierdo M.S. 2002. Impact of different dietary lipid sources on growth, lipid digestibility, tissue FA composition and histology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 214: 253–271.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) 2013. *Aquaculture in the third millennium*. FAO Fisheries and Aquaculture Department, Rzym, 243 s.
- Flippin J.L., Huggett D., Foran C.M. 2007. Changes in the timing of reproduction following chronic exposure to ibuprofen in Japanese medaka, *Oryzias latipes*. *Aquat. Toxicol.* 81: 73–78.
- Fujimori Ch., Ogiwara K., Hagiwara A., Rajapakse S., Kimura A., Takahashi T. 2011. Expression of cyclooxygenase-2 and prostaglandin receptor EP4b mRNA in the ovary of the medaka fish, *Oryzias latipes*: possible involvement in ovulation. *Mol. Cell. Endocrinol.* 332: 67–77.
- Furuita H., Yamamoto T., Shima T., Suzuki N., Takeuchi T. 2003. Effect of arachidinic acid levels in broodstock diet on larval and egg quality of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 220: 725–735.

- Gopalakannan A., Arul V. 2006. Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin, chitosan and levamisole on the immune system of *Cyprinus carpio* and control of *Aeromonas hydrophila* infection in ponds. *Aquaculture* 255: 179–187.
- Görgün S., Akpınar M.A. 2007. Liver and muscle fatty acid composition of mature and immature rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed two different diets. *Biologia* 62(3): 351–355.
- Hardy R.W., Barrows F.T. 2002. Diet formulation and manufacture. W: *Fish Nutrition* (Red. J.E. Halver, R. Hardy). Academic Press, San Diego, California: 505–600.
- Hashimoto S., Watanabe E., Ikeda M., Terao Y., Strussmann C.A., Inoue M., Hara A. 2009. Effects of ethinyl estradiol on medaka (*Oryzias latipes*) as measured by sperm motility and fertilization success. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 56: 253–259.
- Hong H.N., Kim H.N., Park K.S., Lee S.K., Gu M.B. 2007. Analysis of the effects diclofenac has on Japanese medaka (*Oryzias latipes*) using real-time PCR. *Aquat. Toxicol.* 67: 2115–2121.
- Ishikawa Y. 2000. Medaka fish as a model for vertebrate developmental. *Bioessays* 22: 487–495.
- Izhizaki Y., Masuda R., Uemastu K., Shimizu K., Arimoto M., Takeuchi T. 2001. The effect of dietary docosahexaenoic acid on schooling behaviour and brain development in larval yellowtail. *J. Fish Biol.* 58: 1691–1703.
- Izoquirodo M.S., Fernández-Palacios H., Tacon A.G.J. 2001. Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. *Aquaculture* 197: 25–42.
- Jankowska B., Zakęs Z., Żmijewski T., Szczepkowski M. 2003. A comparison of selected quality features of the tissue and slaughter yield of wild and cultivated pikeperch, *Sander lucioperca* (L.). *Eur. Food Res. Technol.* 217(5): 401–405.
- Jarmołowicz S., Zakęs Z., Siwicki A.K., Kowalska A., Hopko M., Głąbski E., Demska-Zakęs K., Partyka K. 2012. Effects of brewer's yeast extract on growth performance and health of juvenile pikeperch *Sander lucioperca* (L.). *Aquac. Nutr.* 18: 457–464.
- Jarmołowicz S., Zakęs Z., Siwicki A.K., Terech-Majewska E., Kowalska A., Partyka K., Hopko M. 2013. Immunomodulatory effect of dietary brewer's yeast extract in pikeperch (*Sander lucioperca* (L.)) juveniles against the challenge of *Aeromonas salmonicida*. *Aquac. Int.* 21, 939–945.
- Jobling M. 2001. Feed composition and analysis. W: *Food Intake in Fish* (Red. D. Houlihan, T. Boujard, M. Jobling). Blackwell Science Ltd, Oxford: 1–21.
- Kinoshita M., Murata K., Naruse K., Tanaka M. 2009. Medaka management. W: *Medaka. Biology, management, and experimental protocols* (Red. M. Kinoshita, K. Murata, K. Naruse, M. Tanaka). Wiley-Blackwell, USA: 31–65.
- Kowalska A., Kowalski R.K., Zakęs Z. 2011a. The effect of selective cyclooxygenase (COX) inhibitors on Japanese medaka (*Oryzias latipes*) reproduction parameters. *World Acad. Sci. Eng. Technol.* 77:19–23.
- Kowalska A., Zakęs Z. 2009. Nowe trendy w żywieniu ryb hodowlanych – możliwości zastosowania różnych źródeł lipidów. W: *Rozród, podchow, profilaktyka ryb łososiowatych i innych gatunków* (Red. Z. Zakęs, K. Demska-Zakęs, A. Kowalska, D. Ulikowski). Wyd. IRS, Olsztyn: 327–339.

- Kowalska A., Zakęś Z., Jankowska B. Siwicki A.K. 2010. Impact of diets with vegetable oils on the growth, histological structure of internal organs, biochemical blood parameters, and proximate composition of pikeperch *Sander lucioperca* (L.). *Aquaculture* 301: 69–77.
- Kowalska A., Zakęś Z., Jankowska B. Siwicki A.K. 2011b. Substituting vegetable oil for fish oil in pikeperch diets: The impact on growth, internal organ histology, blood biochemical parameters and proximate composition. *Aquac. Nutr.* 10.1111/j.1365-2095.2009.00744.x
- Li P., Gatlin D.M. 2006. Nucleotide nutrition in fish: current knowledge and future applications. *Aquaculture* 251: 141–152.
- Li G., Guo Y., Zhao D., Qian P., Sun J., Xiao C., Liang L., Wang H. 2006. Effects of levamisole on the immune response and disease resistance of *Clarias fuscus*. *Aquaculture* 253: 212–217.
- Lin Y-H., Shiau S-Y. 2007. Effects of dietary blend of fish oil with corn oil on growth and non-specific immune responses of grouper, *Epinephelus malabaricus*. *Aquac. Nutr.* 13: 137–144.
- Martins C.I.M., Edinga E.H., Verdegema M.C.J., Heinsbroeka L.T.N., Schneider O., Blanchetond J.P., Roque d'Orbecasteld E., Verretha J.A.J. 2010. New developments in recirculating aquaculture systems in Europe: A perspective on environmental sustainability. *Aquac. Eng.* 43(3): 83–93.
- Menoyo D., Lopez-Bote C.J., Diez A., Obach A., Bautista J.M. 2007. Impact of n-3 fatty acid chain length and n-3/n-6 ratio in Atlantic salmon (*Salmo salar*) diets. *Aquaculture* 267: 248–259.
- Montero D., Kalinowski T., Obach A., Robaina L., Tort L., Caballero M.J., Izquierdo M.S. 2003. Vegetable lipid sources for gilthead seabream (*Sparus aurata*): effects on fish health. *Aquaculture* 225: 353–370.
- NRC (National Research Council) 1993. *Nutrient Requirements of Fish*. National Academy Press, Washington, DC, 114 s.
- Nyina-Wamwiza L., Xu L.X., Blanchard G., Kestemont P. 2005. Effect of dietary protein, lipid and carbohydrate ratio on growth, feed efficiency and body composition of pikeperch *Sander lucioperca* fingerlings. *Aquac. Res.* 36: 486–492.
- Oliva-Teles A. 2012. Nutrition and health of aquaculture fish. *J. Fish Dis.* 35: 83–108.
- Orsavova J., Misurcova L., Ambrozova J.V., Vicha R., Mlcek J. 2015. Fatty acids composition of vegetable oils and its contribution to dietary energy intake and Ddependence of cardiovascular mortality on dietary intake of fatty acids. *J. Int. J. Mol. Sci.* 16: 12871–12890.
- Parpoura A.C.R., Alexis M.N. 2001. Effect of different dietary oils in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) nutrition. *Aquac. Int.* 9: 463–476.
- Ringø E., Song S.K. 2016. Application of dietary supplements (synbiotics and probiotics in combination with plant products and β -glucans) in aquaculture. *Aquac. Nutr.* 22(1): 4–24.
- Sargent J.R., Tocher D.R., Bell J.G. 2002. *The Lipids. W: Fish Nutrition* (Red. J.E. Halver, R. Hardy). Academic Press, San Diego, California: 182–246.
- Schulz C., Knaus U., Wirth M., Rennert B. 2005. Effects of varying dietary fatty acid profile on growth performance, fatty acid, body and tissue composition of juvenile pike perch (*Sander lucioperca*). *Aquac. Nutr.* 11: 403–413.

- Siwicki A.K., Zakęś Z., Fuller Jr J.C., Nissen S., Trapkowska S., Głąbski E., Kowalska A., Kazuń K., Terech-Majewska E. 2006. Influence of β -hydroxy- β -methylbutyrate on nonspecific humoral defense mechanisms and protection against furunculosis in pikeperch (*Sander lucioperca*). *Aquac. Res.* 37: 127–131.
- Stubhaugh I., Frøyland L., Torstensen B.E. 2005. β -oxidation capacity of red and white muscle and liver in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) – Effects of increasing dietary rapeseed oil and olive oil to replace capelin oil. *Lipids* 40:39–47.
- Turchini G.M., Torstensen B.E., Ng W.K. 2009. Fish oil replacement in finfish nutrition. *Rev. Aquac.* 1:10–57.
- Xu X.L., Kestemont P. 2002. Lipid metabolism and FA composition in tissues of Eurasian perch *Perca fluviatilis* as influenced by dietary fats. *Lipids* 37: 297–304.
- Zakęś 2009. Sandacz. Chów i hodowla. Wyd. IRS Olsztyn, 203 s.
- Zambiasi R.C., Przybylski R., Zambiasi M.W., Mendonca C.B. 2007. Fatty acid composition of vegetable oils and fats. *Zoologia (Curitiba)* 25: 111–120.

6. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Badania larw ryb

Początek mojej działalności naukowej dot. badań histologicznych rozwoju pęcherza pławnego larw sandacza *Sander lucioperca* prowadzonych w ramach pracy magisterskiej na ówczesnym Wydziale Ochrony Środowiska i Rybactwa (obecnie Wydział Nauk o Środowisku) Uniwersytetu Warmińsko - Mazurskiego w Olsztynie pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Krystyny Demskiej-Zakęś. Praca magisterska została wyróżniona, a jej wyniki opublikowane w czasopiśmie naukowym (**Załącznik 5, pozycja II.A. 2**). Studia ukończyłam w grupie 10% najlepszych absolwentów Wydziału.

Zatrudnienie w Instytucie Rybactwa Śródlądowego im. Stanisława Sakowicza w Olsztynie i uczestniczenie w realizacji tematu statutowego Instytutu pt. Akwakultura drapieżnych ryb jeziorowych (Nr 7/2001-2007), umożliwiło mi kontynuowanie badań dotyczących larw sandacza. W trakcie analiz histologicznych obserwowałam krytyczne okresy w rozwoju larw, co sprzyjało udoskonalaniu metod ich podchowu w RAS. Analizowałam rozwój układu pokarmowego w początkowym etapie ontogenezy ryb i zachodzące w nim zmiany w zależności od zadawanego pokarmu. Badałam wpływ żywienia larw na wzrost, przeżywalność i deformacje ciała (**Załącznik 5, pozycje II.A. 1, 7, 10, 16**). Uczestniczyłam w projektach badawczych dotyczących oceny skuteczności różnych technik pozyskiwania wylęgu i podchowu larw w celu zwiększenia ich przeżywalności (**Załącznik 5, pozycje II.A. 9, 17**). Zainteresowanie powyższą tematyką wynikało z rosnącego zainteresowania rybami okoniowatymi w akwakulturze i z trudności w podchowcie larw (np. obserwowanej wysokiej śmiertelności ryb w początkowym etapie ontogenezy, stwierdzanymi

deformacjami ciała, **Załącznik 5, pozycje II.A. 4**). Badania powyższe pokazały czas/zależność od diety formowania się kluczowych dla trawienia struktur komórkowych w przewodzie pokarmowym larw, uzasadniły konieczność żywienia dietą mieszaną (pokarm żywy + pasza komponowana) w celu uzyskania korzystnych wartości wskaźników podchowu larw i ustaliły niezbędny minimalny okres zadawania pokarmu żywego. Pokazały także, które z dostępnych wówczas komercyjnych pasz komponowanych są najbardziej odpowiednie dla wylęgu sandacza oraz jakie techniki usuwania błony powierzchniowej z basenów są skuteczne dla prawidłowego napełniania pęcherza pławnego u larw. Uzyskane wyniki prowadzonych badań miały charakter poznawczy i aplikacyjny, gdyż wskazały metody umożliwiające podniesienie efektów podchowu tego gatunku w akwakulturze. Obecnie moje naukowe zainteresowania dot. larw ryb są ukierunkowane na poszukiwania optymalnego dla nich pokarmu z uwzględnieniem zrównoważonego korzystania z zasobów naturalnych (**Załącznik 5, pozycja II.B. 24**).

Badania gamet ryb

Na początku mojej pracy naukowej w IRS w latach 2003-2008 uczestniczyłam, jako wykonawca w realizacji projektów badawczych finansowanych przez Komitet Badań Naukowych, w których materiałem doświadczalnym były między innymi gamety i embriony ryb drapieżnych (**Załącznik 5, pozycje VI.B. 5 i 6**). W tym czasie miałam także możliwość obserwowania rozwoju embrionalnego larw ryb i uczestniczenia w badaniach pozyskiwania wylęgu. Prowadzone wówczas obserwacje gamet, embrionów, tkanek ryb i zachodzące w nich zmiany pod wpływem czynników zewnętrznych (**Załącznik 5, pozycje II.A. 9, 11, 13, 14, 15**) dały podstawy do uczestniczenia w późniejszych, bardziej szczegółowych badaniach naukowych o podobnej tematyce oraz zapoczątkowały zainteresowania związane z jakością gamet i embrionów organizmów wodnych. W swojej pracy analizowałam zmiany w komórkach krwi ryb poddanych procesowi triploidyzacji (**Załącznik 5, pozycje I.B. 9**) oraz brałam udział w obserwacjach rozrodu i pobieraniu gamet koralowców na Okinawie w Sesoko Station, University of the Ryukyus (Japonia) (**Załącznik 5, pozycje I.B. 10**).

Interesującym dla mnie zagadnieniem było i jest uzyskanie informacji nt. wpływu żywienia ryb na jakość podchowowanego materiału. Początkowo badania te dotyczyły wpływu diety tarlaków na jakość gamet (**Załącznik 5, pozycje II.A. 12**). Pozwoliły one ustalić zakres różnic pomiędzy składem chemicznym ikry pozyskanej od tarlaków dzikich i hodowlanych oraz żywionych pokarmem naturalnym i paszą sztuczną. Analizie poddany został także skład chemiczny ciała ryb. W badaniach tych wykazano labilność kwasów

tluszczowych w tkankach pod wpływem środowiska i żywienia. W ciągu mojej dalszej pracy naukowej korzystałam z aktualnych doniesień o jakości gamet ryb dzikich oraz hodowanych w akwakulturze, mierzonej także jakością larw. Wymiernym osiągnięciem tej aktywności są artykuły przeglądowe w monografiach (**Załącznik 5, pozycje II.B. 18, 21**), realizacje zadań w projekcie o charakterze wdrożeniowym (**Załącznik 5, pozycja VI.B. 2**) i aplikowanie o projekt badawczy własny (**Załącznik 5, pozycja VI.A. 1**).

Badania z udziałem gatunku modelowego

Otrzymanie środków finansowych przez MNiSW na zrealizowanie własnego projektu badawczego (**Załącznik 5, pozycja VI.A. 1**) pozwoliło mi na prowadzenie szczegółowych badań dot. żywienia, rozrodu i jakości gamet na gatunku modelowym ryb (medaka *Oryzias latipes*). W latach 2007-2008 przebywając w Japonii (Misaki Marine Biological Station, The University of Tokyo) miałam okazję zaobserwować metody badań nt. wpływu inhibitorów cyklooksygenazy (COX) na syntezę prostaglandyn u medaki. Tamte spostrzeżenia skłoniły mnie do podjęcia próby prowadzenia podobnych doświadczeń w IRS w Olsztynie.

Innowacyjnym przedsięwzięciem badawczym było nawiązanie współpracy z Japonią (National Institute for Basic Biology, National Institute of Natural Science, Nishigonaka, Okazaki) i prowadzenie badań na wyselekcjonowanej linii, jedynej wówczas w Polsce gatunku tj. medaka rekomendowanego w projektowaniu tego typu doświadczeń (**Załącznik 5, pozycje II.B. 9, 13**). Jako kierownik projektu odpowiedzialna byłam za wykonanie zadań i rozwiązanie problemu badawczego dot. znaczenia kwasu arachidonowego i aktywności enzymów biorących udział w jego przemianach (COX1 i COX2) na jakość pozyskiwanego materiału. Planowane badania stanowiły wówczas kontynuację wcześniejszych doświadczeń żywieniowych z wykorzystaniem pasz z różną jakością lipidów (**Załącznik 5, pozycje I.B. 2, 3, 4, IIA. 12, 18, 20, 21, II.B. 1**). Na tym etapie mojej aktywności naukowej, posiadając już wyniki wcześniejszych badań, zasadne stało się określenie wpływu diety z różną ilością kwasu arachidonowego, a następnie immunomodulatorów działających na enzymy biorące udział w biokonwersji ARA na wydajność rozrodczą tarlaków, aktywność ww. enzymów w wątrobie, strukturę histologiczną wątroby, śledziony, jelita oraz gonad, uwzględniając przebieg procesu oogenezy i spermatogenezy, częstotliwości rozrodu samic, parametry ruchu plemników, ilość i wielkość składanej ikry, przeżywalność embrionów, procent wyklucia, udział samic i samców w potomstwie. Testowanie wpływu różnego poziomu kwasu ARA w diecie ryb na ww. parametry podchowu stało się możliwe na gatunku modelowym. W badaniach stwierdziłam, że wzrost ilości ARA w diecie tarlaków (zakres 0,4-2,3% zawartości

wszystkich kwasów tłuszczowych) podnosi aktywność enzymu COX1 w wątrobie, ilość komórek pozytywnych dla COX2 w jajnikach, ruchliwość plemników oraz przeżywalność i wielkość ich potomstwa. Najlepsza dla poprawy jakości potomstwa tarlaków okazała się pasza, w której ilość ARA wyniosła 2,3% udziału wszystkich kwasów tłuszczowych diety (**Załącznik 5, pozycja VIII.A 5**). Gatunek modelowy jako materiał doświadczalny pozwolił też na testowanie w eksperymentach innego drogiego suplementu, tj. resveratrolu, który wówczas zaczynał się cieszyć zainteresowaniem jako silny antyutleniacz i immunostymulator w żywieniu zwierząt i ludzi. Te pionierskie badania z udziałem medaki wykazały, że immunomodulatory będące inhibitorami COX w diecie ryb w dawce 20 mg kg⁻¹ masy ciała dzień⁻¹, w okresie tarła powodują spadek odsetka trących się samic, dojrzałych oocytów w jajnikach, jakości nasienia mierzoną parametrami ruchu plemników za pomocą komputerowej analizy obrazu (z ang. *Computer Assisted Sperm Analysis* CASA) i przeżywalności ich potomstwa (**Załącznik 5, pozycje II.B. 4**). Osiągnięciem naukowym było udokumentowanie pozytywnego wpływu resveratrolu na stan zdrowotny tarlaków mierzony wzrostem odpowiedzi immunologicznej tj., aktywnośció bójczą fagocytów i proliferacją limfocytów, w zależności od testowanej dawki (zakres 0-80 mg kg⁻¹ masy ciała dzień⁻¹). Potwierdzono jednocześnie niekorzystne jego oddziaływanie na jakość potomstwa i wykazano inhibicję enzymów COX (**Załącznik 5, pozycja VIII.A. 6**; publikacja przyjęta do druku w **Fish Physiology and Biochemistry**). Analizy immunologiczne mogłam prowadzić dzięki nawiązanej wcześniej bardzo dobrej współpracy z Panem prof. dr hab. Andrzejem Krzysztofem Siwickim i z Wydziałem Medycyny Weterynaryjnej UWM w Olsztynie.

Sukcesem w powyższym przedsięwzięciu było na początku opanowanie technik rozrodu, pozyskiwania produktów płciowych, inkubacji ikry, podchowu larw, stadiów młodocianych oraz osobników dorosłych medaki - gatunku nieuczestniczącego dotychczas w badaniach w Polsce. Sprowadzony z Japonii materiał doświadczalny posłużył do przeprowadzenia innowacyjnych badań, a uzyskane z udziałem medaki wyniki zaprezentowano w artykułach oraz referatach i posterach na konferencjach krajowych i zagranicznych. Kolejnym etapem było upowszechnianie medaki jako materiału badawczego i związane z tym osiągnięcia w zakresie popularyzacji nauki, w dydaktyce i organizacyjne (**pkt.7**). Zdobyte doświadczenie naukowo-badawcze z udziałem tego gatunku modelowego pozwala ostatecznie za porozumieniem z National Institute for Basic Biology, na jego udostępnianie, co przyczynia się do propagowania w nawiązywaniu podobnej współpracy japońsko-polskiej w innych ośrodkach badawczych.

Badania wskaźników podchowu i jakości mięsa ryb

Moja aktywność naukowa od początku pracy w IRS skupiona była na ocenie i poprawie jakości podchowowanego materiału w akwakulturze. Brałam udział w badaniach hematologicznych i biochemicznych krwi sandacza hodowanego w systemach recyrkulacyjnych (**Załącznik 5, pozycje II.A. 3, 24**) oraz dot. wpływu technicznych parametrów basenów podchowowych, zagęszczenia obsad i sortowania ryb, częstotliwości ich karmienia i granulacji paszy na wskaźniki podchowu tego gatunku (**Załącznik 5, pozycje I.A. 3; II.A. 5, II.B. 5, 15, 25**). Aktywnie uczestniczyłam w projektach dotyczących wpływu warunków środowiskowych i pokarmu na cechy użytkowe ryb, tj. wydajność mięsną i wartość dietetyczną filetów (**Załącznik 5, pozycja II.A. 6, 8**). Dowiedziono w nich np., że stosowanie pasz komponowanych w intensywnych hodowlach suma europejskiego *Silurus glanis* pozytywnie zmienia skład chemiczny mięsa tych ryb. Stwierdzono także, że łączna zawartość kwasów nasyconych (SFA) i nienasyconych (MUFA i PUFA) w mięsie ryb z chowu intensywnego (ryby karmione komercyjną paszą granulowaną) i pozyskanych ze stawów (ryby odżywiające się pokarmem naturalnym) jakkolwiek jest zbliżona, to znaczne różnice dotyczą zawartości poszczególnych kwasów tłuszczowych istotnych dla konsumenta. Ilość kwasów tłuszczowych EPA, DHA w mięsie sumów z chowu intensywnego była zdecydowanie wyższa. Mięso tych ryb charakteryzowało się też korzystniejszym wskaźnikiem n-3/n-6 (3,9) w odniesieniu do ryb odłowionych ze stawów (2,3). Ponadto u sumów odżywiających się pokarmem naturalnym części grzbietowa i brzuszna fileta różniły się zawartością kwasów tłuszczowych nasyconych i nienasyconych wyrażoną w mg na 100 g fileta. Intensywne żywienie paszą sztuczną i wzrost ilości tłuszczu w obu częściach fileta niwelowało takie różnice. Z punktu widzenia konsumenta cały filet suma, lecz żywionego paszą komercyjną stanowi jednolite źródło cennych kwasów tłuszczowych.

W tym czasie brałam także udział w analizach porównawczych jakości odżywczej, właściwości organoleptycznych i wydajności rzeźnej dzikiego i hodowlanego okonia *Perca fluviatilis* (**Załącznik 5, pozycje I.A. 4**) oraz suma europejskiego żywionego pokarmem naturalnym i paszą sztuczną (**Załącznik 5, pozycje I.A. 5**). Badania te wykazały, że okoń hodowlany ma znacząco niższą wydajność rzeźną wynikającą z kumulowania tłuszczu w trzewiach, mierzonego wskaźnikami trzewiowo- i wątrobowosomatycznym oraz otluszczeniem okołojelitowym. Żywienie paszą komercyjną okoni również podnosi znacząco zawartość tłuszczu w ich mięsie. Z kolei żywienie paszą komercyjną suma europejskiego nie zmieniło biometrycznych parametrów ciała ryb, w tym wydajności rzeźnej (uzyskiwanego

filetu i tuszy), ale podobnie jak u okonia podniosło ilość tłuszczu w filecie względem ryb odławianych ze stawów ziemnych, które odżywiały się pokarmem naturalnym. Ciekawym wnioskiem z tych badań były różnice we właściwościach fizykochemicznych mięsa (barwa, pH, wodochłonność) ryb dzikich lub żerujących na pokarmie naturalnym względem ryb intensywnie karmionych paszą komercyjną. W kolejnych latach uczestniczyłam w pomiarach cech użytkowych, wydajności rzeźnej oraz wielkości i współczynników gonado- i trzewiosomatycznych samic i samców sandacza podchowyanego w systemach recyrkulacyjnych (**Załącznik 5, pozycje II.B. 6, 17**) oraz biometrycznych wskaźników karasia *Carassius carassius* (**Załącznik 5, pozycje I.B. 8, II.B. 2**). Powyższe osiągnięcia naukowo-badawcze były możliwe dzięki pracy zespołu Zakładu Akwakultury i Katedry Technologii i Chemii Mięsa Wydziału Nauk o Żywności UWM w Olsztynie. Z kolei współpraca z Instytutem Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie pozwoliła na kontynuację badań z udziałem ryb łososiowatych i branie udziału w przedsięwzięciach naukowych dot. wydajności rozrodczej pstrąga tęczowego (*Oncorhynchus mykiss*, pstrąga potokowego *Salmo trutta* m. *fario*, pstrąga źródlanego *Salvelinus fontinalis*, palii alpejskiej *Salvelinus alpinus* (**Załącznik 5, pozycje II.B. 14**).

Suplementy w diecie ryb

Jednymi z pierwszych eksperymentów w jakich uczestniczyłam w początkach mojej pracy zawodowej były badania stanu zdrowotnego ryb po suplementacji paszy sandacza immunomodulatorami (**Załącznik 5, pozycja I.A. 1, 2**). Zdobyte na początku pracy naukowej doświadczenie metodyczne dotyczące suplementacji pasz, komputerowej analizy obrazu, a w późniejszym okresie biochemicznych i chemicznych parametrów tkanek pozwoliło mi i nadal umożliwia współudział i prowadzenie badań, które mogą być przydatne dla akwakultury (**Załącznik 5, pozycja I.B. 1, 5, 6, 7**). Prewencja chorób poprzez suplementację diety ryb ma bowiem uzasadnienie ze względu na podatność organizmów na infekcje podczas intensyfikacji produkcji i stale rosnącej tendencji ograniczania w hodowli zwierząt środków leczniczych. W pracach badawczych związanych z tym zagadnieniem testowane były naturalne substancje immunomodulujące, takie jak zioła lecznicze, β -hydroksy- β -metylomaślan (HMB, produkt przemiany aminokwasu leucyny), a później glukany pozyskiwane z komórek drożdży, w formie komercyjnych preparatów, takich jak MacroGard i NuPro.

W 2006 roku w ramach umowy międzyrządowej: Porozumienie o Współpracy Naukowej i Technicznej między Rzeczpospolitą Polską a Republiką Węgierską

uczestniczyłam w realizacji projektu badawczego (**Załącznik 5, pozycja VI.B. 7**), który umożliwił mi zapoznanie się z metodami pracy w Research Institute for Fisheries, Aquaculture and Irrigation w Szarvas. We wspólnie prowadzonych badaniach wykorzystano azjatyckie zioła lecznicze: *Astragalus radix* i *Lonicera japonica* jako suplementy diety sandacza. Znane one są w medycynie ludzkiej, a ich wpływ na wzrost odpowiedzi immunologicznej potwierdzono w hodowli organizmów wodnych. W badaniach, w których uczestniczyłam analizowano wzrost, skład chemiczny ciała, w tym zawartość kwasów tłuszczowych w mięsie i trzewiach oraz prowadzono histologiczne obserwacje wątroby i jelita ryb żywionych paszą wzbogacaną ww. ziołami (**Załącznik 5, pozycja I.A. 7**). Prowadzone przeze mnie pomiary wielkości hepatocytów i ich jąder, stopnia wakuolizacji komórek wątroby, enterocytów i ich jąder, wielkości przestrzeni nadjądrowej komórek nabłonkowych jelita wykazały istotny wpływ dodatku ww. suplementów do paszy na morfometrię wątroby i jelita sandacza. Towarzyszyły temu zmiany we współczynniku wątrobowosomatycznym, zawartości tłuszczu i kwasów nasyconych w trzewiach ryb. Ciekawym spostrzeżeniem były różnice w zawartości nienasyconych kwasów tłuszczowych z szeregu n-3, tj. kwasu ikozatetraenowego (ETA, C20:4 n-3) i kwasu dokozapentaenowego (DPA, C22:5 n-3) w mięsie oraz kwasu arachidonowego (ARA, C20:4 n-6) w trzewiach wywołane żywieniem paszą z dodatkiem ziół leczniczych. Sugerowało to, że zastosowane roślinne suplementy o działaniu immunostymulującym wpływają na metabolizm lipidów.

Eksperymenty, w których pasze suplementowane były immunomodulatorami dowiodły, że dawki HMB (50 mg kg⁻¹ paszy), MacroGard (1 g kg⁻¹ paszy) i NuPro (40 mg kg⁻¹ paszy) stymulowały niespecyficzną odpowiedź humoralną i komórkową odpowiednio po 4 – 8 tygodniach żywienia ryb (**Załącznik 5, pozycja I.A. 1, 2, I.B. 1, 5, 6, 7**). HMB i NuPro podniosły także odporność sandacza na infekcje bakteryjne, mierzoną spadkiem śmiertelności po zakażeniu chorobotwórczą bakterią *Yersinia ruckeri* i *Aeromonas salmonicida* (**Załącznik 5, pozycja I.A.1, 2, I.B. 5, 6, 7**). Podczas testowania NuPro w diecie sandacza analizie poddano morfometrię jelita i wątroby oraz biochemiczne parametry krwi. Wielkość przestrzeni nadjądrowej komórek nabłonka jelitowego i korzystniejsze wartości aminotransferazy asparaginowej (AST) i alaninowej (ALT) we krwi sandacza żywionego paszą z NuPro wskazywały na wzrost aktywności absorpcyjnej enterocytów i korzystny wpływ ekstraktu komórek drożdży na funkcjonowanie narządu wątroby.

Ilość i jakość tłuszczu w diecie sandacza

W latach 2006-2008 po uzyskaniu środków finansowych MNiSW na realizację projektu badawczego promotorskiego pt. „Wpływ żywienia na efekty podchowu juwenalnego sandacza, *Sander lucioperca* (L.)” (**Załącznik 5, pozycja VI.B. 4**) pod kierunkiem Pana prof. dr hab. Zdzisława Zakęsia przeprowadziłam po raz pierwszy szeroko zakrojone badania żywieniowe z udziałem juwenalnego sandacza, w którego diecie tran zastępowano olejami roślinnymi. Nawiązana wcześniej bardzo dobra współpraca z Katedrą Chemii Mięsa WNoŻ UWM, Katedrą Ichtiologii WNoŚ oraz Zakładem Patologii i Immunologii Ryb IRS, pozwoliła na prowadzenie analiz: efektywności podchowu; wartości rzeźnej ryb; obserwacji histologicznych wątroby, jelita, śledziony; składu chemicznego podstawowego i zawartości kwasów tłuszczowych w całym ciele, filetach, trzewiach i wątrobie ryb oraz paszach eksperymentalnych; parametrów biochemicznych krwi ryb. Uzyskane wyniki umożliwiły mi przedstawienie rozprawy doktorskiej na podstawie której Rada Naukowa Instytutu Rybactwa Śródlądowego przyznała mi stopień naukowy doktora nauk rolniczych w dyscyplinie rybactwo. Rozprawa doktorska została wyróżniona i nagrodzona przez Dyrektora Instytutu Rybactwa Śródlądowego w Olsztynie. Wyniki eksperymentów opublikowano w 4 artykułach naukowych (**Załącznik 5, pozycja I.B. 2, 3, 4, II B.1**).

Podjęte wówczas badania były odpowiedzią na obserwowane otłuszczenie tkanek, obniżenie wartości niektórych wskaźników podchowu (tempa wzrostu, współczynnika kondycji, wartości rzeźnej), dysfunkcję narządów wewnętrznych sandacza (szczególnie wątroby) – gatunku cieszącego się zainteresowaniem w akwakulturze. Modyfikacja diety pod kątem ilości i jakości lipidów stwarzała potencjalne możliwości kontrolowania udziału wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w mięsie ryb drapieżnych i w konsekwencji wzrostu jego wartości odżywczej. Wykorzystanie lipidów pochodzenia roślinnego w technologicznym procesie produkcji pasz dla ryb wciąż posiada wymierne znaczenie ekonomiczne i ekologiczne. Wiąże się ze stosowaniem tańszych źródeł energii metabolicznej, zredukowaniem zapotrzebowania na tran i ochroną naturalnych zasobów organizmów morskich. Cennym wnioskiem tych badań było wskazanie, że oleje roślinne mogą stanowić częściowy substytut tranu w paszy młodocianego sandacza, lecz kluczowe jest właściwe zbilansowanie zawartości kwasów tłuszczowych diety. Zaobserwowałam, że olej lniany i arachidowy powoduje spadek retencji tłuszczu (ALR), niską wakuolizację komórek wątrobowych, kariolizę jąder hepatocytów i ich pyknozę, miejscowe złuszczenie nabłonka jelitowego oraz wyższą aktywność aminotransferazy AST i ALT, ceruloplazminy oraz

wyższą zawartość bilirubiny we krwi ryb. Badania te pokazały, że aktywność enzymów ALT, AST może być wykorzystywana jako marker diagnozowania dysfunkcji fizjologicznych organizmu sandacza wywołanych niewłaściwie skomponowaną dietą i że cechą charakterystyczną tego gatunku, poddanego modyfikacji żywienia jest większe nagromadzenie złogów brązowo - czarnego pigmentu w zrębie śledziony. Wiadomo już było, że olej arachidowy w paszy sandacza przyczynia się do znaczącego wzrostu kwasów jednonienasyconych (MUFA) i obniżenia wskaźnika n3/n6 we wszystkich tkankach. Podobnie jak olej lniany powoduje spadek zawartość kwasów EPA i DHA w całym ciele ryb. Ich dominacja jako źródła tłuszczu w paszy wysokoenergetycznej (19% tłuszczu) nie jest wskazana, jakkolwiek w przypadku oleju lnianego bogatego w prekursor dla HUFA, pewien jego udział mógłby przynieść pozytywne rezultaty w żywieniu sandacza. Na podstawie prowadzonych badań można było wykazać też, że żywienie sandacza paszą o wysokiej zawartości tłuszczu (zakres 6-18%) decyduje o udziale procentowym i/lub masie części ciała (tusza, ryba patroszona i odgłowiona, filet odskórzony, płetwy, głowa, kręgosłup) przez co obniża wartość rzeźną ryb.

Po uzyskaniu stopnia doktora kontynuowałam badania dot. kwasów tłuszczowych w diecie na jakość ryb. W żywieniu paszą z olejami roślinnymi wykorzystywałam poznane przeze mnie we wcześniejszych badaniach suplementy o charakterze immunomodulującym. Posiadając doświadczenie w podchowcie i rozrodzie gatunku modelowego poszerzyłam analizy wpływu zmodyfikowanej diety na wczesne etapy ontogenezy oraz wzajemny wpływ ikozanoidów/immonomodulatorów na aktywność wybranych enzymów biorących udział w metabolizmie kwasów tłuszczowych. Uzyskane osiągnięcie naukowe stało się podstawą wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego.

Aspekt ekologiczny prowadzonych badań

W zdobywaniu osiągnięć naukowo-badawczych z udziałem ryb wpisane było śledzenie statusu ekologicznego gatunków oraz znajomość nowoczesnych, przyjaznych środowisku technologii ich produkcji, w tym zrównoważonego korzystania z zasobów naturalnych (**Załącznik 5, pozycja II.A. 19, II.B. 7, 8, 16**). W latach 2011-2015 zaangażowana byłam w prace projektu, którego celem było zwiększenie populacji ryb drapieżnych w środowisku naturalnym, jako wykonawca dwóch zadań dot. rozrodu i wychowu oraz znakowania materiału (**Załącznik 5, pozycja VI.B. 3**). Za szczególnie cenne uznaję poznanie metod i nabyte doświadczenie w znakowaniu materiału przeznaczonego do zarybień wód otwartych (**Załącznik 5, pozycja II.B. 19, 26**). W trakcie realizacji badań

mogłam zapoznać się ze skutecznością stosowanych metod znakowania u różnych grup wielkości szczupaka i sandacza oraz efektywnością zarybień tymi gatunkami (**Załącznik 5, pozycja I.B. 11, II.B. 20**). Ważnym elementem tego typu badań były analizy wzrostu i przeżywalności znakowanych ryb (**Załącznik 5, pozycja II.B. 3, 12**).

W tym czasie zaangażowana byłam także w realizację zadań dot. wpływu żywienia na rozród ryb projektu Polskiej Akademii Nauk, w którym testowano innowacyjną metodę pozyskiwania ikry i analizowano jakość gamet i dobrostan tarlaków (**Załącznik 5, pozycja VI.B. 2**). To doświadczenie poszerzyło dotychczas zdobytą wiedzę i pozwoliło zapoznać się z najnowszymi trendami w żywieniu i rozrodzie ryb łososiowatych i działaniami podejmowanymi na rzecz aktywnej ochrony gatunków ryb jesiotrowatych (**Załącznik 5, pozycja II.B. 22, 23**). Za szczególnie cenne uznaję możliwość kontaktu z producentami tych ryb oraz możliwość redagowania monografii i materiałów konferencyjnych o charakterze naukowym i szkoleniowym (**Załącznik 5, pozycja XV. 7, 8, 9, 11**), które łączą i implikują rozwój wiedzy z praktyką.

7. Omówienie osiągnięć w zakresie popularyzacji nauki, organizacyjnych i dydaktycznych

Za najważniejsze w swojej działalności dot. popularyzacji nauki i organizacyjnej uważam prezentowanie doniesień naukowych na konferencji „Wylęgarnia” w latach 2003-2015 (**Załącznik 5, pozycja VII.B. 2, 3, 5-8, 10, VIII.B. 2, 3, 4, 6, 8, 9, 11-15**) i zaangażowanie w jej organizację od 2009 roku (**Załącznik 5, pozycja VIIIC.**). W latach 2010-2015 jako wykonawca projektu, którego celem było upowszechnianie wiedzy i propagowanie współpracy między przedstawicielami nauki i sektora rybackiego (**Załącznik 5, pozycja VI.B. 1**) uczestniczyłam w zorganizowaniu cyklu 6 konferencji (**Załącznik 5, pozycja VIIIC. 3-8; <http://wylegarnia.infish.com.pl/>**). W każdej z nich brało udział ponad 100 osób, w tym przedstawiciele praktyki rybackiej, Polskiego Związku Wędkarskiego, reprezentanci administracji państwowej (Regionalnych Zarządów Gospodarki Wodnej, Urzędów Marszałkowskich, Państwowej Straży Rybackiej), parków narodowych, wyższych uczelni (m.in. z Olsztyna, Lublina, Krakowa, Poznania, Warszawy, Szczecina), a także naukowcy z Polskiej Akademii Nauk oraz jednostek zagranicznych, w tym Instytutu Szarvas-Fish z Węgier i Służby Rybactwa przy Ministerstwie Rolnictwa Republiki Litewskiej. Za szczególnie cenne w tym okresie uważam udział w realizacji i upowszechnianiu filmów dydaktyczno-promocyjnych w ramach ww. projektu.

W 2008 roku byłam członkiem komitetu organizacyjnego szkolenia dot. rozrodu cennych gatunków ryb (**Załącznik 5, pozycja VIII.C. 1**). W kolejnym roku w ramach wykładów zaproszonych przeprowadziłam dwa wykłady i wycieczkę dydaktyczną w Zakładzie Akwakultury IRS dla studentów Wydziału Biologii UWM w Olsztynie (**Załącznik 5, pozycja XIII.A. 1, 2**). Wyróżnieniem było również wyznaczenie mojej osoby do zaprezentowania gatunku modelowego, na którym wówczas rozpoczynałam badania, w filmie dokumentalno-promocyjnym zrealizowanym z okazji jubileuszu IRS w 2010 roku. W 2015 roku zdobyte doświadczenie naukowo-badawcze pozwoliło mi na upowszechnianie medaki jako materiału badawczego w Międzynarodowym Instytucie Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie, który w efekcie nawiązał współpracę ze stroną japońską.

W ramach popularyzowania nauki prezentowałam doniesienia na Konferencji Szkoleniu Producentów Ryb Łososiowatych w latach 2008 i 2010 (**Załącznik 5, pozycja VIII.B. 7, 10**). W latach 2010, 2011 i 2013 zostałam zaproszona do przedstawienia w formie referatów swoich osiągnięć naukowo-badawczych początkowo na konferencji (akronim PNEUFISH), a następnie na warsztatach szkoleniowych z cyklu Wiedza i Rozwój Regionu (akronim REFRESH) organizowanych przez Polską Akademię Nauk (**Załącznik 5, pozycja VII.B. 9, XIII.A. 3, 4**). W 2015 roku zostałam zaproszona do wygłoszenia referatu na szkoleniu zorganizowanym przez Lokalną Grupę Rybacką (**Załącznik 5, pozycja XIII.A. 5**). Ostatnio, podczas Dni Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, w związku z zaproszeniem, wygłosiłam referat na jedynej konferencji naukowej w Polsce poświęconej hodowli i ochronie organizmów wodnych o przeznaczeniu akwarystycznym (**Załącznik 5, pozycja VII.B. 11**).

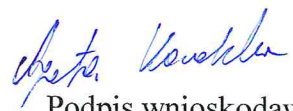
Od 2003 roku stale publikuję w czasopismach popularnonaukowych (**Załącznik 5, pozycja XIII.B**). W latach 2009-2015 byłam w zespole redakcyjnym 11 monografii, w tym 10 recenzowanych (**Załącznik 5, pozycja XV**). Współpracując z redakcjami 7 czasopism o zasięgu międzynarodowym z bazy JCR wykonałam recenzje kilkunastu oryginalnych publikacji eksperymentalnych (**Załącznik 5, pozycja XIV.A**). Recenzowałam także kilka prac naukowych w czasopismach krajowych (**Załącznik 5, pozycja XIV.B**). Od kilku lat jestem edytorem pomocniczym czasopisma Archives of Polish Fisheries (**Załącznik 5, pozycja XI**).

Podsumowując, brałam udział w realizacji 8 projektów badawczych (**Załącznik 5, pozycja VI**). Nawiązałam współpracę z National Institute for Basic Biology, National

Institute of Natural Science, Nishigonaka, Okazaki (**Załącznik 5, pozycja X.**). Wyniki badań prezentowałam w formie referatów (13) lub plakatów (18) na konferencjach międzynarodowych (7) i krajowych (16) (**Załącznik 5, pozycja VIII. A i B**).

W 2010 roku zostałam wyróżniona przez Fundację Członków Wydziału Nauk Rolniczych, Leśnych i Weterynaryjnych PAN wśród młodej kadry naukowej (**Załącznik 5, pozycja IX.**). Obecnie należę do dwóch towarzystw krajowych skupiających producentów ryb i naukowców pracujących ze zwierzętami laboratoryjnymi (**Załącznik 5, pozycja XII.**).

Lista **osiągnięć w pracy naukowo-badawczej, dydaktycznej i organizacyjnej** znajduje się w Załączniku 5 pt. „*Wykaz opublikowanych prac naukowych oraz informacja o osiągnięciach dydaktycznych, współpracy naukowej i popularyzacji nauki*”.



Podpis wnioskodawcy