Wpływ kwasów huminowych w dawkach dla owiec na aktywność enzymatyczną żwacza¹⁾

MAŁGORZATA P. MAJEWSKA, RENATA MILTKO, JACEK SKOMIAŁ, BARBARA KOWALIK

Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego, Polska Akademia Nauk, ul. Instytucka 3, 05-110 Jabłonna

Otrzymano 05.06.2017

Zaakceptowano 08.08.2017

Majewska M. P., Miltko R., Skomiał J., Kowalik B.

Influence of humic acid supplemented to sheep diets on rumen enzymatic activity

Summary

The objective of the present study was to investigate how different levels of natural humic acid in the diet affect the hydrolases activity in the rumen of sheep. The experiment was carried out on three rumen-fistulated adult sheep. The control animals were fed a diet (K) containing 59.7% meadow hay, 28.4% crushed barley, 9.8% soybean oil meal and 2.1% vitamin mineral mixture. The experimental diets were composed of the control ration supplemented with humic acid (HUMAC natur AFM[®] containing 65% humic acid in dry matter) and supplied at doses of 10 g · d⁻¹ (diet H10) or 20 g · d⁻¹ (diet H20). Samples of rumen digesta were collected just before the morning feeding, as well as 2, 4, and 8 h afterwards. In the present study, the cellulolytic activity in the rumen digesta was higher ($P < 0.01$) in sheep fed the K diet than it was in animals fed the H20 ration 2 h after feeding. However, the effect of humic acid on the cellulose degradation rate depended on the content of humic acid in the diet. The cellulolytic activity was increased 2 h after feeding in sheep fed the H10 diet as compared with animals fed the H20 ration ($P < 0.05$). Sampling time had significant influence on the hydrolases activity in the rumen of sheep. In sheep fed the H10 ration, the cellulolytic activity was higher 8 h after feeding than it was before feeding and 4 h after feeding ($P < 0.05$). In the H10 and H20 groups, the xylanolytic activity was higher before feeding, but lower than it was in the control group K. The degradation rates of xylan were decreased 2 and 4 h after feeding in sheep fed the H10 and H20 rations and then increased 8 h after feeding ($P < 0.05$). In sheep fed the H20 diet, the amylolytic activity 8 h after feeding was higher than it was 2 h after feeding ($P < 0.05$). The effect of humic acid on the hydrolases activity in the rumen of sheep is not uniform and depends on the quantity of humic acid in the diet and on sampling time. Humic acid present in commercial HUMAC natur AFM[®] product enhances the initial rate of cellulose degradation in the rumen at a dose of 10 g · d⁻¹. Thus, it may suggest that humic acid stimulates the growth of fibrolytic microorganisms in the rumen. On the other hand, the present results suggest that humic acid may reduce the rate of carbohydrate degradation in the rumen, since a higher hydrolases activity was observed before morning feeding and 8 h afterwards.

Keywords: humic acid, hydrolases, rumen, sheep

W ostatnich latach wzrosło zainteresowanie użyciem związków humusowych w żywieniu zwierząt. Substancje humusowe traktowane są jako naturalne i bezpieczne dodatki paszowe, wpływające pozytywnie na dobrostan zwierząt oraz poprawiające jakość produktów pochodzenia zwierzęcego (10, 12). W niektórych badaniach wykazano, że związki te mogą hamować rozwój bakterii patogennych w jelicie cienkim oraz wiązać mikotoksyny (6). Yörürk i wsp. (13) stwierdzili większą produkcję jaj, mniejszą liczbę upadków oraz mniejsze zużycie paszy podczas stosowania 0,1% i 0,2% substancji humusowych w dietach dla kur niosek w stosunku do ptaków z grupy

kontrolnej. Związki humusowe – kwasy huminowe i fulowowe oraz huminy, są naturalnymi substancjami organicznymi znajdującymi się w glebie, powstającymi w procesie mikrobiologicznego rozkładu materii organicznej. Spośród tych związków kwasy huminowe są głównym ich komponentem. Jest to frakcja nierozpuszczalna w kwaśnych roztworach ($\text{pH} < 2$), natomiast rozpuszczalna w roztworach o wyższym odczynie. Kwasy te charakteryzuje wysoka masa cząsteczkowa od 5000 do 10 000 Da.

Badania nad zastosowaniem kwasów huminowych dotyczyły głównie zwierząt monogastrycznych. Niewiele jest doświadczeń z użyciem tego dodatku w żywieniu przeżuwaczy i jego wpływu na wskaźniki procesów trawiennych w żwaczu. Przemiany zachodzące w żwaczu decydują w znacznym stopniu

¹⁾ Praca zaprezentowana na XLVI Sesji Naukowej Sekcji Żywienia Zwierząt Komitetu Nauk Zootechnicznych i Akwakultury Polskiej Akademii Nauk, Lublin, 21-23.06.2017 r.

o zaopatrzeniu przeżuwaczy w energię i składniki odżywcze, wpływając na wielkość produkcji oraz stan zdrowia zwierząt. Zależą one od zbilansowania dawki pokarmowej, a także od wzbogacenia jej w naturalne dodatki paszowe, takie jak: probiotyki, prebiotyki oraz związki humusowe (5, 11). W nielicznych badaniach dotyczących wpływu kwasów huminowych na procesy trawienne w żwaczu stwierdzono zmniejszenie liczebności pierwotniaków i wzrost syntezy białka bakteryjnego oraz zmniejszenie stężenia lotnych kwasów tłuszczowych (3, 11). Wykorzystanie składników odżywczych przez mikroorganizmy żwacza zależy od aktywności ich enzymów, dlatego poszukuje się takich dodatków paszowych, które wpłyną na procesy trawienne w żwaczu, a w konsekwencji polepszą jakość produktów końcowych – mięsa i mleka.

Celem badań było określenie wpływu różnych ilości kwasów huminowych w dawkach pokarmowych na aktywność enzymów hydrolitycznych w żwaczu owiec.

Materiał i metody

Zwierzęta i żywienie. Doświadczenie przeprowadzono na trzech przetokowanych do żwacza owcach rasy polska owca nizinna o średniej masie ciała $55,5 \text{ kg} \pm 0,5$, w układzie naprzemiennym. Zwierzęta karmione były dwa razy dziennie, miały stały dostęp do wody i lizawek solnych. Dawka kontrolna (K) składała się z siana łąkowego (59,7%), pasz treściwych (38,2%) oraz mieszanki mineralno-witaminowej (2,1%). Skład dawki pokarmowej i jej wartość pokarmową podano w tab. 1. Diety doświadczalne zostały wzbogacone preparatem HUMAC natur AFM[®], zawierającym 65% kwasów huminowych w suchej masie (SM) (tab. 2), w ilości 10 (H10) lub 20 $\text{g} \cdot \text{d}^{-1}$ (H20). Zwierzęta w ciągu doby pobrały 917,9 g SM. Dawka pokarmowa zawierała 15,2% białka ogólnego w SM.

Pobieranie próbek i analizy chemiczne. Po okresie adaptacyjnym wynoszącym 21 dni, kiedy zwierzęta otrzymywały pasze doświadczalne, przez okres 2 dni pobierano próby treści żwacza przed karmieniem (0) oraz 2, 4, i 8 godzin po podaniu pasz. Treść żwacza w ilości około 300 g pobierano z kilku miejsc worka żwaczowego, dokładnie mieszano i próbę w ilości około 50 g zamrażano w temperaturze -20°C do czasu wykonania analiz. Pozostałą treść niezwłocznie wprowadzano do przedżołądka.

Ekstrakcję enzymów z treści żwacza przeprowadzano w obecności buforu fosforanowego, CCl_4 i lizozymu. Mieszaninę inkubowano w temperaturze 37°C przez 3 godziny, a następnie odwirowywano (4). Otrzymany supernatant stanowił frakcję enzymatyczną, którą ponownie inkubowano w temperaturze 40°C przez 1 godzinę w obecności ww. buforu i odpowiednich substratów: karboksymetylocelulazy, skrobi ziemniaczanej, pektyny cytrusowej i ksylanu bukowego. Po tym czasie, w celu zatrzymania reakcji, dodano kwas 3,5-dwunitrosalicylowy i próby inkubowano w temperaturze 100°C przez 5 minut. Szybkość trawienia węglowodanów – skrobi, pektyny, celulozy i ksylanu przez frakcję enzymatyczną treści żwacza oznaczono jako ilość uwolnionych cukrów redukujących podczas inkubacji (8). Ilość tych cukrów oznaczono spektrofotometrycznie przy

Tab. 1. Udział pasz oraz wartość pokarmowa dawki podstawowej dla owiec

Składniki dawki	%SM	Wartość pokarmowa	%SM
Siano łąkowe	59,7	Masa organiczna	94,1
Śruta jęczmienna	28,4	Białko ogólne	15,2
Poekstrakcyjna śruta sojowa	9,8	Skrobia	24,7
Mieszanka mineralno-witaminowa ¹	2,1	Włókno surowe	20,3
		NDF	51,1
		ADF	25,9
		ADL	4,0
		Celuloza	22,0
		JPŻ · kg^{-1}	0,8
		BTJN · g^{-1}	95,3
		BTJE · g^{-1}	95,5

Objaśnienia: ¹Składniki mieszanki mineralno-witaminowej w 1 kg: Ca – 246 g, Na – 80 g, P – 20 g, Mg – 30 g, S – 1,2 g, Zn – 1 g, Cu – 30 mg, Mn – 60 mg, Se – 30 mg, witamina A – 700 000 UI, witamina D₃ – 140 000 UI, witamina E – 1500 UI, niacyna – 500 UI. SM – sucha masa; NDF – włókno neutralno-detergentowe; ADF – włókno kwaśno-detergentowe; ADL – lignina kwaśno-detergentowa; JPŻ – jednostka paszowa produkcji żywca; BTJN – białko trawione do końca jelita, szacowane na podstawie dostępnego azotu; BTJE – białko trawione do końca jelita, szacowane na podstawie dostępnej energii

Tab. 2. Skład preparatu HUMAC natur AFM[®]

Związki humusowe (%SM)		Składniki mineralne ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ SM)	
Kwasy huminowe	65,0	Wapń	42,3
Kwasy fulwonowe	5,0	Magnez	5,1
		Żelazo	19,0
		Cynk	37,0
		Miedź	15,0
		Cynk	37,0
		Mangan	142,0
		Kobalt	1,2
		Selen	1,7
		Molibden	2,7

długości fali 560 nm. Skład chemiczny pasz oraz suchą masę treści żwacza oznaczono wg AOAC (1).

Analiza statystyczna. Otrzymane wyniki opracowano statystycznie, stosując analizę wariancji z wykorzystaniem ogólnego modelu liniowego (GLM). Model liniowy zawierał dwa czynniki: rodzaj dawki i czas pobrania próby, a także interakcję pomiędzy czynnikami. Istotność różnic pomiędzy grupami określono testem Tukeya. Różnice uznano za statystycznie istotne na poziomie istotności $p \leq 0,05$ i $p \leq 0,01$. Do obliczeń statystycznych wykorzystano procedury programu Statistica 10,0 (9).

Wyniki i omówienie

Aktywność celulolityczna treści żwacza była większa u owiec otrzymujących dawkę K niż u zwierząt karmionych dietą H20, dwie godziny po karmieniu ($p < 0,01$) (tab. 3). Szybkość trawienia celulozy zale-

Tab. 3. Aktywność enzymów hydrolitycznych w treści żwacza owiec (μM uwolnionych cukrów redukujących $\cdot \text{g}^{-1} \text{SM} \cdot \text{min}^{-1}$)

Aktywność enzymatyczna *	Dawka (D)	Czas pobrania (T)				SEM	D	T	D $\times$ T
		0 h	2 h	4 h	8 h				
Amylolityczna	K	6,9 ^x	8,8	9,6 ^x	10,2 ^y	0,42	0,377	< 0,00	0,166
	H10	8,0	7,4	8,7	9,1	0,30			
	H20	8,3	7,5 ^x	8,3	10,0 ^y	0,32			
Pektynolityczna	K	14,4	14,2	13,1 ^x	16,7 ^y	0,45	0,139	0,004	0,063
	H10	14,1	12,8 ^x	14,9 ^y	13,6	0,29			
	H20	13,5	12,2	13,5	15,5	0,51			
Celulolityczna	K	36,7	37,7 ^A	27,2 ^x	42,4 ^y	1,94	0,009	< 0,00	0,004
	H10	29,4 ^x	30,6 ^a	29,5 ^x	40,2 ^y	1,61			
	H20	39,5	23,0 ^{Bb}	25,8	34,0	1,83			
Ksylolityczna	K	75,7 ^x	46,3 ^{yx}	50,6 ^{yx}	65,7 ^y	3,15	0,207	< 0,00	0,174
	H10	66,7 ^x	50,0 ^y	52,9 ^y	60,8	2,09			
	H20	70,8 ^x	44,7 ^{yx}	48,5 ^{yx}	62,5 ^y	2,79			

Objaśnienia: *jednostki aktywności enzymatycznej: amylolityczna i celololityczna – μM glukozy $\cdot \text{g}^{-1} \text{SM} \cdot \text{min}^{-1}$; pektynolityczna – μg kwasu glukuronowego $\cdot \text{g}^{-1} \text{SM} \cdot \text{min}^{-1}$; ksylanolityczna – μM ksylozy $\cdot \text{g}^{-1} \text{SM} \cdot \text{min}^{-1}$; K – dawka kontrolna; H10 – dawka zawierająca HUMAC natur AFM[®] w ilości 10 $\text{g} \cdot \text{d}^{-1}$; H20 – dawka zawierająca HUMAC natur AFM[®] w ilości 20 $\text{g} \cdot \text{d}^{-1}$; SEM – błąd standardowy średniej; D $\times$ T interakcja pomiędzy rodzajem dawki pokarmowej a czasem pobrania prób; AB ($P < 0,01$) i ab ($P < 0,05$) – statystycznie istotne różnice pomiędzy dawkami pokarmowymi; XY ($P < 0,01$) i xy ($P < 0,05$) – statystycznie istotne różnice pomiędzy czasem pobrania prób

żała także od ilości podanych kwasów huminowych (tab. 3). Dwie godziny po karmieniu była ona większa u owiec w grupie H10 w stosunku do zwierząt H20 ($p < 0,05$). Zwierzęta przeżuujące nie syntetyzują enzymów rozkładających węglowodany strukturalne wchodzące w skład ściany komórkowej roślin. Trawienie ich odbywa się przy udziale enzymów syntetyzowanych przez bakterie, pierwotniaki i grzyby zasiedlające żwacz, główne miejsce rozkładu cukrów strukturalnych. Mikroorganizmy żwaczowe wykorzystują węglowodany z pasz jako źródło energii oraz do budowy swojego ciała. Wzrost tempa trawienia celulozy w żwaczu u owiec otrzymujących dawkę H10 mógł być spowodowany większą aktywnością mikroorganizmów celololitycznych. Faulkenbery (2) stwierdził większą strawność NDF siana z lucerny w 3. i 6. godzinie inkubacji *in situ* w żwaczu owiec karmionych paszą z dodatkiem 1% kwasów huminowych. Wzrost aktywności celololitycznej mógł być spowodowany większą liczebnością orzęsków celololitycznych z rodzaju *Diplodinium* np. *Diploplastron affine*, *Eudiplodinium maggii*, *Enoplastron trilorica-tum* (7). W cytowanej pracy stwierdzono, że 38% ogólnej aktywności celololitycznej pochodzi od pierwotniaków z rodzaju *Diplodinium*. Váradyová i wsp. (11) w badaniach *in vitro* wykazali wzrost liczebności orzęsków żwaczowych *Diploplastron affine* oraz *Enoplastron trilorica-tum* przy dodatku 10 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ preparatu zawierającego kwasy huminowe (618 g kwasów huminowych $\cdot \text{kg}^{-1} \text{SM}$). W literaturze nie znaleziono danych dotyczących wpływu kwasów huminowych na liczebność bakterii celololitycznych w żwaczu. Wyniki badań własnych pozostają w sprzeczności z wynikami

badan Galipa i wsp. (3), w których wykazano, że dodatek 5 lub 10 $\text{g} \cdot \text{d}^{-1}$ kwasów huminowych dla owiec zmniejsza aktywność celololityczną, odpowiednio o 13,8% i 12,1%. Wspomniani autorzy stwierdzili, że dodatek 5 $\text{g} \cdot \text{d}^{-1}$ zmniejszył liczebność orzęsków z rodzaju *Diplodinium*.

W badaniach własnych nie stwierdzono istotnego wpływu kwasów huminowych na aktywność amylolityczną, pektynolityczną oraz ksylanolityczną. Być może zbyt mała ilość kwasów huminowych w dawce pokarmowej nie wpłynęła istotnie na rozkład skrobi, pektyny i ksylanu.

Czas pobrania próbki miał istotny wpływ na aktywność hydrolaz w treści żwacza owiec (tab. 3). Aktywność celololityczna w grupie H10 była większa 8 godzin po podaniu paszy niż przed podaniem dawki pokarmowej i 4 godziny po karmieniu ($P < 0,05$). Najwyższą aktywność ksylanolityczną stwierdzono przed karmieniem zarówno w grupie H10, jak i H20 – była ona jednak niższa niż w grupie K. W 2. i 4. godzinie następowało jej obniżenie i ponowny wzrost po 8 godzinach ($P < 0,05$). Być może w 2. i 4. godzinie po karmieniu, kiedy ilość kwasów huminowych jest największa, następuje hamowanie aktywności enzymów fibrolitycznych. Natomiast pomiędzy 4. a 8. godziną, kiedy ilość tych kwasów jest znacząco mniejsza, aktywność celololityczna i ksylanolityczna jest zbliżona do wartości obserwowanych przed karmieniem owiec. Aktywność amylolityczna treści żwacza w grupie H20 była większa 8 godzin po karmieniu niż 2 godziny po podaniu pasz ($p < 0,05$). Zmiana aktywności hydrolaz, pomiędzy 4. a 8. godziną po karmieniu sugeruje wzrost aktywności mikrobiologicznej w żwaczu owiec.

Podsumowując, można stwierdzić, że wpływ kwasów huminowych na aktywność hydrolaz w żwaczu owiec nie jest jednoznaczny i zależy od ich ilości w dawce pokarmowej oraz czasu po karmieniu. Zastosowanie preparatu HUMAC natur AFM® w ilości $10 \text{ g} \cdot \text{d}^{-1}$ zwiększa początkowe tempo trawienia celulozy w żwaczu, co sugeruje wzrost aktywności mikroorganizmów biorących udział w trawieniu węglowodanów strukturalnych. Otrzymane wyniki wskazują jednak, że kwasy huminowe mogą spowalniać rozkład węglowodanów żwaczu, ponieważ największą aktywność hydrolaz stwierdzono przed karmieniem oraz 8 godzin po podaniu dawek pokarmowych.

Piśmiennictwo

1. AOAC. Association of Official Analytical Chemists, Official Methods of Analysis. Arlington, VA 2011.
2. Faulkenberry J. M.: Effect of humic acid on forage digestibility in ruminants. Master's thesis, Texas A&M University 1995.
3. Galip N., Polat U., Bircik H.: Effect of supplemental humic acid on ruminal fermentation and blood variables in rams. Ital. J. Anim. Sci. 2016, 74, 390-393.
4. Huhtanen P. P., Khalili H.: The effect of sucrose supplement on the particle-associated carboxymethylcellulase (EC 3.2.1.4) and xylanase (EC 3.2.1.8) activities in cattle given grass-silage-based diet. Brit. J. Nutr. 1992, 67, 245-255.
5. Kowalik B., Skomial J., Pajk J. J., Taciak M., Majewska M., Belzecki G.: Population of ciliates, rumen fermentation, indicators and biochemical parameters of blood serum in heifers fed diets supplemented with yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) preparation. Anim. Sci. Pap. Rep. 2012, 30, 329-338.
6. Islam K. M. S., Schuhmacher A., Groop J. M.: Humic acid substances in animal agriculture. Pak. J. Nutr. 2005, 4, 126-134.
7. Michałowski T., Belzecki G., Kwiatkowska E., Pajk J. J.: The effect of selected rumen fauna on fibrolytic enzyme activities, bacterial mass, fibre disappearance and fermentation pattern on sheep. J. Anim. Feed Sci. 2003, 12, 45-64.
8. Miltko R., Belzecki G., Kowalik B., Skomial J.: Presence of carbohydrate-digesting enzymes throughout the digestive tract of sheep. Turk. Vet. Anim. Sci. 2016, 40, 271-277.
9. StatSoft, Inc. STATISTICA. Data analysis software system, ver. 10. www.statsoft.com, 2011.
10. Thomassen B. P. H., Faust R. H.: The use of a processed humic acid product as a feed supplement in dairy production in the Netherlands. The World Grow Organic International Scientific Conference, August, Basle 2000, s. 339.
11. Váradyová Z., Kišidayová S., Jalč D.: Effect of humic acid on fermentation and ciliate protozoan population in rumen fluid of sheep in vitro. J. Sci. Food Agric. 2009, 89, 1936-1941.
12. Wang Q., Chen Y. J., Yoo H. J., Kim J. H., Cho J. H., Kim I. H.: Effect of supplemental humic substances on growth performance, blood characteristics and meat in finishing pigs. Livest. Sci. 2008, 117, 270-274.
13. Yörük M. A., Gül M., Hayirli A., Macit M.: The effects of supplementation of humate and probiotic on egg production and quality parameters during the late laying period in hens. Poult. Sci. Assoc. 2004, 83, 84-88.

Adres autora: dr hab. Barbara Kowalik, ul. Instytutcka 3, 05-110 Jabłonna;
e-mail: b.kowalik@ifzz.pl