

Wpływ nasion wiesiołka (*Oenothera paradoxa*) na produkcję metanu przez treść żwacza owiec

WOJCIECH ZAWADZKI, EDYTA WINCEWICZ, LUDMIŁA BORODULIN-NADZIEJA*

Katedra Fizjologii Zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Norwida 31, 50-375 Wrocław

*Katedra i Zakład Fizjologii Wydziału Lekarskiego AM, ul. Chałubińskiego 10, 50-368 Wrocław

Zawadzki W., Wincewicz E., Borodulin-Nadzieja L.

Investigations on the effect of evening primrose seeds (*Oenothera paradoxa*) on the methane production by ovine rumen contents

Summary

The experiments were performed on eight cross-bred sheep- (40-45 kg body weight) aged 2-4 years. The animals were fed twice daily between 6:30 a.m. and 7:30 a.m. and 1:30 p. and 2:30 p.m. The composition of the feed was 50% meadow hay and 50% C-J concentrates. Forage consumption was 2.0 kg to 2.4 kg. Rumen fluid from sheep was collected by rumen cannule 2.5 hours after morning feeding for 10 consecutive days. The results obtained in vitro experiments on the inhibiting effect of evening primrose seeds on CH₄ production, depending on the time of incubation (1 or 4 hours) and amounts of evening primrose seeds, were as follows (for 1.0 g to 5.0 g) after 1 hr – for 1.0 g – 77%, for 2.0 g – 85.2%, for 5.0 g – 86.7% but after for 4 hrs: 75.6%, 84.2% and 85.8%.

Keywords: sheep, rumen, evening primrose, methane

Wcześniejsze badania własne i innych autorów dotyczące wpływu kwasów tłuszczowych nienasyconych, a zwłaszcza linolowego, linolenowego i cis-oleinowego na przebieg metanogenezy u owiec i bydła wykazały ich inhibicyjny wpływ na produkcję metanu, co związane było z równoczesnym wzrostem ilości wytwarzanego kwasu propionowego, wydajności fermentacji lotnych kwasów tłuszczowych (LKT) i stabilizacją współczynnika wykorzystania nieglikogennych: glikogennych LKT. W konsekwencji produkcji zwierzęcej prowadziło to do wyższych przyrostów masy ciała i wełny u owiec.

Stwierdzona w 1 gramie nasion wiesiołka zawartość 20 mg kwasu γ -linolenowego i 150 mg kwasu linolowego skłoniła autorów do badań nad wpływem nasion wiesiołka (*Oenothera paradoxa*) na produkcję CH₄ w treści żwacza owiec w badaniach *in vitro*.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na 8 owcach mieszańcach międzyrasowych w wieku od 2 do 4 lat i o masie ciała od 45 kg do 55 kg. Owce karmiono dwa razy dziennie, tj. między 6.30 a 7.30 oraz między 13.30 a 14.30 według norm żywieniowych (2, 10). Procentowy skład paszy był następujący: 50% – siano łąkowe i 50% mieszanka treściwa C – J. Spożycie paszy przez każdą z owiec wynosiło od 2,0 kg do 2,4 kg, wodę do picia podawano *ad libitum*. Żywienie zwierząt uzupełniano mieszanką mineralną Polfamix-O. Skład che-

miczny siana (%) był następujący: sucha masa – 87,65, białko surowe – 12,88, włókno surowe – 22,95, tłuszcz surowy – 3,58, substancje BAW – 40,05, popiół surowy – 5,05. Owce poddawano indywidualnym zabiegom operacyjnym, w czasie których zakładano kaniule do worka grzbietowego żwacza (9). Wykonywano je w uśpieniu za pomocą dożylnego wlewu 30% alkoholu etylowego podawanego z szybkością 5-10 ml×min⁻¹ – według efektu działania. Wlew alkoholu poprzedzano dożylnym podaniem 4-6 ml preparatu Combelen. Płyn żwaczowy pobierano przez kaniule w 2,5 godz. po rannym karmieniu przez 10 kolejnych dni i inkubowano następnie w tzw. sztucznym żwaczu (6, 8, 11) w warunkach beztlenowych. Beztlenowość inkubacji sprawdzano aparatem DO-5508 firmy Lutron produkcji koreańskiej. Przesączony przez 4 warstwy aseptycznej gazy chirurgicznej płyn żwaczowy inkubowano wraz z dodatkiem 50 ml 67 mM buforu fosforanowego o pH = 6,9. Jako substraty wzrostu stosowano 10 mM mrówczan sodu względnie wodor. W przypadku używania mrówczanu sodowego hodowle inkubowano w atmosferze zawierającej 100% gazowego CO₂, a przy stosowaniu wodoru – w atmosferze 80% H₂ i 20% CO₂. Próby ślepe hodowano bez dodawania wymienionych substratów wzrostu i nasion wiesiołka, w pozostałych próbkach dodatek zmieszanych nasion wiesiołka wynosił 1,00 g, 2,00 g i 5,00 g. Poziom metanu w sztucznym żwaczu mierzono po 1 i 4 godz. i jego wartości wyrażano w $\mu\text{mol} \times \text{ml}^{-1} \times \text{h}^{-1}$, stosując jednokanalowy detektor stacjonarny gazu typu Surveyor-5 wraz z czujnikiem CEX-810 (prod. francuskiej firmy Oldham). W

ramach przeprowadzonej analizy matematycznej (13, 14) obliczono wartości średnie, odchylenie standardowe, błąd standardowy średniej, przedział ufności. Uzyskane wyniki odniesiono do próby ślepej (bez substratu) i weryfikowano z użyciem maszyny matematycznej P-100 C firmy Texas Instruments.

Wyniki i omówienie

Poziom metanu wytwarzanego podczas fermentacji żwaczowej *in vitro* obserwowano po 1 i 4 godz. ze względu na przypadający po 4 godz. inkubacji szczyt fermentacji. Odnotowano wyższy o 66,7% poziom CH_4 po 4 godz. w stosunku do 1 godz. w próbie ślepej.

Dodatek nasion wiesiołka do płynu żwaczowego pozyskanego od 8 owiec powodował w badaniach *in vitro* inhibicję produkcji metanu wynoszącą odpowiednio po 1 i 4 godz.: dla dodatku 1,00 g – 77,0% oraz 75,6%, dla dodatku 2,00 g – 85,2% oraz 84,2% i dla dodatku 5,00 g – 86,7% oraz 85,8% (tab.1), a więc na poziomie dodatku czystych kwasów: linolowego i linolenowego we wcześniejszych badaniach własnych dotyczących metanogenezy zarówno w środowisku żwacza (19), jak i w krwi tętniczej i żylniej po infuzjach dożwaczowych tych kwasów oraz kwasu cis-oleinowego (18, 22, 23).

W niniejszej pracy zachowany został konsekwentnie ten sam model eksperymentu *in vitro*, co w przypadku uprzednio prowadzonych badań własnych (17, 19-21) nad preparatami z krwi (livexami i mączką), kwasami tłuszczowymi nasyconymi (behenowym, palmitynowym i stearynowym) i nienasyconymi (cis-oleinowym, linolowym i linolenowym), siarczanem i siarczynem sodu oraz wodzianem chloralu. Model ten pozwala porównać stopień inhibicji produkcji metanu. Gaz ten jako najprostszy nasycony węglowodór jest końcowym produktem wielu reakcji biologicznych i powstaje podczas fermentacji węglowodanów w środowisku ubogim w tlen, a taka jest atmosfera żwacza, gdzie w zasadzie panują prawie beztlenowe warunki (1-3, 5, 7, 16).

Inhibicja wytwarzania CH_4 przez dodatek mielonych nasion wiesiołka do płynu żwaczowego pobranego od owiec jest 2,5 – 4 krotnie wyższa aniżeli po dodaniu substratów wzrostu, a mianowicie mrówczanu sodu i wodoru.

Jak wspomniano we wstępie pracy 1 g nasion wiesiołka zawiera 20 mg kwasu γ -linolenowego i 150 mg kwasu linolowego, a zatem wiesiołek może być naturalnie stosowanym inhibitorem metanogenezy jako dodatek do różnych zestawów paszo-

wych dla przeżuwaczy. Poza tym siła oddziaływania kwasów tłuszczowych nienasyconych jest odwrotnie proporcjonalna do ich ciężaru cząsteczkowego, a wprost proporcjonalna do ilości posiadanych w swojej budowie wiązań nienasyconych. Najsilniejsze oddziaływanie kwasu linolenowego – również i pod względem oszczędności energii (3, 4, 7, 20, 21) wynika właśnie z obecności w jego cząsteczce trzech podwójnych wiązań. Drugi z kwasów – kwas linolowy – posiada w swojej cząsteczce dwa wiązania podwójne i jak wykazały badania Zawadzkiego (20) jest nieco słabszym inhibitorem metanogenezy w porównaniu z kwasem linolenowym (o 13 do 16%).

Przeprowadzone wcześniej badania dotyczące wpływu krótkich infuzji dożwaczowych kwasów: linolowego i cis-oleinowego na zawartość metanu w krwi tętniczej i żylniej u owiec korespondują z wynikami uzyskanymi po dodaniu kwasów tłuszczowych nienasyconych do płynu żwaczowego owiec w warunkach *in vitro* (18, 22, 23).

Mechanizm działania nasion wiesiołka dodanych do płynu żwaczowego *in vitro* polega najprawdopodobniej na wyraźnym zahamowaniu aktywności fermentacyjnej pierwotniaków i wzrostu mikroorganizmów bytujących w przedżołądkach owiec. Ze względu na wstępny charakter badań nie interpretowane są tak niezwykle ważne dla fermentacji żwaczowej jej parametry, jak: poziom dwutlenku węgla, ilość produkowanych lotnych kwasów tłuszczowych (LKT) czy reakcja antagonistyczna pomiędzy metanem a kwasem propionowym (12, 20).

Tab. 1. Wpływ różnych ilości wiesiołka (*Oenothera paradoxa*) na produkcję metanu przez treść żwacza owiec *in vitro* podczas 1 h i 4 h inkubacji w temp. 39°C

Substrat dodawany do płynu żwaczowego	Ilość wiesiołka dodawana do płynu żwaczowego (g)	Metan produkowany ($\mu\text{mol} \times \text{ml}^{-1}$)		Inhibicja (%) wytwarzania CH_4	
		1 godz.	4 godz.	1 godz.	4 godz.
Próba ślepa – bez substratu	–	1,350	2,250	–	–
	1,00	0,310	0,550	77,0	75,6
	2,00	0,200	0,355	85,2	84,2
	5,00	0,180	0,220	86,7	85,8
Mrówczan sodu ($10 \text{ mmol} \times \text{l}^{-1}$)	–	2,950	4,155	–	–
	1,00	2,000*	2,880	32,2*	30,6*
	2,00	1,880	2,740	36,3*	34,0*
	5,00	1,550	2,310	47,5	44,4*
Wodór	–	1,850	2,955	–	–
	1,00	1,470*	2,410*	20,5*	18,5*
	2,00	1,390*	2,305*	24,9*	22,0*
	5,00	1,300*	2,190*	29,7*	25,9*

Objaśnienia: Wartości skrajne: odchylenia standardowe – 0,085-0,210, błąd standardowy średniej – 0,040-0,100, przedział ufności – 0,0065-0,135, *różnice statystycznie istotne przy $p \leq 0,05$ w stosunku do wartości wyjściowych

Fakt wyraźniejszego wpływu nasion wiesiołka na wytwarzanie metanu podczas fermentacji żwaczowej *in vitro* aniżeli po dodaniu do płynu żwaczowego jednej z odmian wrocławskiego, naturalnego produktu z krwi – livexu (białego, brązowego lub czarnego) oraz mączki z krwi (20, 21), dolomitów (19) i innych niekonwencjonalnych dodatków do paszy (20) każe uznać go jako kolejny czynnik sterujący procesami fermentacji u przeżuwaczy oprócz znanych już dotychczas, a wymienionych w pracach innych autorów (1, 3-5, 7) i niniejszej, modulatorów procesów fermentacji u zwierząt przeżuwających.

Reasumując należy stwierdzić, że badania produkcji metanu podczas fermentacji beztlenowej zachodzącej w środowisku żwacza *in vitro* po dodaniu nasion wiesiołka posiada oprócz aspektu poznawczego, także i praktyczny (bioenergetyczny – zapobieganie utracie energii wraz z uwalnianym metanem), ekologiczny, żywieniowo-biochemiczny i oczywiście metodyczny.

O roli mączki z nasion wiesiołka wzmiankowali między innymi Wettasinghe i Shahidi (15), podkreślając jej znaczenie jako naturalnego źródła przeciwutleniających i środka uwalniającego nadmiar nadtlenu wodoru i wolnych rodników.

Wiesiołek jest aktualnie tematem badań naukowców z różnych ośrodków oraz przedmiotem zainteresowania sympozjów i kongresów krajowych i międzynarodowych.

Piśmiennictwo

1. Borej W.: Manipulowanie procesami fermentacyjnymi u przeżuwaczy. Medycyna Wet. 1990, 46, 466-469.
2. Borej W.: Fizjologiczne podstawy żywienia przeżuwaczy. Wyd. SGGW-AR, Warszawa 1990.
3. Blaxter K. L., Czerkawski J. W.: Modification of the methane production of the sheep by supplementation of its diet. J. Sci. Agric. 1966, 17, 417-421.
4. Chalupa W.: Manipulating rumen fermentation. J. of Anim. Sci. 1977, 46, 585-599.

5. Czerkawski J. W.: Methane production in ruminants and its significance. World Rev. Nutr. Diet. 1969, 11, 240-282.
6. Czerkawski J. W.: The artificial rumen. Lab. Practice 1976, 25, 15-21.
7. Czerkawski J. W.: An introduction to rumen studies. Pergamon Press, Oxford 1986.
8. Daniels L., Zeikus J. G.: Improved culture flash for obligate anaerobes. Appl. Microbiol. 1975, 29, 710-711.
9. Dejneka J., Zięba D.: Przyczynnik do wytwarzania kaniulowych przetok żwacza u owiec. Zesz. Nauk. AR. Wroc. Wet. 1965, 19, 177-180.
10. Jarige R.: Żywienie przeżuwaczy. INRA, Omnitech Press, Jabłonna 1993.
11. Johnson R. R.: Techniques and procedures for *in vitro* and *in vivo* rumen studies. In book: Techniques and procedures in Animal Science c/o Q. Corporation 49 Sheridan Avenue, Albany, N.Y. 12210, 175-196.
12. Nevel C. J. van, Prins R. A., Demeyer D. I.: On the relationship between methane and propionate in the rumen. Z. Tierphysiol. 1974, 33, 121-127.
13. Puchalski T.: Statystyka. Wykład podstawowych zagadnień. PWN, Warszawa 1980, 91-103 i 253-259.
14. Sawicki F.: Elementy statystyki dla lekarzy. PZWL, Warszawa 1982.
15. Wettasinghe M., Shahidi F.: Evening primrose meal: a source of natural antioxidants and scavenger of hydrogen peroxide and oxygen-derived free radicals. J. Agric. Food Chem. 1999, 47, 1801-1812.
16. Wolin M. J.: A theoretical rumen fermentation balance. J. Dairy Sci. 1960, 40, 1452-1456.
17. Zawadzki W.: Wpływ livexu brązowego, suszonego (modyfikowanego serwatka) na metanogenezę i wartość energetyczną treści żwacza owiec *in vitro*. Zesz. Nauk. AR Wroc. Wet. 1988, 46, 71-77.
18. Zawadzki W.: Wpływ krótkich infuzji dożwaczowych kwasów linolowego i cis-oleinowego na zawartość metanu we krwi owiec. Pol. Arch. Wet. 1989, 29, 167-176.
19. Zawadzki W.: Produkcja metanu przez inkubaty treści żwacza owiec w warunkach *in vitro* pod wpływem różnych ilości dodawanego dolomitu. Zesz. Nauk. AR Wroc., Wet. 1997, 57, 97-104.
20. Zawadzki W.: Wpływ wybranych niekonwencjonalnych dodatków do paszy na przebieg procesów fermentacyjnych w żwaczu owiec. Zesz. Nauk. AR Wroc. Wet., Rozpr. Hab. 1993, 112.
21. Zawadzki W., Brzęk K., Jeszka J.: Changes of energetic value and protein level of rumen content in sheep fed with stuff with livex and blood meal supplementation. Arch. Vet. Pol. 1992, 32, 101-107.
22. Zawadzki W., Załucki G., Romański K., Muzyczak J.: Badania nad zawartością metanu w krwi tętniczej i żyłnej u owiec. Biul. VI Zjazdu PTNW, Wrocław t.I, 1978, 303.
23. Zawadzki W., Załucki G., Romański K., Muzyczak J.: Zawartość metanu w krwi tętniczej i żyłnej u owiec po dożwaczowych infuzjach kwasów tłuszczowych nienasyconych: linolowego i cis-oleinowego. Mat. VII Kongresu PTNW, Lublin 1983, 126-127.

Adres autora: dr hab. Wojciech Zawadzki, prof. nadzw., ul. Bacciarellego 1 m. 6, 51-649 Wrocław; e-mail: waza@ozi.ar.wroc.pl

LISTY DO REDAKCJI

Wrocław, dn. 13.06.2001 r.

Katedra Fizjologii Zwierząt
Wydział Medycyny Wet. AR

Redakcja
„Medycyny Weterynaryjnej”
w Lublinie

W numerze 6/2001 „Medycyny Weterynaryjnej” ukazał się artykuł mojego autorstwa oraz Stanisława Klimentowskiego, Ewy Śmielewskiej-Łoś, Zdzisława Jopka, Ewy Kucharczak pt. „Nosicielstwo bakterii i grzybów u dzikich szczurów w zależności od środowiska bytowania”, który w swojej treści zawiera błąd merytoryczny – w tabeli nr 3 oraz w tekście na stronie 405. Dotyczy on *Nocardia spe-*

cies zaliczonej w artykule do grzybów. Zajmują one pozycję pośrednią między bakteriami a grzybami, ale są klasyfikowane w rzedzie *Actinomycetales*, rodzina *Nocardiaceae*, nie należą zatem do grzybów. W imieniu autorów przepraszam Czytelników „Medycyny Weterynaryjnej” za powstałe uchybienie, mając mimo wszystko nadzieję, że artykuł nasz wyjaśni szerzej rolę szczurów w transmisji zakażeń bakteryjnych i grzybiczych w środowisku, uzupełniając i aktualizując dotychczasową wiedzę na ten temat.

Ponadto pragnę poinformować, że za zaistniałą sytuację Redakcja nie ponosi odpowiedzialności.

Z wyrazami szacunku

Edyta Winiewicz