



Mikrobiota jelitowa jako wskaźnik jakości siedlisk dzikich kopytnych: studium przypadku sarny europejskiej (*Capreolus capreolus*) w krajobrazie rolniczym

Rafał Łopucki¹, Ewa Sajnaga¹, Kinga Ożga¹, Dagmara Stępień-Pyśniak², Arkadiusz Jastrzębski⁵, Marcin Świątek³, Marta Kloch⁴, Ilona Sadok⁵, Paweł Nasiadka⁴, Petter Kjellander⁶, Daniel Klich⁴

¹Katedra Biomedycyny i Badań Środowiskowych, Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II, Konstantynów 1J, 20-708 Lublin, ²Katedra Prewencji Weterynaryjnej i Chorób Ptaków, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, ³Katedra Hodowli i Żywienia Zwierząt, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, ⁴Katedra Genetyki i Ochrony Zwierząt, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, ⁵Katedra Chemii, Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II, ⁶Grimso Wildlife Research Station, Department of Ecology, Swedish University of Agricultural Sciences, 73993, Riddarhyttan, Szwecja

WSTĘP

Jelita ssaków zasiedlane są przez tysiące gatunków mikroorganizmów, wspólnie określanych mianem mikrobioty jelitowej. Mikrobiota jelitowa pełni kluczową rolę w metabolizmie gospodarza poprzez regulację układu odpornościowego i zapewnianie ochrony przed patogenami. Jej skład jest dynamiczny i zależy zarówno od czynników wewnętrznych, takich jak stan fizjologiczny zwierzęcia, jak i zewnętrznych – w szczególności diety, ale także stresu środowiskowego. W warunkach naturalnych, stres wynikający z obecności drapieżników, zmian sezonowych czy działalności człowieka może wpływać na mikrobiotę pośrednio, poprzez mechanizmy fizjologiczne. Nadal brakuje wystarczających danych na temat zależności między stresem a mikrobiotą u dziko żyjących przeżuwaczy, mimo że mikroorganizmy jelitowe odgrywają kluczową rolę w pozyskiwaniu energii z materiału roślinnego. Dotychczasowe badania skupiały się głównie na gatunkach hodowlanych, natomiast informacje dotyczące wolno żyjących gatunków, takich jak sarna europejska (*Capreolus capreolus*), są nieliczne. Tymczasem sarna, powszechnie występująca w rolniczych krajobrazach Europy, może pełnić rolę czułego bioindykatora wpływu antropogenicznych stresorów na dziką faunę.

CEL: określenie związku pomiędzy poziomem stresu fizjologicznego (na podstawie metabolitów kortyzolu w kale) a składem mikrobioty jelitowej u wolno żyjących saren europejskich (*Capreolus capreolus*) zamieszkujących krajobrazy rolnicze w centralnej Polsce oraz identyfikacja grup bakterii, których obecność może wskazywać na podwyższony poziom stresu środowiskowego u dzikich przeżuwaczy.

METODYKA

1. POBRANIE PRÓBEK (Czas pobrania: od 15 maja do 15 stycznia 2022-2024)

Próbki kału (> 10 g) pobrano od saren z obszaru w centralnej Polsce, w województwie mazowieckim i łódzkim, na terenie 9 obwodów łowieckich, zlokalizowanych: **Rawa Mazowiecka (13), Węgrów (22) i Iłża (19)**. Łącznie uzyskano 41 próbek od samic i 13 próbek od samców.

2. Pomiar poziomów metabolitów kortyzolu w kale

Analizę wykonano przy użyciu komercyjnego zestawu **ELISA** 11-oxoetiocholanolone ELISA kit (Cayman Chemical) .

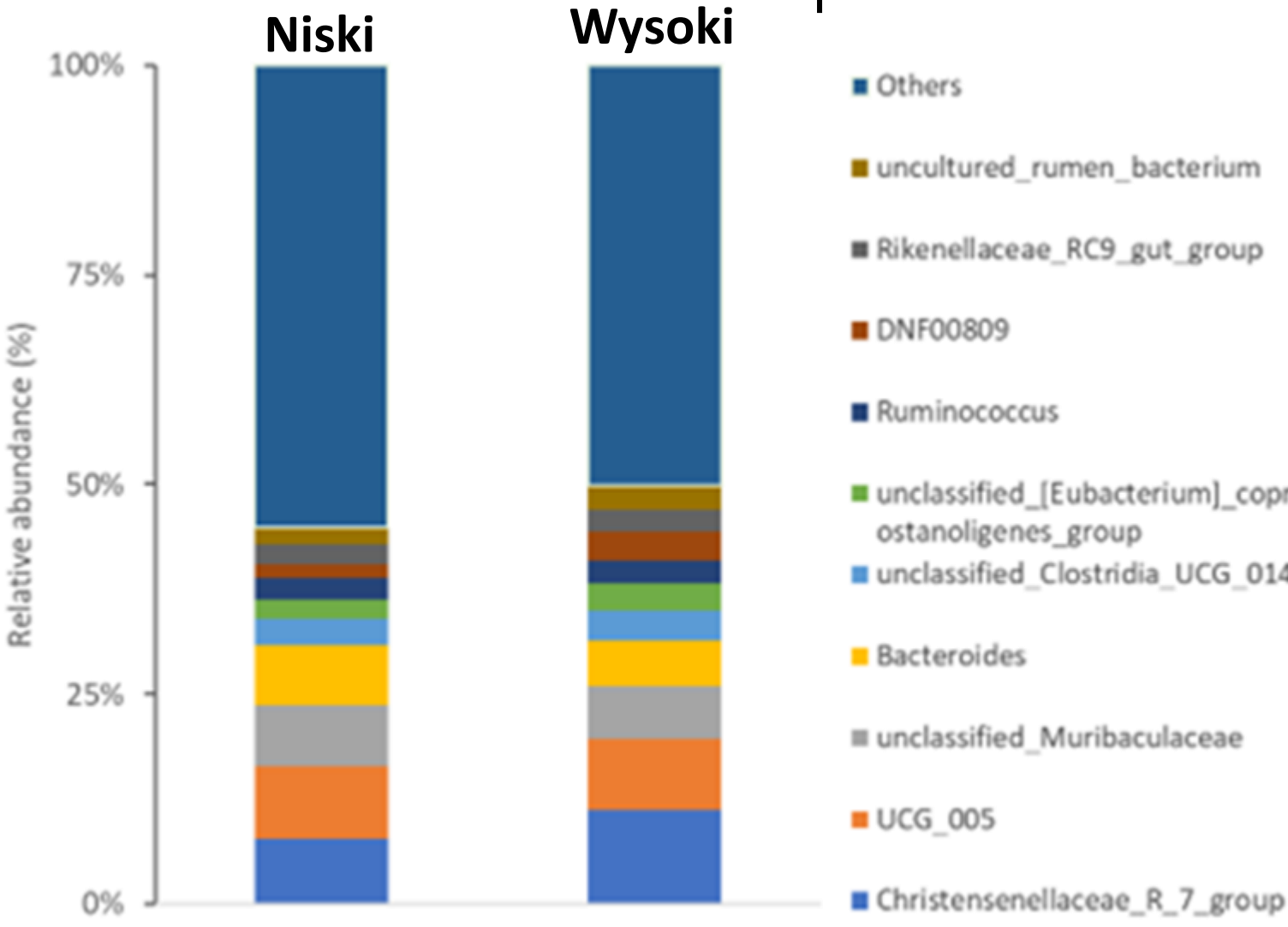
3. Izolacja DNA i sekwencjowanie jednostki 16S rRNA

DNA z próbek kału wyizolowano za pomocą PureLink Microbiome DNA purification Kit (Invitrogen). Skład mikrobioty bakteryjnej jelita myszy określono poprzez metabarkoding genu 16S rRNA (fragment V3-V4). NGS wykonano w technologii Illumina NovaSeq 6000 w firmie BMKgene.

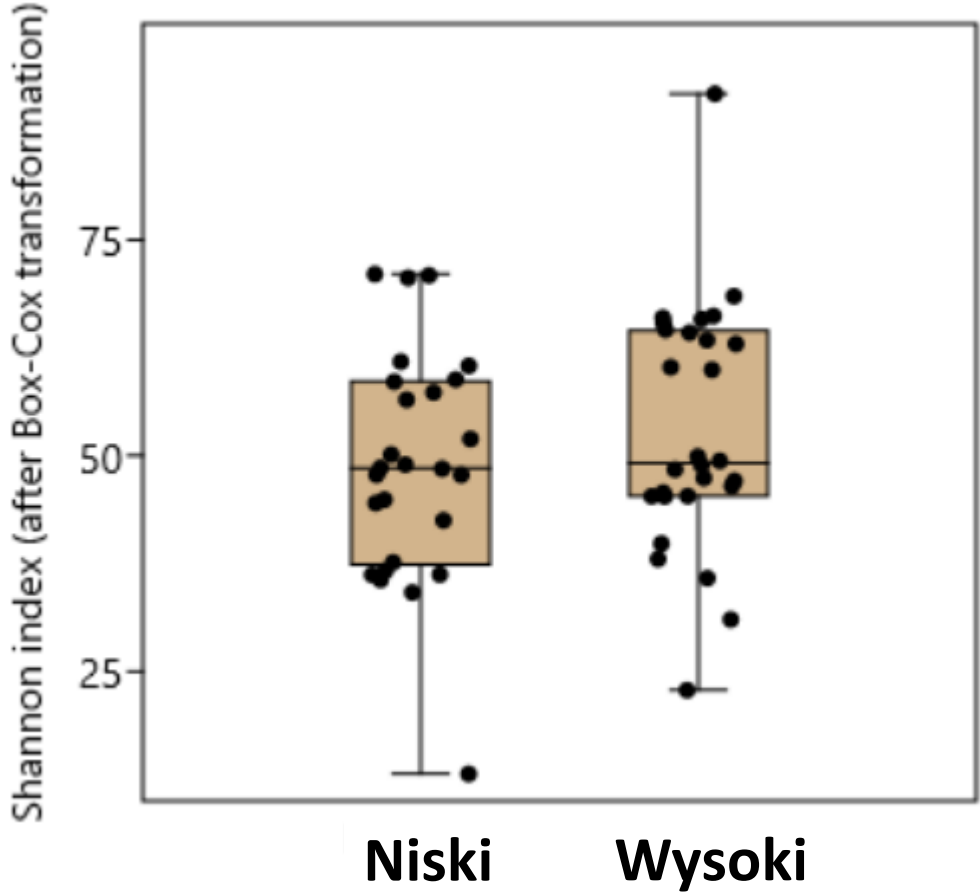
4. Analiza Bioinformatyczna

Analizę α i β bioróżnorodności mikrobioty przeprowadzono za pomocą programów: BMKCloud, Trimmomatic, Cutadapt, USEARCH, UCHIM, Qiime2. Analizę funkcjonalną i korelacji wykonano przy użyciu, odpowiednio, R, Past, TIBCO Statistica™ .

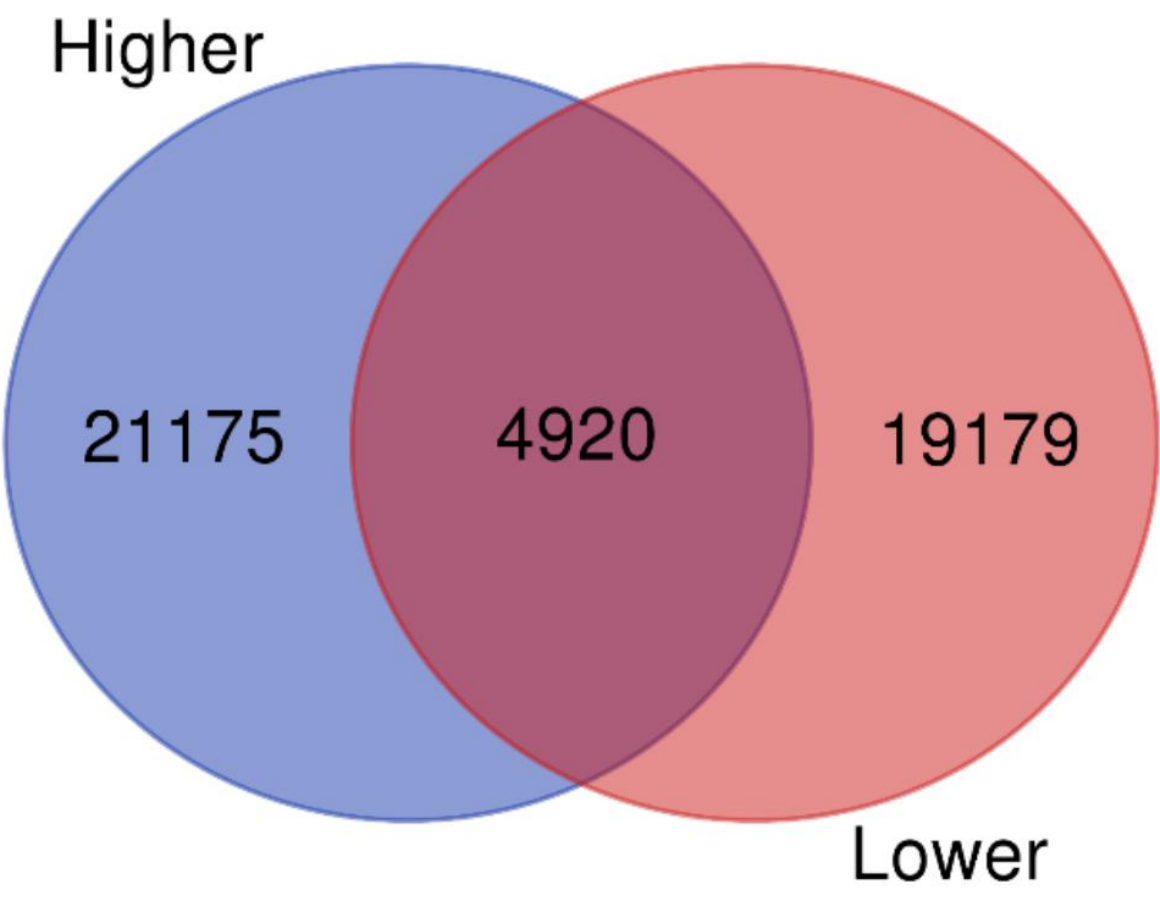
WYNIKI



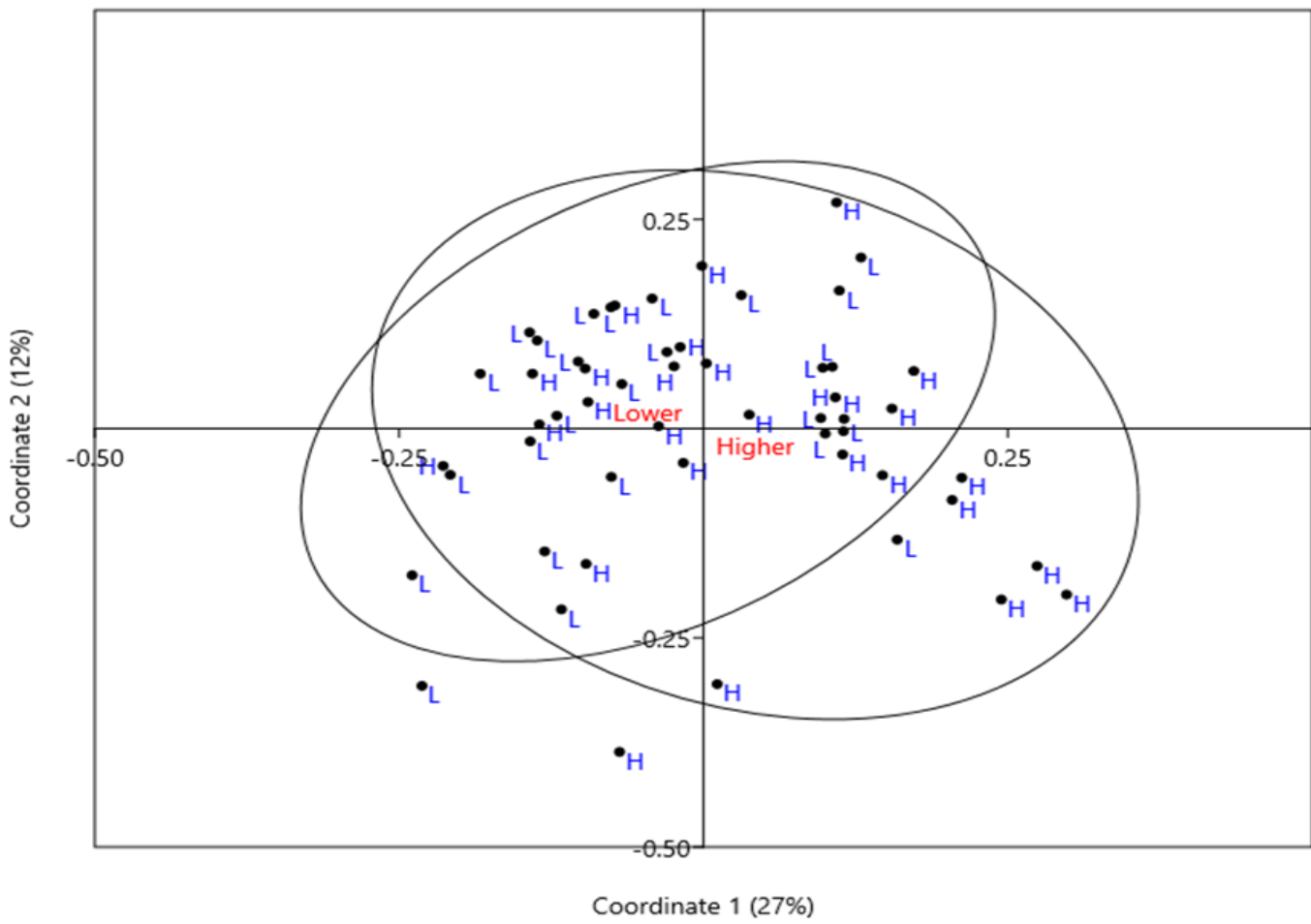
Rys 1. Względna liczebność 10 głównych taksonów bakterii na poziomie rodzaju Skróty: Niski – grupa o niskim stężeniu metabolitu kortyzolu, Wysoki – grupa o podwyższonym stężeniu metabolitu kortyzolu, odpowiednio N= 26 i N=28.



Rys2. Wskaźnik różnorodności alfa mikrobioty bakteryjnej saren z niskim i podwyższonym poziomem kortyzolu nie różnił się istotnie statystycznie.



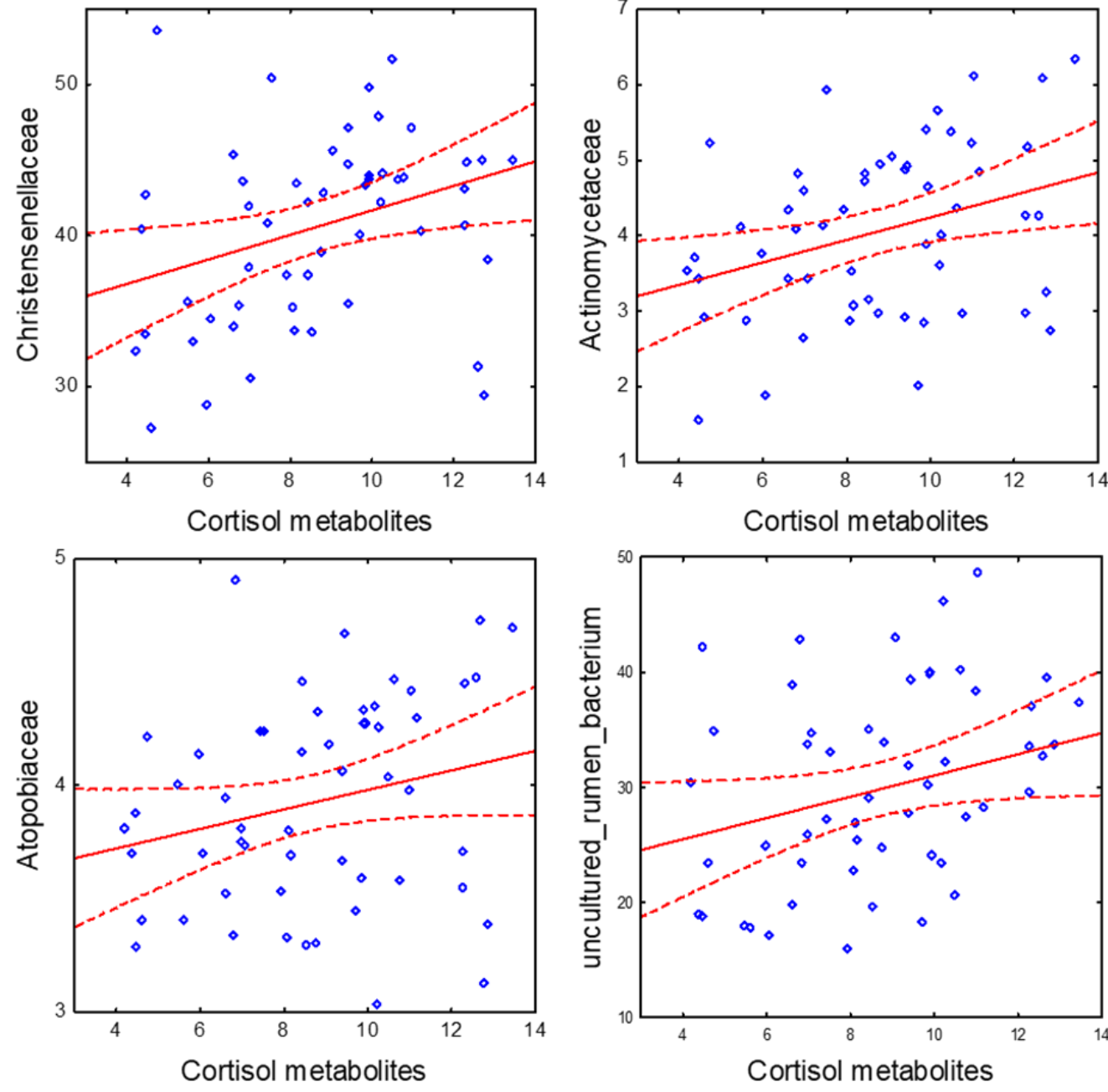
Rys.3. Diagram przedstawiający wspólne i unikalne ASV wśród grup mikrobioty bakteryjnej sarny różniących się poziomem kortyzolu kałowego. Skróty: Lower – grupa o niskim stężeniu metabolitów kortyzolu, Higher – grupa o podwyższonym stężeniu metabolitów kortyzolu; N = 26 i N = 28, odpowiednio.



Rys. 4. PCoA składu mikrobioty bakteryjnej na poziomie rodzaju. (L-Niski , H-Wysoki).

Tabela 1. Wyniki analizy PERMANOVA oceniającej wpływ czterech wybranych czynników (teren badań, poziom stresu, pora roku i masa ciała) na różnorodność beta (odległość Bray–Curtisa) mikrobioty jelitowej sarny europejskiej. Tabela obejmuje tylko modele dla pojedynczych czynników. Dla każdego modelu podano: liczbę stopni swobody (Df), sumę kwadratów (SumOfSqs), współczynnik determinacji (R^2), statystykę pseudo-F oraz wartość p uzyskaną metodą permutacji (na podstawie 9999 permutacji).

Model	Df	SumOfSqs	R2	F	Pr(>F)
Teren	2	0.5353386	0.11988352	3.4734376	0.0003
Poziom stresu	1	0.2587026	0.05793377	3.1978175	0.0063
Pora roku	1	0.1924667	0.04310092	2.3421987	0.0266
Masa tuszy	1	0.0559991	0.01254042	0.6603831	0.7441



Rys. 5. Korelacje między względną obfitością wybranych taksonów bakterii na poziomie rodziny w mikrobiocie sarny a rosnącym poziomem metabolitów kortyzolu (N = 54; współczynnik zmienności = 95%).

WNIOSKI

W populacji dziko żyjących saren europejskich stwierdzono istotne zróżnicowanie poziomów metabolitów kortyzolu. Z podwyższonym poziomem kortyzolu wiązały się wyraźne zmiany w składzie mikrobioty jelitowej. Zaobserwowano spadek liczebności niektórych wrażliwych grup bakterii oraz wzrost udziału innych, mogących pełnić funkcje kompensacyjne. Zmiany te mogą stanowić mechanizm adaptacyjny chroniący przed dysbiozą i wspierający metabolizm energetyczny w warunkach stresu. Niektóre grupy bakterii reagują w sposób przewidywalny na stres środowiskowy, co czyni je potencjalnymi biomarkerami stresu u dzikich przeżuwaczy. Wyniki podkreślają znaczenie mikrobioty jako wskaźnika zdrowia i adaptacji saren do warunków środowiskowych

