

Wpływ drożdży *Saccharomyces cerevisiae* na wzrost i fermentację *in vitro* *Selenomonas ruminantium* i *Megasphaera elsdenii**

Sylwia Grochowska¹, Włodzimierz Nowak¹, Małgorzata Lasik-Kurdyś², Robert Mikula^{1#}, Jacek Nowak²

¹Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Katedra Żywienia Zwierząt i Gospodarki Paszowej, ul. Wołyńska 33, 60-637 Poznań; #e-mail: r.mikula@up.poznan.pl

²Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Instytut Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego, ul. Wojska Polskiego 31, 60-627 Poznań

Poprawa wykorzystania mleczanów przez *Selenomonas ruminantium* i *Megasphaera elsdenii* może być pomocna w zmniejszaniu problemów związanych z kwasimą żwacza. Celem badań było określenie wpływu żywych kultur drożdży (SC) i produktów ich fermentacji (SCFP) na wzrost i przebieg fermentacji w warunkach *in vitro* bakterii laktolitycznych *S. ruminantium* (ATCC 19205) i *M. elsdenii* (ATCC 25940). Hodowle były prowadzone przez 6, 12, 24 i 48 godzin w warunkach beztlenowych na podłożu referencyjnym wzrostowym z żywymi kulturami drożdży (SC) lub produktami fermentacji drożdży (SCFP) oraz na podłożu bez dodatku (CON). Nie wykazano wpływu obu rodzajów drożdży (SC i SCFP) na wzrost *S. ruminantium* po 6, 12 i 24 godzinach inkubacji, jednak żywe kultury drożdży (SC) zwiększyły wzrost tej bakterii po 48 godzinach inkubacji ($P \leq 0,05$). Produkty fermentacji drożdży zmniejszyły pH i zwiększyły syntezę mleczanów przez *S. ruminantium*. Żywe kultury drożdży zwiększyły liczbę bakterii *M. elsdenii* po 12 i 24 godzinach, a produkty fermentacji po 48 godzinach inkubacji ($P \leq 0,05$). Żywe kultury *Saccharomyces cerevisiae* zredukowały koncentrację lotnych kwasów tłuszczowych po 24 i 48 godzinach inkubacji, a kapronian był dominującym produktem fermentacji *M. elsdenii*. Dodatek żywych kultur *Saccharomyces cerevisiae* może poprawiać mikrobiologiczny rozkład włókna w żwaczu poprzez utrzymywanie optymalnego pH.

SŁOWA KLUCZOWE: *Saccharomyces cerevisiae* / żywe kultury drożdży / *Megasphaera elsdenii* / *Selenomonas ruminantium* / wzrost bakterii / fermentacja / *in vitro*

Wyniki badań potwierdzają korzystny wpływ drożdży *Saccharomyces cerevisiae* na zmiany zachodzące w żwaczu i trawienie składników pokarmowych [5, 15], kontrolę pH w żwaczu [4], zmniejszanie ryzyka występowania chorób metabolicznych lub problemów z płodnością [10]. Niektóre badania przeprowadzone *in vitro* wykazały, że *S. cerevisiae*

*Badania zostały wykonane w ramach projektu badawczego finansowanego przez Komitet Badań Naukowych, grant nr 2 P06Z 044 28.

stymulowały wzrost bakterii wykorzystujących mleczały, takich jak *Megasphaera elsdenii* i *Selenomonas ruminantium*, przez co redukowały stężenie mleczałów [7]. Pinloche i wsp. [31] stwierdzili zwiększone stężenie propionianów i maślanów w płynie żwacza po podaniu drożdży; również w innych badaniach wykazano wpływ drożdży na zwiększenie udziału propionianów [13], octanów [1] i maślanów [36]. Lynch i Martin [21] na podstawie badań *in vitro* przeprowadzonych z mikroorganizmami pochodzącymi od różnych zwierząt przeżuwających stwierdzili, że hodowla aktywnych *Saccharomyces cerevisiae* (SC) obniżała stężenie mleczałów. *M. elsdenii* i *S. ruminantium* są powszechnie występującymi w żwaczu bakteriami beztlenowymi, które mogą przyczynić się do zwiększenia pH przez fermentację mleczałów i zmniejszyć problemy związane z kwasicią żwacza [25]. *M. elsdenii* jest Gram-ujemnym, bezwzględnie beztlenowym ziarniakiem, który fermentuje cukry rozpuszczalne i mleczały [30]. Counotte i wsp. [9] uważają, że *M. elsdenii* jest gatunkiem wykorzystującym przede wszystkim mleczały, zdolnym do fermentacji aż 97% mleczału żwacza. W badaniach *in vitro* wykazano większe wykorzystanie mleczałów przez *M. elsdenii* niż *S. ruminantium* [3]. Wykazano, że produkty fermentacji drożdży *Saccharomyces cerevisiae* (SCFP) poprawiają wzrost i fermentację *M. elsdenii* i *S. ruminantium*, jednak ich działanie nie jest w pełni wyjaśnione [6, 18]. Żywe kultury drożdży mogą przez krótki okres przetrwać w żwaczu, wykorzystując śladowe ilości obecnego tam tlenu, stwarzając korzystne beztlenowe środowisko do wzrostu bakterii i wpływając na rozkład włókna [2]. Na rynku paszowym dostępnych jest kilka produktów drożdży, różniących się nieznacznie w procesie produkcyjnym; niewiele jednak badań porównuje produkty fermentacji drożdży w identycznych warunkach eksperymentalnych [26]. W ostatnich kilku latach obserwuje się rosnące zainteresowanie porównaniem wpływu produktów SC i SCFP na fermentację w żwaczu.

Celem pracy była ocena wpływu żywych kultur drożdży *Saccharomyces cerevisiae* (SC) i produktów fermentacji *Saccharomyces cerevisiae* (SCFP) na wzrost i fermentację *in vitro* bakterii żwaczowych wykorzystujących mleczały – *Megasphaera elsdenii* i *Selenomonas ruminantium*.

Material i metody

Szczepy bakterii i podłoża wzrostowe. Materiałem doświadczalnym były dwa szczepy bakterii wyizolowane ze żwacza – *Selenomonas ruminantium* (ATCC 19205) i *Megasphaera elsdenii* (ATCC 25940). Zgodnie z zaleceniami ATCC *M. elsdenii* była hodowana na pożywce Oxoid CM 149, a *S. ruminantium* na pożywce ATCC 602 E. Pożywki po usunięciu tlenu, poprzez wprowadzenie CO₂, zostały wysterylizowane. Liofilizowane bakterie ożywiono, a następnie namnożono poprzez wielokrotne przeszczepianie na specyficzne podłoża. Przed badaniami pożywki wzrostowe zaszczipiono określonym szczepem bakterii, a następnie w sterylnych warunkach wprowadzono CO₂. Inkubację prowadzono przez 48 godzin w warunkach beztlenowych w atmosferze 20% CO₂ i 75% N₂ w temperaturze 37°C w HEPA CLASS 100 Thermo Electron.

Prowadzenie hodowli i badania. Inokulum badanych mikroorganizmów przygotowano stosując referencyjne podłoża wzrostowe, specjalne dla poszczególnych szczepów bakterii. Hodowlę bakterii prowadzono przez 48 godzin w temperaturze 37°C. Stanowiło ono

10% podłoża hodowlanego. W doświadczeniu zastosowano dwa preparaty, tj. Biosaf SC 47 – żywe kultury drożdży *Saccharomyces cerevisiae* (5^9 log cfu/g) i Diamond V XP Mills – zawierający pożywki, na których wzrastały drożdże, metabolity wytwarzane przez drożdże podczas procesu fermentacji i martwe komórki drożdży. Dodatki paszowe w ilości 0,13 g żywych kultur drożdży (Biosaf SC 47) i 1 g metabolitów drożdży (Diamond V XP Mills) rozpuszczono w 50 cm³ podłoża, po 10 minutach wprowadzono CO₂, a następnie 10 cm³ przygotowanego roztworu podano do hodowli poszczególnych szczepów bakterii. Ilość dodatków paszowych została przeliczona według ich dawkowania dla krów mlecznych, biorąc pod uwagę średnią objętość żwacza. Hodowlę *S. ruminantium* (ATCC 19205) i *M. elsdenii* (ATCC 25940) prowadzono oddzielnie w kolbach Erlenmeyer o pojemności 500 cm³, zawierających 130 cm³ odpowiedniego podłoża z dodatkiem Biosaf SC 47 – grupa SC i Diamond V XP Mills – grupa SCFP. Dodatkowo prowadzono hodowlę kontrolną bez dodatków – grupa CON. W celu stworzenia warunków beztlenowych kolby, w dwóch powtórzeniach na grupę, zabezpieczono korkiem bawełnianym nasączonym 10% roztworem pyrogalu i nasyconym roztworem kwaśnego węgla sodu oraz zabezpieczono parafilmem. Hodowle prowadzono w temperaturze 37°C przez 48 godzin w inkubatorze Mytron WT 120.

Po 6, 12, 24 oraz 48 godzinach inkubacji pobrano płyn pohodowlany, w którym określono liczbę żywych komórek bakterii, wartość wskaźnika pH, koncentrację lotnych kwasów tłuszczowych (LKT), mleczanów oraz stężenie amoniaku. Po każdym pomiarze, aby zapewnić warunki beztlenowe w hodowli, stosowano taką samą metodę jak na początku badań. Liczbę żywych kultur drożdży podczas fermentacji oznaczano poprzez wysiew na płytki metodą agarową. Użyto rekomendowane przez ATCC podłoża wzrostowe z dodatkiem 1,5% agaru. Płytki inkubowano przez 48 godzin w warunkach beztlenowych, w inkubatorze HEPA CLASS 100 Thermo Electron.

Metody analityczne. Zmiany wartości wskaźnika pH środowiska hodowlanego oznaczono pH-metrem elektronicznym typ CP 411Elmetron z kompensacją temperatury. Koncentrację LKT i mleczanów wykonano za pomocą chromatografii gazowej (Varian CP380), zgodnie z metodyką Jensen i wsp. [17]. Przed rozdziałem w chromatografii gazowej 50 µL próby inkubowano przez 30 minut w Thermolyte Dri Bath (Thermonyle, UK), w temperaturze 80°C, w atmosferze MTBSTFA (Fluka 19918), a jako standardu wewnętrznego użyto kwasu 2-etylomasłowego (Fluka 03190). Stężenie amoniaku określono metodą mikrodyfuzji [8].

Przedstawione wyniki badań są średnimi z obserwacji. Uzyskane dane poddano analizie statystycznej z wykorzystaniem jednoczynnikowej analizy wariancji oraz procedur MEANS i GLM programu SAS [34], przy użyciu testu Duncana oraz założeń istotności na poziomie $P \leq 0,01$ i $P \leq 0,05$.

Wyniki i dyskusja

Dodatek aktywnych drożdży (SC), jak i produktów fermentacji drożdży (SCFP) nie miał istotnego ($P > 0,05$) wpływu na wzrost *S. ruminantium* po 6, 12 i 24 godzinach inkubacji (tab. 1, rys. 1). Po 48 godzinach obserwowano statystycznie istotny wzrost liczby

Tabela 1 – Table 1

Wpływ żywych kultur drożdży *Saccharomyces cerevisiae* (SC) i produktów fermentacji *Saccharomyces cerevisiae* (SCFP) na wzrost i fermentację *in vitro* *Selenomonas ruminantium*
 Effects of *Saccharomyces cerevisiae* live yeast culture (SC) and *Saccharomyces cerevisiae* fermentation products (SCFP) on *in vitro* growth and fermentation of *Selenomonas ruminantium*

Wyszczególnie Items	Czas hodowli (h) – Incubation time (h)																				
	0			6			12			24			48								
	CON	SC	SCFP	CON	SC	SCFP	CON	SC	SCFP	CON	SC	SCFP	CON	SC	SCFP	CON	SC	SCFP			
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
Bakterie (log cfu ml ⁻¹) Bacteria (log cfu ml ⁻¹)	7,89	7,81	7,85	0,02	8,95	8,83	8,72	0,09	8,86	8,76	9,00	0,12	8,90	8,93	8,90	0,02	8,92 ^A	9,53 ^B	9,04 ^A	0,11	
pH	6,88	6,94	6,89	0,02	5,91 ^A	5,84 ^B	5,71 ^C	0,04	5,89 ^A	5,84 ^B	5,55 ^C	0,07	5,98 ^A	5,87 ^B	5,59 ^C	0,07	5,99 ^A	5,94 ^B	5,61 ^A	0,08	
Amoniak (mmol l ⁻¹) Ammonia (mmol l ⁻¹)	9,74	9,79	10,23	0,32	10,59	10,24	9,75	0,30	10,37	10,33	11,14	0,24	10,67	10,96	10,19	0,29	10,11	10,22	10,20	0,21	
Suma LKT (mmol l ⁻¹) Total VFA (mmol l ⁻¹)	15,22	14,90	15,60	0,33	15,38	15,89	15,83	0,15	15,02 ^A	16,90 ^B	16,90 ^B	0,31	18,20	16,25 ^A	18,79 ^B	0,46	19,36	20,70	18,61	0,49	
Octan; A (mmol l ⁻¹) Acetate; A (mmol l ⁻¹)	9,70	9,78	9,94	0,23	10,40	10,91	10,25	0,15	9,55 ^A	11,11 ^B	11,06 ^B	0,25	12,56 ^A	10,55 ^B	12,63 ^A	0,40	13,28	14,28	12,69	0,38	
Propionian; P (mmol l ⁻¹) Propionate; P (mmol l ⁻¹)	2,36	2,09	2,39	0,06	2,70 ^A	2,77 ^A	2,42 ^B	0,05	2,23 ^A	2,61 ^B	2,52 ^B	0,06	2,61 ^A	2,35 ^B	2,57 ^A	0,05	2,66	2,89	2,50	0,08	
Masłian (mmol l ⁻¹) Butyrate (mmol l ⁻¹)	1,03	0,94	1,06	0,02	1,03	1,00	1,00	0,02	1,01	0,91	1,05	0,07	1,08	1,11	1,18	0,02	1,10	1,20	1,16	0,03	
Walerian (mmol l ⁻¹) Valerate (mmol l ⁻¹)	0,33	0,32	0,34	0,01	0,36	0,36	0,34	0,01	0,40	0,46	0,41	0,02	0,43	0,38	0,49	0,02	0,39	0,42	0,39	0,01	
Kapronian (mmol l ⁻¹) Caproate (mmol l ⁻¹)	1,48	1,47	1,50	0,01	1,41	1,40	1,48	0,03	1,48	1,49	1,49	0,00	1,14	1,50	1,50	0,01	1,52	1,50	1,51	0,01	
Izomasłian (mmol l ⁻¹) Isobutyrate (mmol l ⁻¹)	0,18	0,16	0,20	0,01	0,21	0,25	0,19	0,02	0,19	0,16	0,21	0,01	0,21	0,20	0,23	0,01	0,25	0,23	0,20	0,01	
Izowalerian (mmol l ⁻¹) Isovalerate (mmol l ⁻¹)	0,09	0,09	0,12	0,01	0,11	0,10	0,10	0,00	0,09	0,08	0,10	0,00	0,10	0,10	0,11	0,00	0,10	0,11	0,10	0,00	
Izokapronian (mmol l ⁻¹) Isocaproate (mmol l ⁻¹)	0,05	0,05	0,05	0,00	0,06	0,06	0,05	0,00	0,07	0,08	0,06	0,00	0,07	0,06 ^A	0,08 ^B	0,00	0,06	0,07	0,06	0,00	

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Stosunek A/P A/P ratio	4,11	4,20	4,16	0,02	3,85 ^A	3,94 ^B	4,24 ^C	0,06	4,28	4,26	4,39	0,05	4,81	4,49	4,91	0,11	4,99	4,94	5,08	0,09
Mleczan (mmol l ⁻¹) Lactate (mmol l ⁻¹)	3,24	3,60	3,58	0,19	5,02 ^A	5,10 ^A	11,84 ^B	1,41	17,53 ^A	21,66 ^B	23,99 ^B	0,90	18,43 ^A	16,80 ^A	26,11 ^B	1,38	10,26	11,43	14,93	0,90
Proporcje molowe (mol/100 mol) Molar proportion (mol/100 mol)																				
Kwas octowy Acetic acid	74,1	74,3	74,2	0,06	73,6	74,3	75,0	0,27	74,7	75,9	75,6	0,44	77,3	75,3	77,1	0,40	77,9	77,8	77,6	0,28
Kwas propionowy Propionic acid	18,0	17,7	17,9	0,08	19,1 ^A	18,9 ^A	17,7 ^B	0,22	17,4	17,9	17,2	0,18	16,1	16,8	15,7	0,27	15,6	15,7	15,3	0,22
Kwas masłowy Butyric acid	7,9	8,0	7,9	0,04	7,3	6,8	7,3	0,17	7,9	6,2	7,2	0,47	6,6 ^A	7,9 ^B	7,2 ^C	0,19	6,5	6,5	7,1	0,17

CON – bez drożdży – without yeast supplement, SC – żywe kultury drożdży – live yeast culture; SCFP – produkty fermentacji drożdży – yeast fermentation products

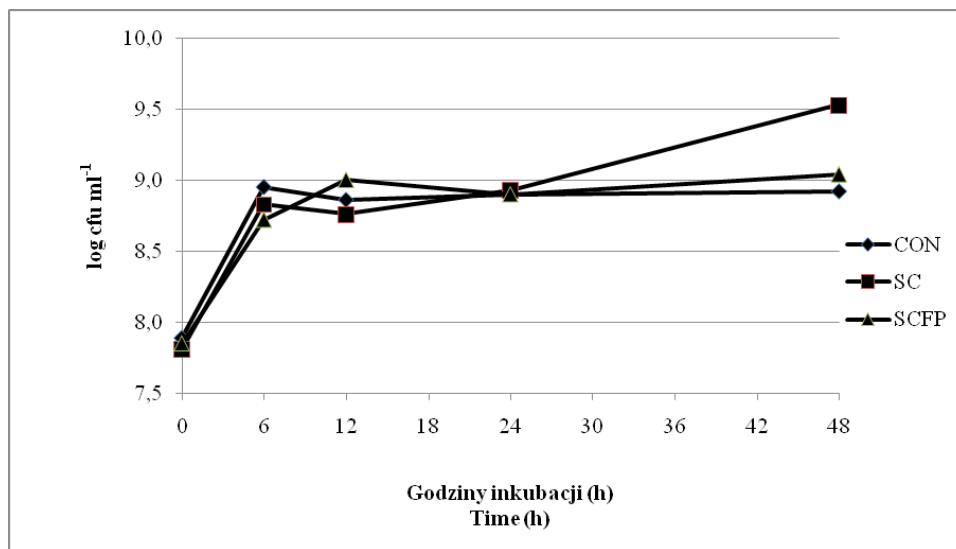
SEM – błąd standardowy średniej – standard error of the mean

Stosunek A/P – stosunek octanów do propionianów; A/P ratio – acetate to propionate ratio

Średnie oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie: a, b, c przy P≤0,05; A, B, C przy P≤0,01

Means denoted with different letters are significantly different: a, b, c at P≤0,05; A, B, C at P≤0,01

bakterii ($P \leq 0,05$) po dodaniu aktywnych drożdży (SC). W porównaniu z grupą kontrolną i żywymi kulturami drożdży, produkty fermentacji drożdży (SCFP) istotnie zwiększyły poziom mleczanów i obniżyły pH po 6, 12, 24 i 48 godzinach inkubacji. Suma LKT po 12 godzinach inkubacji była statystycznie istotnie niższa ($P \leq 0,05$) w porównaniu do SC i SCFP, głównie przez wyższe stężenie octanów i propionianów, ale bez wpływu na stosunek octanów do propionianów (A/P). Najwyższe stężenie propionianu obserwowano w grupie SC, a najniższe w SCFP ($P \leq 0,01$), co wpłynęło na największy stosunek A/P, a także najniższą zawartość propionianów w grupie SCFP. Statystycznie istotnie ($P \leq 0,05$) zmniejszenie całkowitego stężenia LKT i mleczanów, octanów i propionianów w porównaniu z grupą kontrolną obserwowano po 24 godzinach inkubacji po dodaniu SC. Również po upływie 24 godzin inkubacji stężenie izokapronianów było mniejsze w grupie SC w porównaniu z grupą SCFP ($P \leq 0,01$). Żaden dodatek ani produkty fermentacji *S. cerevisiae*, jak i żywe kultury drożdży nie wykazały znaczącego ($P > 0,05$) wpływu na stężenie amoniaku.



CON – bez drożdży – without yeast supplement

SC – żywe kultury drożdży – live yeast culture

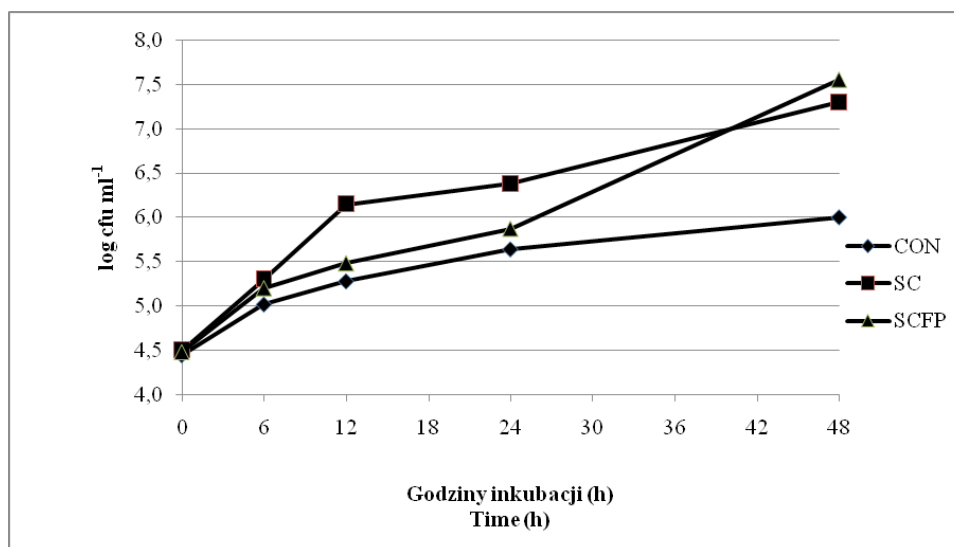
SCFP – produkty fermentacji drożdży – yeast fermentation products

Rys. 1. Wpływ żywych kultur drożdży *Saccharomyces cerevisiae* (SC) i produktów fermentacji *Saccharomyces cerevisiae* (SCFP) na wzrost *Selenomonas ruminantium* (ATCC 19208) *in vitro*

Fig. 1. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* live yeast culture (SC) and *Saccharomyces cerevisiae* fermentation products (SCFP) on *in vitro* growth of *Selenomonas ruminantium* (ATCC 19208)

Wzrost *M. elsdenii* zwiększył się istotnie po dodaniu SC do pożywki (tab. 2, rys. 2). Największy wpływ żywych kultur drożdży obserwowano po 12 i 24 godzinach inkubacji. Oba dodatki *S. cerevisiae* zwiększyły liczbę bakterii *M. elsdenii* po 48 godzinach

inkubacji w porównaniu z grupą kontrolną. Głównymi produktami końcowymi fermentacji *M. elsdenii* były kaproniany i maślane. W porównaniu z grupą kontrolną (CON) i drożdżami aktywnymi (SC), SCFP znacząco zwiększył całkowite stężenie LKT ($P \leq 0,05$) po 24 i 48 godzinach inkubacji, co wynikało głównie ze zwiększonego poziomu maślanów, walerianów, kapronianów, izomaślanów i izowalernianów. Obserwowano również zwiększenie stosunku octanów do propionianów ($P \leq 0,05$) po 48 godzinach hodowli. SC znacząco ($P \leq 0,05$) obniżył poziom mleczanów i zwiększył pH po 48 godzinach inkubacji. Największy poziom amoniaku obserwowano w grupie SCFP po 12 i 48 godzinach inkubacji.



CON – bez drożdży – without yeast supplement
SC – żywe kultury drożdży – live yeast culture
SCFP – produkty fermentacji drożdży – yeast fermentation products

Rys. 2. Wpływ żywych kultur drożdży *Saccharomyces cerevisiae* (SC) i produktów fermentacji *Saccharomyces cerevisiae* (SCFP) na wzrost *Megasphaera elsdenii* (ATCC 19208) *in vitro*
Fig. 2. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* live yeast culture (SC) and *Saccharomyces cerevisiae* fermentation products (SCFP) on *in vitro* growth of *Megasphaera elsdenii* (ATCC 19208)

Stymulacja rozkładu mleczanów przez *S. ruminantium* i *M. elsdenii* może pomóc w zmniejszeniu problemów związanych z kwasimą żwacza [7]. Pinloche i wsp. [31] obserwowali zwiększoną liczebność w żwaczu *M. elsdenii* i *S. elsdenii*, kiedy krowy otrzymywały żywe kultury drożdży. Callaway i Martin [6] sugerują, że poznanie produktów fermentacji *S. cerevisiae*, które wpływają na wzrost i metabolizm kluczowych bakterii żwaczowych, może doprowadzić do opracowania mikrobiologicznych dodatków paszowych specyficznych dla dawki pokarmowej przeznaczonej dla poszczególnych gatunków zwierząt przeżuwających. W badaniach własnych dodanie do podłoża SC i SCFP nie wpłynęło na

Tabela 2 – Table 2

Wpływ żywych kultur drożdży *Saccharomyces cerevisiae* (SC) i produktów fermentacji *Saccharomyces cerevisiae* (SCFP) na wzrost i fermentację *in vitro* *Megasphaera elsdenii*

Effects of *Saccharomyces cerevisiae* live yeast culture (SC) and *Saccharomyces cerevisiae* fermentation products (SCFP) on *in vitro* growth and fermentation of *Megasphaera elsdenii*

Wyszczególnienie Items	Czas inkubacji (h) – Incubation time (h)																							
	0				6				12				24				48							
	CON	SC	SCFP	SEM	CON	SC	SCFP	SEM	CON	SC	SCFP	SEM	CON	SC	SCFP	SEM	CON	SC	SCFP	SEM				
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	7	18	19	20	21				
Bakterie (log cfu ml ⁻¹) Bacteria (log cfu ml ⁻¹)	4,45	4,5	4,48	0,07	5,02	5,30	5,20	0,10	5,28 ^{Aa}	6,15 ^B	5,48 ^{Cb}	0,07	5,64	6,38	5,87	0,11	6,00 ^A	7,30	7,55 ^B	0,19				
pH	6,01	6,03	6,01	0,03	6,02	5,99	6,05	0,04	5,99	5,92	6,12	0,04	5,96	6,11	6,05	0,03	6,01 ^A	6,31 ^B	6,02 ^A	0,06				
Amoniak (mmol l ⁻¹) Ammonia (mmol l ⁻¹)	8,35	8,35	8,41	0,12	8,62	9,50	10,35	0,15	9,30 ^B	10,43	11,86 ^B	0,52	14,65	14,28	13,99	0,14	13,39	14,90 ^A	13,05 ^B	0,35				
Suma LKT (mmol l ⁻¹) Total VFA (mmol l ⁻¹)	18,84	19,21	18,40	0,45	21,29	20,13	20,56	0,56	22,09	21,27	20,52	0,59	25,85 ^a	26,49 ^a	33,10 ^b	1,31	34,40 ^A	27,93 ^B	39,39 ^C	1,42				
Octan; A (mmol l ⁻¹) Acetate; A (mmol l ⁻¹)	14,51	14,46	13,98	0,45	14,89	13,44	14,24	0,49	14,10	13,24	12,76	0,44	5,29	5,32	6,50	0,28	3,13 ^A	3,84 ^B	3,93 ^B	0,12				
Propionian; P (mmol l ⁻¹) Propionate; P (mmol l ⁻¹)	0,20	0,22	0,18	0,01	0,38	0,38	0,35	0,01	0,43	0,42	0,39	0,01	0,39	0,43	0,44	0,01	0,49 ^a	0,52 ^A	0,39 ^{Bb}	0,02				
Masłian (mmol l ⁻¹) Butyrate (mmol l ⁻¹)	0,99	1,02	0,95	0,05	2,24	2,41	2,24	0,03	3,16	3,46	3,28	0,10	9,37 ^A	9,66 ^a	12,46 ^{Bb}	0,54	9,42 ^A	9,53 ^A	10,54 ^B	0,16				
Walerian (mmol l ⁻¹) Valerate (mmol l ⁻¹)	0,21	0,24	0,22	0,02	0,26	0,26	0,24	0,01	0,28	0,27	0,28	0,01	0,54 ^a	0,62	0,73 ^b	0,03	0,82 ^A	0,65 ^B	0,93 ^C	0,04				
Kapronian (mmol l ⁻¹) Caproate (mmol l ⁻¹)	2,58	2,86	2,71	0,04	2,80	2,90	2,76	0,03	3,14	2,89	2,83	0,04	6,93 ^A	7,12 ^A	9,04 ^B	0,34	17,32 ^A	9,77 ^B	20,27 ^C	1,33				
Izomasłian (mmol l ⁻¹) Isobutyrate (mmol l ⁻¹)	0,12	0,14	0,12	0,01	0,21	0,22	0,21	0,00	0,26	0,26	0,26	0,01	1,13	1,14	1,20	0,09	1,23 ^A	1,42 ^B	1,28 ^A	0,03				
Izowalerian (mmol l ⁻¹) Isovalerate (mmol l ⁻¹)	0,18	0,21	0,18	0,01	0,45	0,46	0,46	0,01	0,66	0,67	0,66	0,02	2,14	2,14 ^a	2,67 ^b	0,10	1,93 ^A	2,14 ^B	1,98 ^A	0,03				
Izokapronian (mmol l ⁻¹) Isocaproate (mmol l ⁻¹)	0,05	0,06	0,06	0,01	0,06	0,06	0,06	0,00	0,06	0,06	0,06	0,00	0,06	0,06	0,06	0,00	0,06	0,06	0,07	0,00				

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Stosunek A/P A/P ratio	72,55	65,73	77,67	1,52	39,18	35,37	40,69	2,13	32,79	31,52	32,72	0,89	13,56	12,37	14,77	0,34	6,39 ^A	7,38 ^A	10,08 ^B	0,51
Mleczan (mmol l ⁻¹) Lactate (mmol l ⁻¹)	1,67	1,74	1,18	0,15	1,90	1,94	1,94	0,20	2,15	1,91	2,10	0,12	2,26	2,06	2,57	0,09	1,96 ^a	1,36 ^b	2,06 ^a	0,14
Proporcje molowe (mol/100 mol) Molar proportion (mol/100 mol)																				
Kwas octowy Acetic acid	92,4	92,1	92,5	0,15	85,0	82,8	84,6	0,11	79,7 ^{AB}	76,6 ^B	78,1 ^b	0,47	35,1 ^a	34,5 ^a	33,5 ^b	0,38	24,0 ^{aA}	27,6 ^B	26,5 ^b	0,55
Kwas propionowy Propionic acid	1,3	1,4	1,2	0,07	2,2	2,3	2,1	0,05	2,4	2,5	2,3	0,06	2,6 ^a	2,8 ^a	2,3 ^b	0,06	3,8 ^A	3,8 ^A	2,6 ^B	0,19
Kwas masłowy Butyric acid	6,3	6,5	6,3	0,09	12,8	14,9	13,3	0,10	17,9 ^A	20,9 ^B	19,6	0,44	62,3 ^a	62,7 ^a	64,2 ^b	0,41	72,2 ^A	68,6 ^{Ba}	70,9 ^b	0,55

CON – bez drożdży – without yeast supplement; SC – żywe kultury drożdży – live yeast culture; SCFP – produkty fermentacji drożdży – yeast fermentation products
SEM – błąd standardowy średniej – standard error of the mean
Stosunek A/P – stosunek octanów do propionianów; A/P ratio – acetate to propionate ratio
Średnie oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie: a, b, c przy P≤0,05; A, B, C przy P≤0,01
Means denoted with different letters are significantly different: a, b, c at P≤0,05; A, B, C at P≤0,01

wzrost *S. ruminantium* po 6, 12 i 24 godzinach inkubacji, natomiast żywe kultury drożdży zwiększyły wzrost bakterii po 48 godzinach inkubacji. Oba rodzaje drożdży spowodowały zmiany w końcowych produktach fermentacji. Jest to zgodne z innymi badaniami [14], w których końcowymi produktami fermentacji *S. ruminantium* były octany i propioniany. Produkty fermentacji drożdży dodatkowo zwiększyły stężenie mleczanów i zmniejszyły znacząco pH po 6, 12 i 24 godzinach inkubacji. SC i SCFP zwiększyły sumę LKT po 12 godzinach inkubacji, głównie poprzez stymulację produkcji octanów i propionianów. Stosunek octanów i propionianów nie zmienił się podczas hodowli *S. ruminantium*. Inne wyniki otrzymali Martin i Nisbet [23], którzy po dodaniu metabolitów drożdży (Diamond V XP) obserwowali stały poziom pH i zwiększone wykorzystanie mleczanów przez *S. ruminantium*. Dodatkowo wykazali, że dodatek produktów fermentacji drożdży zwiększył syntezę octanów ($P \leq 0,05$) i sumę LKT podczas inkubacji szczepu *S. ruminantium* H18 oraz zaobserwowali tendencję do wzrostu koncentracji propionianów [6].

Bakterie *S. ruminantium* zwiększyły rozkład mleczanów i zmniejszyły produkcję metanu [3]. Nisbet i Martin [28] obserwowali pozytywny efekt *Aspergillus oryzae* na rozkład mleczanów i wzrost *S. ruminantium*. Martin i Streeter [24] sugerują, że dodatek grzybów może być źródłem kwasów dwukarboksylowych, które pozytywnie wpływają na wykorzystanie mleczanów przez *S. ruminantium*. Evans i Martin [14] wykazali, że *S. ruminantium* produkuje jabłczany, które stymulują rozkład mleczanów, zwiększają pH i koncentrację propionianów, ale niestety za mało jest dostępnych informacji mówiących o wpływie jabłczanów na bakterie rozkładające mleczany.

W badaniach własnych żywe kultury drożdży *S. cerevisiae* stymulowały wzrost *M. elsdenii* głównie po 12 i 24 godzinach, natomiast produkty fermentacji – po 48 godzinach inkubacji. Istnieje duże prawdopodobieństwo, że żywe komórki drożdży są aktywne i mają zdolność metaboliczną jeszcze przez 24 godziny. Kung i wsp. [19] wykazali, że *S. cerevisiae* nie namnażały się w sterylnym płynie żwaczowym, ale przetrwały i charakteryzowały się aktywnością metaboliczną. W przeciwieństwie do tych badań, El Hassan i wsp. [11] stwierdzili, że w żwaczu owiec liczba żywych komórek drożdży spada z szybkością 8,6% na godzinę. Jednak Kung i wsp. [19] obserwowali aktywność metaboliczną komórek drożdży przez 48 godzin inkubacji. Oeztuerk i wsp. [29] nie odnotowali żadnych dodatkowych korzyści po zastosowaniu żywych *Saccharomyces boulardii* w porównaniu do autoklawowanych, co sugeruje, że drożdże działają bardziej jako prebiotyki niż probiotyki, aczkolwiek przyczyny takiego oddziaływania nie są do końca zrozumiałe. W badaniach własnych SC zredukowały statystycznie istotnie ilość mleczanów ($P \leq 0,05$) i zwiększyły pH po 48 godzinach hodowli *M. elsdenii*. Podobnie, Lynch i Martin [21] wykazali, że żywe kultury drożdży *S. cerevisiae* zredukowały stężenie mleczanów, natomiast produkty fermentacji drożdży *S. cerevisiae* w wyniku swojej aktywności zwiększyły stężenie mleczanów i obniżyły pH. Lila i wsp. [20] zaobserwowali, że zwiększenie koncentracji żywych kultur drożdży *S. cerevisiae* zmniejszało liniowo stężenie mleczanów. Również Rossi i wsp. [32], w badaniach nad żywymi kulturami drożdży (Yea-Sacc), stwierdzili liniowe polepszenie rozkładu mleczanów i produkcji bakteryjnej biomasy. Callaway i Martin [6] nie znaleźli wpływu 1% roztworu z filtracji *S. cerevisiae* na wzrost *M. elsdenii*. W badaniach własnych koncentracja amoniaku podczas hodowli *M. elsdenii* nie była modyfikowana przez dodanie SC i SCFP, co jest adekwatne z wynikami otrzymanymi w warunkach *in vitro* [20] oraz *in vivo* [27].

Głównymi produktami rozkładu mleczanów przez *M. elsdenii* są propioniany i octany, jednakże kilka szczepów *M. elsdenii* produkuje także waleriany i maślan. Oba te szlaki metaboliczne umożliwiają reoksydację zredukowanych koenzymów [22, 33]. Głównymi końcowymi produktami fermentacji *M. elsdenii* są maślany i waleriany [37]. Hodowle z *M. elsdenii* zawierały większą ilość izomaślanów, maślanów, izowalerianów i walerianów [18]. W badaniach własnych, poza maślanami, głównym LKT były kaproniany, co jest zgodne z *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* oraz wynikami Elsden i wsp. [12]. W przeciwieństwie do tych danych, Marounek i wsp. [22] stwierdzili, że maślany są głównym produktem metabolizmu glukozy, jednakże zawartość kapronianów wzrastała liniowo wraz ze zwiększeniem w pożywce ilości glukozy. *M. elsdenii* to zwaczowe bakterie fermentujące sacharozę, mogące również rozkładać aminokwasy, jednak głównym ich zadaniem jest utylizacja mleczanów [16, 22]. Kung i wsp. [19] nie obserwowali wpływu żywych kultur drożdży na sumę i molarne proporcje LKT, z wyjątkiem produkcji walerianów przy zastosowaniu dużych ilości drożdży. W badaniach własnych po 24 i 48 godzinach inkubacji SCFP *S. cerevisiae* zwiększył koncentrację sumy LKT, głównie kapronianów, octanów i maślanów oraz poprawił stosunek octanów do propionianów. W grupie SC po 24 i 48 godzinach inkubacji zmniejszyła się suma LKT i koncentracja kapronianów. Wyniki te różniły się od rezultatów przedstawionych przez Soto-Cruz i wsp. [35], którzy wykazali, że żywe kultury drożdży Yea-Sacc stymulowały produkcję maślanów. Newbold i wsp. [27] w przeglądzie literatury stwierdzili, że ekstrakty grzybowe nie wykazały wpływu albo tendencji do zwiększenia stosunku A/P w zwaczu, natomiast żywe kultury drożdży nie dawały efektu lub zmniejszały ten współczynnik. Dodawanie peptydów hydrofilowych z *S. cerevisiae* stymulowało wzrost *M. elsdenii* i produkcję maślanów (+100%) oraz walerianów (+76,1%), jak również metabolizm maślanów [33]. Miller-Webster i wsp. [26] wykazali, że dodatek dwóch różnych produktów fermentacji drożdżowej zwiększył sumę LKT i propionianów oraz zredukował stosunek A/P. Dodatek żywych i autoklawowanych drożdży *Saccharomyces bulardi* zwiększył sumę LKT, koncentrację maślanów, izowalerianów i walerianów, bez istotnego wpływu na propioniany [29]. W doświadczeniach *in vitro* wykazano, że produkty fermentacji *S. cerevisiae* nie miały wpływu na produkcję LKT [21]. Dodawanie produktów fermentacji drożdży miało mniejszy wpływ na ilość produkowanych octanów, propionianów, maślanów i walerianów przez *M. elsdenii* B159 i T81 [6]. Dodatek 2,5% i 5% przesącza żywych kultur drożdży (Yea-Sacc) spowodował poprawę całkowitej produkcji LKT i niewielki spadek stężenia octanów [33].

Dawki pokarmowe z dużą ilością ziarna zbóż obniżają pH w zwaczu. Zarówno SC, jak i SCFP nie wpłynęły istotnie na wzrost *S. ruminantium* po 6, 12 i 24 godzinach inkubacji. Nie stwierdzono wpływu SC na zmniejszenie stężenia mleczanów i końcowe produkty fermentacji *Selenomonas ruminantium*, natomiast produkty fermentacji drożdży zwiększyły koncentrację mleczanów i obniżyły pH płynu zwaczowego. Dodatek SC poprawił wzrost bakterii *M. elsdenii* po 12 i 24 godzinach inkubacji, podczas gdy SCFP znacząco zwiększył liczebność bakterii po 48 godzinach inkubacji. Żywe kultury drożdży *Saccharomyces cerevisiae* zwiększyły pH i zredukowały zawartość maślanów i kapronianów, które były głównymi produktami fermentacji *in vitro* *M. elsdenii*.

Stwierdzono, że drożdże *Saccharomyces cerevisiae* mogą być wykorzystywane do zwiększenia rozkładu mleczanów przez *S. ruminantium* i *M. elsdenii* oraz zmniejszyć problemy z kwasimą zwacza. Więcej pozytywnych efektów obserwowano po zastosowaniu żywych kultur drożdży niż produktów fermentacji *Saccharomyces cerevisiae*.

PIŚMIENNICTWO

1. AL IBRAHIM R.M., KELLY A.K., O'GRADY L., GATH V.P., MCCARNEY C., MULLIGAN F.J., 2010 – The effect of body condition score at calving and supplementation with *Saccharomyces cerevisiae* on milk production, metabolic status, and rumen fermentation of dairy cows in early lactation. *Journal of Dairy Science* 93, 5318-5328.
2. ALZAHAL O., DIONISSOPOULOS L., LAARMAN A.H., WALKER N., MCBRIDE B.W., 2014 – Active dry *Saccharomyces cerevisiae* can alleviate the effect of subacute ruminal acidosis in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 97, 7751-7763.
3. ASANUMA N., HINO T., 2004 – Prevention of rumen acidosis and suppression of ruminal methanogenesis by augmentation of lactate utilization. *Niahon Chikusan Gakkaiho* 75, 543-550.
4. BACH A., IGLESIAS C., DEVANT M., 2007 – Daily rumen pH pattern of loose-housed dairy cattle as affected by feeding pattern and live yeast supplementation. *Animal Feed Science and Technology* 136, 146-153.
5. BITENCOURT L.L., SILVA J.R.M., OLIVEIRA B.M.L., DIAS JUNIOR G.S., LOPRES F., SIECOLA JUNIOR S., ZACARONI O.F., PEREIRA M.N., 2011 – Diet digestibility and performance of dairy cows supplemented with live yeast. *Scientia Agricola* 68, 301-307.
6. CALLAWAY E.S., MARTIN S.A., 1997 – Effects of *Saccharomyces cerevisiae* culture on ruminal bacteria that utilize lactate and digest cellulose. *Journal of Dairy Science* 80, 2035-2044.
7. CHAUCHEYRAS-DURAND F., WALKER N.D., BACH A., 2008 – Effects of active dry yeasts on the rumen microbial ecosystem: Past, present and future. *Animal Feed Science and Technology* 145, 5-26.
8. CONWAY E.J., 1962 – Ammonia. General method. [In:] Microdiffusion analysis and volumetric error. Crosby Lockwood and Son Ltd., London, pp. 98-100.
9. COUNOTTE G.H.M., PRINS R.A., JANSSEN R.H.A.M., DEBIE M.J.A., 1981 – Role of *Megasphaera elsdenii* in the fermentation of DL-(2¹³-C) lactate in the rumen of dairy cattle. *Applied and Environmental Microbiology* 42, 649-655.
10. EASSTRIDGE M.L., 2006 – Major advances in dairy cattle nutrition. *Journal of Dairy Science* 89, 1311-1323.
11. EL HASSAN S.M., NEWBOLD C.J., WALLACE R.J., 1993 – The effect of yeast culture on rumen fermentation: growth of the yeast in the rumen and requirement for viable yeast cells. *Animal Production Science* 56, 463 (Abstr.).
12. ELSDEN S.R., VOLCANI B.E., GILCHRIST F.M.C., LEWIS D., 1956 – Properties of a fatty acid forming organism isolated from the rumen of sheep. *Journal of Bacteriology* 72, 681-689.
13. ERASMUS L.J., ROBINSON P.H., AHMADI A., HINDERS R., GARRETT J.E., 2005 – Influence of prepartum and postpartum supplementation of a yeast culture and monensin, or both, on ruminal fermentation and performance of multiparous dairy cows. *Animal Feed Science and Technology* 122, 219-239.
14. EVANS J.D., MARTIN S.A., 1997 – Factors affecting lactate and malate utilization by *Selemonas ruminantium*. *Applied and Environmental Microbiology* 12, 4853-4858.
15. FERRARETTO L.F., SHAVER R.D., BERTICS S.J., 2012 – Effect of dietary supplementation with lice-cell yeast at two dosages on lactation performance ruminal fermentation, and total nutrient digestibility in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 95, 4017-4028.

16. HOBSON P.N., STEWART C.S., 1997 – The rumen microbial ecosystem. 2th edition. Chapman & Hall, London.
17. JENSEN M.T., COX R.P., JENSES B.B., 1995 – Microbial production of skatole in the hindgut of pigs given different diets and its relation to skatole deposition in backfat. *Journal of Animal Science* 61, 293-304.
18. KUNG L.J., HESSION A.O., 1995 – Preventing *in vitro* lactate accumulation in ruminal fermentations by inoculation with *Megasphaera elsdenii*. *Journal of Animal Science* 73, 250-256.
19. KUNG L.JR., KRECK E.M., TUNG R.S., HESSION A.O., SHEPERD A.C., COHEN M.A., SWAIN H.E., LEEDLE J.A.Z., 1997 – Effects of live yeast culture and enzymes on *in vitro* ruminal fermentation and milk production of dairy cows. *Journal of Dairy Science* 80, 2045-2051.
20. LILA Z.A., MOHAMMED N., YASUI T., KUROKAWA Y., KANDA S., ITABASHI H., 2004 – Effects of twin strain of *Saccharomyces cerevisiae* live cells on mixed ruminal microorganism fermentation *in vitro*. *Journal of Animal Science* 82, 1847-1854.
21. LYNCH H.A., MARTIN S.A., 2002 – Effects of *Saccharomyces cerevisiae* culture and *Saccharomyces cerevisiae* live cells on *in vitro* mixed ruminal microorganism fermentation. *Journal of Dairy Science* 85, 2603-2608.
22. MAROUNEK M.K., FLIEGROVA K., BARTOS S., 1989 – Metabolism and some characteristics of ruminal strain of *Megasphaera elsdenii*. *Applied and Environmental Microbiology* 55, 1570-1573.
23. MARTIN S.A., NISBET D.J., 1992 – Effect of direct fed microbials on rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science* 75, 1736-1744.
24. MARTIN S.A., STREETER M.N., 1995 – Effect of malate on *in vitro* mixed ruminal microorganism fermentation. *Journal of Animal Science* 73, 2141-2145.
25. MEIGNANALAKSHMI S., MAHALINGA NAINAR A., 2007 – Isolation and characterization of *Megasphaera elsdenii* from bovine rumen. *Tamilnadu Journal Veterinary and Animal Sciences* 3, 150-155.
26. MILLER-WEBSTER T., HOOVER W.H., HOLT M., NOCEK J.E., 2002 – Influence of yeast culture on ruminal microbial metabolism in continuous culture. *Journal of Dairy Science* 85, 2009-2014.
27. NEWBOLD C.J., WALLACE R.J., CHEN X.B., MCINTOSH F.M., 1995 – Different strain of *Saccharomyces cerevisiae* as a feed additive for ruminants. *British Journal of Nutrition* 76, 249-261.
28. NISBET D.J., MARTIN S.A., 1993 – Effects of fumarate, L-malate, and an *Aspergillus oryzae* fermentation extract on D-lactate utilization by the ruminal bacterium *Selenomonas ruminantium*. *Current Microbiology* 26, 133-136.
29. OEZTUERK H., SCHROEDER B., BEYERBACH M., BREVES G., 2005 – Influence of living and autoclaved yeasts of *Saccharomyces boulardii* on *in vitro* ruminal microbial metabolism. *Journal of Dairy Science* 88, 2594-2600.
30. PIKNOVA M., BIRES O., JAVORSKY P., PRISTAS P., 2006 – Limited genetic variability in *Megasphaera elsdenii* strains. *Folia Microbiologica* 51, 299-302.
31. PINLOCHE E., MCEWAN N., MARDEN J.P., BAYOURTHE C., AUCLAIR E., NEWBOLD C.J., 2013 – The effects of a probiotic yeast on the bacterial diversity and population structure in the rumen of cattle. *PLoS ONE* 8, e67824.

32. ROSSI F., COCCONCELLI P.S., MASOERO F., 1995 – Effects of *Saccharomyces cerevisiae* culture on growth and lactate utilization by the ruminal bacterium *Megasphaera elsdenii*. *Annales de Zootechnie* 44, 403-409.
33. ROSSI F., DI LUCCIA A., VINCENTI D., COCCONCELLI P.S., 2004 – Effects of peptidic fractions from *Saccharomyces cerevisiae* culture on growth and metabolism of the ruminal bacteria *Megasphaera elsdenii*. *Animal Research* 53, 177-186.
34. SAS® User's guide. Statistics, Version 6.12., 1996 – SAS Inst., Inc., Cary, NC.
35. SOTO-CRUZ O., CHAVEZ-RIVERA R., SAUCEDO-CASTANEDA G., 2001 – Stimulation of the *Megasphaera elsdenii*'s butyrate production in continuous culture by a yeast additive. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 44, 179-184.
36. THRUNE M., BACH A., RUIZ-MORENO M., STERN M.D., LINN J.G., 2009 – Effect of *Saccharomyces cerevisiae* on ruminal pH and microbial fermentation in dairy cows. *Livestock Science* 124, 261-265.
37. WALDRIP H.M., MARTIN S.A., 1993 – Effects of an *Aspergillus oryzae* fermentation extract and other factor on lactate utilization by the ruminal bacterium *Megasphaera elsdenii*. *Journal of Animal Science* 71, 2770-2776.

Sylwia Grochowska, Włodzimierz Nowak,
Małgorzata Lasik-Kurdyś, Robert Mikuła, Jacek Nowak

The effect of *Saccharomyces cerevisiae* on in vitro growth and fermentation of *Selenomonas ruminantium* and *Megasphaera elsdenii*

Summary

Stimulation of lactate utilization by *Selenomonas ruminantium* and *Megasphaera elsdenii* may help in reducing problems associated with rumen acidosis. The objective of this study was to determine the effect of a *Saccharomyces cerevisiae* live culture and *Saccharomyces cerevisiae* fermentation products on in vitro growth and fermentation of lactate-utilizing ruminal bacteria, *S. ruminantium* (ATCC 19205) and *M. elsdenii* (ATCC 25940). The cultures were run for 0, 6, 12, 24 and 48 h under anaerobic conditions on a growth medium supplemented with a yeast live culture (SC) or with yeast fermentation products (SCFP) and, as reference, on the same medium without supplementation (CON). Neither SC nor SCFP had a significant effect on the growth of *S. ruminantium* after 6, 12 and 24 h of incubation, but the live yeast culture significantly ($P \leq 0.05$) improved the growth of these bacteria after 48 h of incubation. The yeast fermentation products significantly ($P \leq 0.05$) decreased pH and increased lactate synthesis by *S. ruminantium*. The *Saccharomyces cerevisiae* live culture significantly improved the growth of *M. elsdenii* after 12 and 24 h of incubation, and the *S. cerevisiae* fermentation products increased its growth after 48 h. After 24 and 48 h of incubation the *Saccharomyces cerevisiae* live culture reduced the concentration of total volatile fatty acids (VFA), while caproate was the main product of in vitro fermentation of *M. elsdenii* ($P \leq 0.05$). *Saccharomyces cerevisiae* live cultures may improve microbial fibre fermentation in the rumen by maintaining optimal pH conditions.

KEY WORDS: *Saccharomyces cerevisiae* / live yeast culture / *Megasphaera elsdenii* / *Selenomonas ruminantium* / bacterial growth / fermentation / in vitro