

# Wpływ toltrazurilu na fermentację w jelicie ślepych królika

WOJCIECH ZAWADZKI, STANISŁAW GRACZYK\*, ANDRZEJ POŁOZOWSKI\*\*, ALBERT CZERSKI, MARCIN ZAWADZKI\*\*\*

Katedra Fizjologii Zwierząt,

\*Katedra Anatomii Patologicznej, Patofizjologii, Mikrobiologii i Weterynarii Sądowej Zakładu Patofizjologii,

\*\*Katedra Chorób Wewnętrznych i Pasożytniczych z Kliniką Chorób Koni, Psów i Kotów,

\*\*\*Katedra i Klinika Rozrodu, Chorób Przeżuwaczy oraz Ochrony Zdrowia Zwierząt

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

Zawadzki W., Graczyk S., Połozowski A., Czerski A., Zawadzki M.

## Effect of toltrazuril on the ceecal fermentation in rabbits

### Summary

The research was carried out on 24 Californian breed rabbits, aged 12 weeks, weighing between 1.8 and 2.2 kg, from which the caecum content were taken and placed in fermentation *in vitro*. 0.15 ml of toltrazuril was added to the content in the vessels (the experimental group), which resulted in the final concentration of 25 ppm of toltrazuril in the vessel. In the analyses of gases obtained during fermentation it was determined that CO<sub>2</sub> had the most substantial percentage, above 70%, CH<sub>4</sub> had a smaller percentage of 15% of the gases produced in the caecum content, while hydrogen and hydrogen sulphide had the least considerable portion of it. During the fermentation the amount of the gases produced changed and the zenith of fermentation took place between the second and fourth hour of incubation. The addition of toltrazuril to the caecum content of a rabbit leads to an increase in the value of CO<sub>2</sub>:CH<sub>4</sub> not observed in the control experiments. The addition of toltrazuril causes the increase in the hydrogen level which may result from changes in either the composition or activity of bacteria releasing H<sub>2</sub>.

**Keywords:** rabbit, toltrazuril, caecum

W zwalczaniu kokcydiozy zastosowanie znalazły środki, których efektem ubocznym może być zmiana w przebiegu procesów trawiennych (10). Dostępne dane z tego zakresu dotyczą głównie doświadczeń z użyciem kokcydiostatyków jonoforowych. Środkiem bardzo często stosowanym w zwalczaniu kokcydiów u wielu gatunków zwierząt, w tym królików, jest wprowadzony do praktyki w 1986 roku toltrazuril, związek z grupy triazolinonów. Jego wysoka skuteczność związana jest z zaburzeniem oddychania komórkowego u pasożytów. Preparat wykazuje działanie zarówno przeciwko formom wewnątrz-, jak i zewnątrzkomórkowym pasożyta. W dostępnym piśmiennictwie brak jest danych dotyczących wpływu tej substancji na przebieg procesów zachodzących w jelicie ślepych królika.

Celem pracy było określenie wpływu toltrazurilu, na przebieg fermentacji treści jelita ślepego *in vitro*, a przede wszystkim ocena kinetyki wytwarzania gazów – ubocznych produktów fermentacji.

### Materiał i metody

Badania przeprowadzono na 24 królikach rasy kalifornijskiej w wieku 12 tygodni, o masie od 1,8 do 2,2 kg. Zwierzęta karmiono *ad libitum*, zgodnie z obowiązującymi normami żywieniowymi (12), standardową mieszanką granulowaną

FK/W (prod. Dolpasz S.A.). Jeden kilogram ww. mieszanki zawierał odpowiednio: białka ogólnego – 18,0%, tłuszczu surowego 3-7%, włókna surowego 8%, popiołu surowego 5-6%. Przez okres doświadczenia króliki miały swobodny dostęp do wody. Treść jelita ślepego poddano fermentacji *in vitro*, postępując wg metodyki opisanej we wcześniejszych pracach (8, 12, 13). Pobraną od każdego królika treść jelita ślepego podzielono na dwie części po 20 ml. Pobraną treść (20 ml) rozcieńczono 5-krotnie wodą destylowaną do 100 ml i wiano do płuczki destylacyjnej. Do płuczki dodawano również 50 ml buforu o pH 6,9, który w 1 dm<sup>3</sup> zawierał: NaHCO<sub>3</sub> – 9,60 g/dm<sup>3</sup>, KCl – 0,60 g/dm<sup>3</sup>, CaCl<sub>2</sub> – 0,04 g/dm<sup>3</sup>, CaCl<sub>2</sub> × 6 H<sub>2</sub>O – 0,01 g/dm<sup>3</sup>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> × 12 H<sub>2</sub>O – 9,15 g/dm<sup>3</sup>, NaCl – 0,45 g/dm<sup>3</sup>, MgSO<sub>4</sub> × 7 H<sub>2</sub>O – 0,11 g/dm<sup>3</sup>, ZnSO<sub>4</sub> × H<sub>2</sub>O – 0,06 g/dm<sup>3</sup>, NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> – 0,50 g/dm<sup>3</sup>. Całkowita objętość inkubacyjna treści w płuczce po rozcieńczeniu wynosiła 150 ml. Inkubację prowadzono łaźni wodnej o temp 39°C, w hermetycznie zamkniętych płuczkiach o pojemności 300 ml, wykonanych wg projektu własnego (8, 12) w oparciu o tzw. model sztucznego żwacza. Do treści części z płuczek (grupa doświadczalna) dodano 0,15 ml toltrazurilu (Baycox 2,5% – Bayer), uzyskując końcowe stężenie toltrazurilu w płuczce 25 ppm (poziom osiągnięty w treści jelita ślepego przy stosowaniu terapeutycznym preparatu u królików). W doświadczeniach kontrolnych badano fermentację bez dodatku toltrazurilu. W celu zapewnienia warunków beztlenowych atmosferę płuczek wysycano przez 15 min. azotem. Warunki beztleno-

we inkubacji sprawdzano aparatem DO-5508 (Lutron – Korea). Całkowitą ilość wytwarzanych gazów odczytywano na podłączonych do płuczek manometrach, stosując technikę opisaną przez Zawadzkiego i wsp. (14). Natomiast celem związania  $\text{CO}_2$  uwalnianego w trakcie fermentacji do zbiorniczka centralnego jednej z płuczek wprowadzono 10 ml 50% roztworu KOH. Bezwzględna ilość  $\text{CO}_2$  obliczano na podstawie różnicy objętości zawartej w płuczkach bez i z dodatkiem KOH (12). Zawartość metanu określano za pomocą aparatu typu Barbara-3 (15). Pozostałe gazy powstające podczas fermentacji treści jelita ślepego ( $\text{CO}$ ,  $\text{H}_2$ ,  $\text{H}_2\text{S}$  oraz  $\text{C}_x\text{H}_y$ ) oznaczano aparatem Orsata oraz przenośnym aparatem do oznaczania  $\text{CO}_2$ ,  $\text{CO}$ ,  $\text{H}_2\text{S}$  i  $\text{SO}_2$ , postępując podobnie jak to opisano we wcześniejszych pracach (11, 12, 15). Oceny fermentacji na podstawie ilości produkowanych gazów dokonywano po 1, 2, 4 i 6 godzinach inkubacji.

Wyniki przedstawiono w postaci średniej arytmetycznej, odchylenia standardowego (SD) oraz średniego błędu średniej (SDM). Uzyskane wyniki weryfikowano testem t-Studenta.

### Wyniki i omówienie

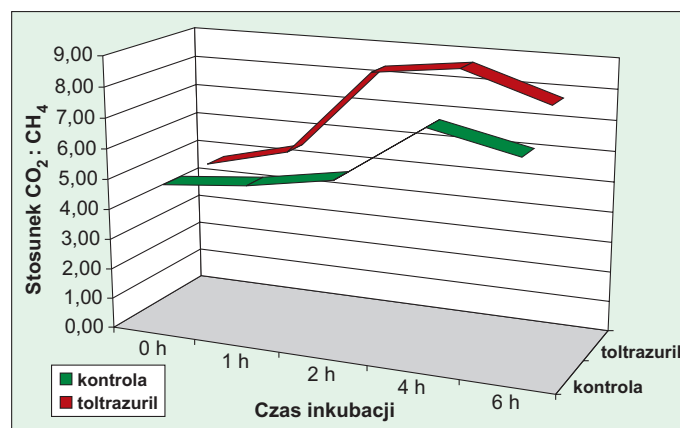
Jelito ślepe królika zasiedla celulolityczna i fibrolityczna flora bakteryjna, posiadająca zdolność fermentacyjnego rozkładu cukrów strukturalnych zawartych w treści pochodzenia roślinnego. Powstają metabolity, które inkorporowane są do komórek bakteryjnych oraz wchłaniają się przez ścianę jelit do krwiobiegu. Oprócz tego organizm, trawiąc białko bakteryjne, wtórnie wykorzystuje substancje zawarte w paszy. Głównymi produktami energetycznymi powstającymi podczas bakteryjnej fermentacji, a wykorzystywanymi przez zwierzęta są lotne kwasy tłuszczowe (Volatile fatty acids – VFA). W procesie fermentacji powstają również produkty uboczne, takie jak  $\text{CO}_2$ ,  $\text{CH}_4$  oraz w niewielkich ilościach  $\text{H}_2$  i inne gazy (2, 13, 14).

Pracę ukierunkowano na analizę gazów powstających podczas fermentacji treści jelita ślepego królików oraz na wpływ toltrazurilu na procesy fermentacji. Skład procentowy gazów otrzymywanych w próbach kontrolnych, jak i w próbach z dodatkiem toltrazurilu przedstawiono w tabeli nr 1. Dane te potwierdzają wcześniejsze obserwacje dotyczące udziału procentowego poszczególnych gazów produkowanych podczas fermentacji treści jelita ślepego królika (12, 13). Największy, bo ponad 70% udział posiada  $\text{CO}_2$ .

Mniej, bo około 15% produkowanych w treści jelita ślepego gazów stanowi  $\text{CH}_4$ , nieznaczną część stanowi wodór oraz inne gazy (tab. 1). Równocześnie wykazano, że w trakcie fermentacji ilość produkowanych gazów ulega zmianie, a szczyt fermentacji, określany na podstawie ilości gazów, przypada pomiędzy drugą a czwartą godziną inkubacji (tab. 1).

Oprócz oceny dynamiki wytwarzania gazów w treści jelita ślepego królika, celem omawianego doświadczenia było określenie wpływu na przebieg fermentacji jednego z kokcydiostatyków – toltrazurilu. Jego skuteczność w stosunku do kokcydiów przewodu pokarmowego została potwierdzona w licznych pracach doświadczalnych (1, 10). Natomiast jego wpływ na florę bakteryjną zasiedlającą przewód pokarmowy a tym samym przebieg fermentacji jest słabo poznany.

Proces fermentacji charakteryzuje kilka parametrów. Podstawowym parametrem, obok wydajności fermentacji i współczynnika utylizacji VFA, jest stosunek  $\text{CO}_2 : \text{CH}_4$ . W tym kontekście analiza zebranych na wykresie nr 1 wartości wskaźnika  $\text{CO}_2 : \text{CH}_4$  pozwala na stwierdzenie, że dodanie do treści jelita ślepego królika toltrazurilu prowadzi do jego wzrostu. Spostrzeżenie to wydaje się interesujące, ukazuje bowiem dynamikę oraz charakter zmian fermentacji zachodzących pod wpływem badanego kokcydiostatyku. Nie pozwala jednak na wyjaśnienie mechanizmu odpowiedzialnego za opisane zmiany. Mechanizmy, o których mowa, bardziej przybliży analiza dynamiki wytwarza-



Ryc. 1. Zmiany stosunku  $\text{CO}_2 : \text{CH}_4$  w fermentowanych próbach treści jelita ślepego królików

Tab. 1. Procentowy skład gazów wytwarzanych w jelicie ślepym królików przed i po dodaniu toltrazurilu po 1, 2, 4 i 6 godzinach inkubacji *in vitro*

Gazy	Czas inkubacji (godz.)									
	Doświadczenia kontrolne					Po dodaniu toltrazurilu				
	0	1	2	4	6	0	1	2	4	6
$\text{CO}_2$	70,50	76,00	84,80*	85,50*	70,80	70,50	78,00*	86,20*	87,30*	74,55
$\text{CH}_4$	14,80	15,10	15,40	11,50*	10,40*	14,80	14,30	10,40*	10,05**	9,60**
$\text{H}_2$	0,60	2,70**	3,90***	1,60*	0,40	0,60	2,50**	4,30***	5,15***	0,90
$\text{H}_2\text{S}$	0,60	0,70	1,00*	0,80	0,50	0,60	0,80	0,85	0,90	0,80

Objaśnienia: Wartości skrajne: odchylenie standardowe (SD): 0,200-0,320; średni błąd średniej (SDM): 0,120-0,155; przedział ufności (CI): 0,165-0,190; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*  $p \leq 0,05$

nia poszczególnych gazów. Przy opisanych, niewielkich zmianach w udziale procentowym CO<sub>2</sub> oraz CH<sub>4</sub>, interesująca jest dynamika wytwarzania trzeciego z oznaczanych gazów, a mianowicie wodoru. W próbach kontrolnych, przy niskim poziomie wyjściowym tego gazu, jego wytwarzanie już po godzinie szybko wzrasta, osiągając największą wartość po dwóch godzinach inkubacji, po czym także szybko spada, osiągając w 6. godzinie poziom wyjściowy (tab. 1). Inaczej przebiega wytwarzanie wodoru, podczas inkubacji treści jelita ślepego królika z dodatkiem toltrazurilu. Po początkowym niskim poziomie wytwarzania, zbliżonym do kontroli, w drugiej godzinie inkubacji obserwuje się ponad 10% wzrost, aby w czwartej godzinie osiągnąć poziom przewyższający trzykrotnie wartości grupy kontrolnej. W szóstej godzinie inkubacji, przy nieznacznie wyższej wartości w próbach doświadczalnych, ilość wodoru obniża się prawie do poziomu wyjściowego (tab. 1). Odnotowane tak wyraźne różnice w poziomie wodoru nie mogą być kwestią przypadku. Z uwagi na to, że w pracy nie analizowano lotnych kwasów tłuszczowych, interpretacja zmian oraz przypuszczalny ich mechanizm jest trudny do określenia. Odnosząc jednak wyniki te do sugestii innych autorów (3, 5-7, 12), można twierdzić, że odnotowany w próbach doświadczalnych wzrost poziomu wodoru wynika ze zmiany składu czy też aktywności mikroflory uczestniczącej w uwalnianiu H<sub>2</sub>. Uwzględniając zmiany w populacji mikroorganizmów warto podkreślić, że produkcja metanu jest wyższa przy stosowaniu diet bogatych we włókno niż diet o niskiej zawartości włókna (2, 11, 15). Wynika to z faktu, że degradacja włókna prowadzi do produkcji wodoru, z którego podczas redukcji CO<sub>2</sub> powstaje metan (4). Główne gatunki bakterii celulołitycznych produkujących wodór stanowią *R. flavefaciens* i *R. albus*.

Opublikowano wiele prac dotyczących antybakteryjnego działania i wpływu, zwłaszcza antybiotyków jonoforowych na metabolizm flory przewodu pokarmowego zwierząt (1, 6, 10).

Marounek i wsp. (5, 6) wykazali, że dodanie do treści jelita ślepego królika antybiotyków jonoforowych (salinomycyny, monenzyny, lasalocidu, maduramycyny) znacznie wzmacnia wytwarzanie metanu, przy malejącej równocześnie produkcji octanów. Wszystkie użyte jonofory podnosiły odzysk wodoru. Stymulujące działanie użytych jonoforów autorzy ci tłumaczą efektem hamowania konkurencyjnych reakcji zużycia wodoru, który jest wykorzystywany w metanogenezie. Powołują się przy tym na badania Bernariera i wsp. (cyt. za 5) z roku 1993, wskazujące na konkurencję metanogenezy i acetogenezy o wodór. Niski poziom odzysku wodoru jako donora elektronów w procesie redukcji CO<sub>2</sub> do octanów jest wg Demeyer (3) typowym zjawiskiem dla środowiska końcowych odcinków jelit u królika.

Badania metanogenezy w żwaczu i jelicie grubym u cieląt wykazały, że odzysk wodoru w trakcie fermentacji w żwaczu jest dodatkowo skorelowany z wielkością produkcji metanu, a metanogeneza była stymulowana obecnością w treści żwacza pierwotniaków (9).

Również u królika w treści jelita ślepego występują pierwotniaki, które uzupełniają dominujące populacje bakteryjne. W badaniach opartych na analizie kwasów nukleinowych wykazano jednak, że w treści jelita ślepego królika ilość eukariotycznego RNA jest niewielka (poniżej 7% całego RNA), ulegając wzrostowi po odsadzeniu. Wykazano przy tym, że większość jelitowego RNA jest pochodzenia roślinnego, a niewielka część pochodzi z komórek własnych organizmu, pozostała zaś to RNA takich organizmów, jak *Saccharomycopsis guttulata* oraz pierwotniaków z typu *Ciliophora* (7).

Trudno jest jednoznacznie rozstrzygnąć, czy opisane zmiany w produkcji gazów, jakie odnotowano w próbach zawierających toltrazuril, są rezultatem zniszczenia populacji pierwotniaków, czy też ubocznym efektem jego oddziaływania na populacje bakteryjne występujące w treści jelita ślepego. Ewidentna jest jedynie zmieniona pod jego wpływem kinetyka procesów fermentacyjnych, o czym świadczą wykazane zmiany poziomu wytwarzanego wodoru.

## Piśmiennictwo

- Balicka-Laurans A., Ramisz A., Niedźwiadek S., Bielański P.: Wpływ preparatu Baycox na efekty produkcyjne i przebieg kokcydiozy u królików. Rocz. Nauk. Zoot. 1992, 19, 241-250.
- Barej W.: Manipulowanie procesami trawiennymi u przeżuwaczy. Medycyna Wet. 1990, 46, 466-469.
- Demeyer D., De Graeve K., Durand M., Stevani J.: Acetate: a hydrogen sink in hindgut fermentation as opposed to rumen fermentation. Acta Vet. Scand. Suppl. 1989, 89, 68-75.
- Jensen B. B.: Methanogenesis in monogastric animals 20. Envir. Monitoring Assess. 1996, 42, 99-112.
- Marounek M., Fievez V., Mbanzanihigo L., Demeyer D., Maertens L.: Age and incubation time effects on in vitro caecal fermentation pattern in rabbits before and after weaning. Arch. Tierernahr. 1999, 52, 195-201.
- Marounek M., Simunek J., Duskova D., Skrivanova V.: Effect of ionophores on in vitro caecal fermentation in rabbits. J. Agr. Sci. 1997, 128, 495-498.
- Michalet-Doreau B., Fernandez I., Fonty G.: A comparison of enzymatic and molecular approach to characterize the cellulolytic microbial ecosystems of the rumen and cecum. 2002, 80, 790-796
- Położowski A., Stefaniak T., Zawadzki W., Graczyk S.: Próba określenia profilu fermentacji w jelicie ślepych kury, kozy i królika. Mat. X Kongresu PTNW, Wrocław 19-21 września 1996, t. I, s. 94.
- Schonhosen U., Zitan R., Kuhla S., Jentsch W., Derno M., Voigt J.: Effects of protozoa on methane production in rumen and hindgut of calves around time of weaning. Arch. Anim. Nutr. 2003, 57, 279-295.
- Skrivanova V., Marounek M., Tumova E., Skrivan M., Pavlasek I.: The effect of antimicrobial feed additives and anticoccidials supplementation on nutrient digestibility, performance and health of broiler rabbits. Vet. Med. - Czech. 1997, 42, 225-231.
- Zawadzki W.: The influence of some nonconventional feeds additives on the course of rumen fermentation in sheep. Sci. Lett. (Wrocław, Agric. University). Dissertation 1993, 112, 5-76.
- Zawadzki W., Położowski A.: Model fermentacji w treści jelit ślepych królików in vitro. Pattern conditions of caecal fermentation in rabbits in vitro. Sci. Lett. (Wrocław, Agric. University) 1997, 57, 105-113.
- Zawadzki W., Położowski A., Popiel J., Trochowska E.: Skład gazów jelita ślepego u konia, kozy i królika w badaniach in vitro. Sci. Lett. (Wrocław, Agric. University) 1999, 59, 85-92.
- Zawadzki W., Zawadzki Z., Załucki G.: Wpływ diet i pór roku na wytwarzanie in vitro metanu przez mieszaną florę bakteryjną żwacza owiec. Medycyna Wet. 1982, 38, 63-65.
- Zawadzki W., Zawadzki Z., Załucki G., Leroch Z.: Wytwarzanie metanu przez hodowlę flory bakteryjnej żwacza cieląt. Medycyna Wet. 1984, 40, 60-62.

Adres autora: prof. dr hab. Wojciech Zawadzki, ul. Norwida 31, 50-375 Wrocław