

WOJCIECH ZAWADZKI, ZDZISŁAW ZAWADZKI*, GRZEGORZ ZAŁUCKI

Metanogeneza i wytwarzanie LKT *in vitro* po zastosowaniu wodzianu chloralu

Katedra Fizjologii Zwierząt Wydziału Weterynaryjnego AR, ul. Norwida 31, 50-375 Wrocław
* Instytut Inżynierii Ochrony Środowiska Politechniki Wrocławskiej, Plac Grunwaldzki 9,
50-377 Wrocław

Wodzian chloralu (wodnik chloralu) — $\text{CCl}_3\text{CH}(\text{OH})_2$ jako lek został wprowadzony do praktyki weterynaryjnej pod koniec XIX w. Jest aldehydem, który we krwi ulega redukcji do alkoholu trójchlorooctowego (12). W małych dawkach jest środkiem uspokajającym i jest przydatny przy zabiegach chirurgicznych zwłaszcza na zwierzęciu stojącym. Oprócz jednak tego zastosowania, podobnie jak glikol propylenowy, propionian sodu, mleczan sodu, chlorek potasu i glicerol, należy do substancji używanych w doustnej terapii przy leczeniu stanów ketozy u przeżuwaczy (10). Po zastosowaniu wymienionych substancji w dawkach terapeutycznych wzrasta ilość kwasu propionowego w żwaczu (1), jak również poziom glukozy we krwi (14, 19). Najskuteczniejszymi w działaniu okazały się: wodnik chloralu i glikol propylenowy (1, 19).

Produktami mikrobiologicznej degradacji wodzianu chloralu w żwaczu są trójchloroetanol i chloroform, które są dobrze znanymi składnikami inhibującymi produkcję metanu *in vitro* (17, 22); ponadto podczas tego procesu powstaje wodór (2).

Celem badań było określenie wpływu wodzianu chloralu na proces metanogenezy i poziom lotnych kwasów tłuszczowych (LKT) w próbkach treści żwacza.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na 8 dorosłych kozach samicach dobranych bardzo starannie pod względem wieku (2 lata), masy ciała (43 kg) i kondycji. Zwierzęta żywiono indywidualnie, dwukrotnie — o godz. 7⁰⁰ i 15⁰⁰, sianem (według norm żywieniowych — 13) z dodatkiem 100 g specjalnego koncentratu „Kufor”, zawierającego 14,5%—16,5% białka surowego strawnego i 0,93—0,97 jednostki pokarmowej na kg. Prócz tego paszę doświadczalnych zwierząt wzbogacano mieszanką witamin i soli mineralnych, a wodę do picia podawano *ad libitum*. Próbkę treści żwacza do badań *in vitro* pobierano przy pomocy sondy żołądkowej

i pompy próżniowej dokładnie w 2 godziny po skończonym odpasie kóz. Inkubację przesączu treści prowadzono w naczynkach aparatu Warburga w temperaturze 39°C przez 12 godzin. Do każdego naczynka wprowadzono 10 ml przesączu, 1,5 mmola pirogronianu sodowego, jako substratu wzrostu bakterii oraz 0,5 względnie 1,0 mmola wodzianu chloralu. Próbkę kontrolną pozostawiały bez dodatku tego inhibitora. Inkubację prowadzono kolejno w atmosferze azotu, helu i dwutlenku węgla. Po jej zakończeniu oznaczano w inkubacie ilości CH_4 , CO_2 i H_2 metodą Demeyera i Henderickxa (4). Dla określenia ilości LKT w inkubatych poddano je działaniu 0,5 ml stężonego kwasu mrówkowego i przechowywano w temperaturze -20°C do czasu wykonania analiz metodą chromatografii gazowej według Cottyna i Boucque'a (3). Stwierdzono, że największą ilość CH_4 wytwarzała mikroflora żwacza, gdy inkubację prowadzono w atmosferze azotu, a wyniki badań uzyskane w tych warunkach przedstawiono w tab. 1.

Wyniki i omówienie

Wyniki badań przedstawiono w tab. 1. Stwierdzono, że wodzian chloralu wywołuje wyraźną inhibicję wytwarzania metanu, ponieważ już dodatek 0,5 mmola tego związku do inkubatu zmniejsza prawie całkowicie produkcję metanu (z 14,5 $\mu\text{moli}/100 \mu\text{moli}$ pirogronianu sodowego do 0,7 $\mu\text{moli}/100 \mu\text{moli}$ tego związku). Z drugiej strony dochodziło do widocznego wzrostu ilości wytworzonego CO_2 , bo o 22,25%, z równocześnie stwierdzoną wyraźną akumulacją gazowego wodoru, podobnie jak i wzrastającą ilością kwasu propionowego. Opisane w niniejszej pracy badania *in vitro* potwierdzają rolę wodoru jako najważniejszego substratu wykorzystywanego przez bakterie metanogenne. Jego interakcja z dwutlenkiem węgla doprowadza do powstania metanu. Około 90% wodoru produkowanego podczas fermentacji żwaczowych wykorzystywanych jest w syntezie metanu oraz głównie kwasu propionowego i masłowego (21, 22). Już Hungate (5), a potem Wolin (20) podkreślali w swoich nie-

Tab. 1. Wpływ wodzianu chloralu na powstawanie gazów i LKT po 12 h inkubacji przesączu treści żwacza

Dawki wodzianu chloralu w mmolach	Wytworzone gazy i lotne kwasy tłuszczowe (LKT)					
	CH_4	CO_2	H_2	Kwas octowy	Kwas propionowy	Kwas masłowy
0,0	14,5 ± 0,5	63,8 ± 1,6	0,0	86,3 ± 5,2	9,9 ± 0,5	4,3 ± 0,2
0,5	0,7 ± 0,1	77,7 ± 1,8	33,3 ± 4,4	73,8 ± 3,3	11,1 ± 0,5	4,2 ± 0,4
1,0	0,0	78,1 ± 1,6	34,3 ± 4,2	69,5 ± 2,5	15,5 ± 1,0	4,1 ± 0,3

Objaśnienia: ilości gazów i LKT podano w $\mu\text{moli}/100 \mu\text{moli}$ pirogronianu sodowego; wodzian chloralu dodawano do 10 ml przesączu treści żwacza.

zwykle interesujących pracach, że w warunkach przebiegu metanogenezy utrzymuje się bardzo niskie ciśnienie cząsteczkowe H_2 i dlatego mogą zachodzić też inne reakcje korzystne termodynamicznie. Czynniki metanogenne i mikroorganizmy beztlenowe wytwarzające wodór umożliwiają wzrost bakterii produkujących metan w przedżołądkach. Jak stwierdzono poza tym w pracy Prinsa i Clarka (11) w badaniach nad czystymi kulturami bakterii metanogennych, produkują one względnie mniej H_2 , chociaż występuje duża zdolność do tworzenia się H_2 gazowego.

W normalnych warunkach żywienia wodór gazowy nie gromadzi się w żwaczu, natomiast ilość jego — jak podał Matsumoto (7) — narasta w warunkach głodu. Jak dokumentuje to dołączona do pracy tabela, w przeprowadzonych badaniach nie stwierdzono istotnej różnicy w produkcji wodoru i dwutlenku węgla w zależności od dawki zastosowanego inhibitora metanogenezy.

Jeżeli chodzi o dwa pozostałe, nie omawiane dotąd dokładniej kwasy tzn. kwas masłowy i kwas octowy, to poziom tego pierwszego w ogóle nie uległ zmianie; zmniejszyła się ilość kwasu octowego (przy dawce 0,5 mmola wodzianu chloralu — spadek wytwarzanego kwasu o 14,5%, zaś przy dawce 1,0 mmola — spadek o 19,5%). Stosunki wzajemne między LKT (octowy:propionowy:masłowy) kształtowały się na następujących poziomach: przed podaniem wodzianu chloralu — jak 0,86:0,10:0,04, natomiast po podaniu 0,5 mmola inhibitora wynosiły one — 0,83:0,12:0,05, zaś po dawce 1,0 mmola kształtowały się, jak: 0,78:0,17:0,05. Zwraca uwagę malejąca względna ilość kwasu octowego i stała kwasu masłowego. Nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic przy zastosowaniu obu dawek wodzianu chloralu.

Wodzian chloralu jako środek skutecznie zapobiegający wzdęciom i stanom ketozy był już stosowany przez wielu autorów (1, 6, 9, 10, 14, 15, 16, 17, 19), jak również w badaniach własnych nad metanogenezą *in vivo* (21, 22). Obecna praca ma przyczynić się do lepszego poznania wpływu wodzianu chloralu na kształtowanie się procesu metanogenezy.

Wszystkie wymienione wyżej pozycje piśmiennictwa, jak i obecna praca, wykazują naturalny antagonizm między metanem a kwasem propionowym, co stanowi jedną z zasadniczych cech fermentacji zachodzących w przedżołądkach przeżuwaczy. Znajomość tego faktu pozwala ocenić prawidłowość fermentacji żwaczowych, a w razie ich zaburzenia użyć właściwych środków, takich jak np. wodzian chloralu, celem przywrócenia fizjologicznego kierunku tychże procesów.

Wnioski

1. Wodzian chloralu wywołuje wyraźną inhibicję wytwarzania metanu, widoczną akumu-

lację gazowego wodoru oraz wzrost ilości kwasu propionowego w próbkach treści żwacza.

2. Nie zauważono istotnych różnic w działaniu wodzianu chloralu, zarówno przy stosowaniu go w ilości 0,5 mmola, jak przy 1,0 mmolu/10 ml płynu żwaczowego.

Piśmiennictwo

1. Baaij P. K.: Enkele aspecten van de pensdigestie bij runderen in verband met acetonaemie. Praca dokt. Utrecht, 1959.
2. Bauchop T.: J. Bacteriol. 94, 171, 1967.
3. Cottyn B. G., Boucque C. V.: J. Agr. Fd Chem. 16, 105, 1968.
4. Demeyer D. I., Henderickx H. K.: Biochem. J. 105, 271, 1967.
5. Hungate R. E.: The rumen and its microbes. Academic Press, New York 1966.
6. Johnson D. E.: J. Anim. Sci. 35, 1064, 1972.
7. Matsumoto T.: Tohoku J. Agr. 12, 213, 1961.
8. Prins R. A.: J. Dairy Sci. 43, 991, 1965.
9. Prins R. A.: Enkele microbiologische en biochemische aspecten van de stofwisseling in de pens. Praca dokt. Utrecht, 1967.
10. Prins R. A., Seekles L.: J. Dairy Sci. 51, 882, 1968.
11. Prins R. A., Clarke R. T. J.: W: Digestive physiology and metabolism in ruminants. MTP Press Limited Fakon House Lancaster, England, 1980, s. 179.
12. Ratajczak K.: Podstawy anestezjologii zwierząt. Skrypty AR we Wrocławiu, 1981.
13. Ryś R.: Normy żywienia zwierząt gospodarskich. PWRiL, 1981.
14. Talsma D.: Acetonaemia post partum bij de Friesche melkkoe. Praca dokt. Utrecht, 1952.
15. Trell J. E., Scott G. C., Parish R. C.: J. Anim. Sci. 34, 510, 1972.
16. Van Leeuwen J. M., Van Andrickem P. W. M.: Landbouwk. Tijdschr. 80, 450, 1968.
17. Van Nevel C. J., Henderickx H. K., Demeyer D. I., Martin J.: Appl. Microbiol. 17, 695, 1969.
18. Van Nevel C. J., Demeyer D. I.: Arch. Tierernahrung 81, 141, 1981.
19. Waldo D. R., Schultz L. H.: J. Dairy Sci. 43, 496, 1960.
20. Wolin M. J.: W: Digestion and metabolism in ruminants. Mc Donald J. W. and Warner A. C. I. eds., Univ. New England, Armidale, Australia 1975, s. 194.
21. Zawadzki W.: Hamowanie metanogenezy w przedżołądkach u owiec. Praca dokt. Wrocław, 1979.
22. Zawadzki W.: Pol. Arch. Wet. (w druku).

Adres autora: dr Wojciech Zawadzki, ul. Bacciarelliego 1/6, 51-649 Wrocław

Завадский В., Завадский З., Залудский Г. — **Метаногенез и образование летучих жирных кислот *in vitro* после применения хлоралгидрата**

Цель исследований состояла в определении влияния хлоралгидрата на процесс метаногенеза и уровень летучих жирных кислот в пробах содержимого рубца. Опыты провели на 8 взрослых козах-самках, очень старательно подобранных по возрасту (2 года), массе тела (43 кг) и кондиции. Животных кормили индивидуально, 2-кратно в 7.00 и 15.00, сеном и 100 г специального концентрата „Kuifor”, питьевую воду давали *ad libitum*. Инкубацию содержимого рубца, взятого при помощи желудочного зонда и вакуумного насоса ровно в 2 часа после окончания откорма коз вели в сосудах прибора Варбурга в темп. 39°C 12 часов. В каждый сосудик ввели 10 мл рубцовой жидкости, 1,5 mmol пирогоната натрия как субстрата роста бактерий, а также 0,5 или 1,0 mmol хлоралгидрата. Контрольные пробы не содержали хлоралгидрата. Показано, что хлоралгидрат вызывает отчетливую ингибицию образования метана и заметную аккумуляцию газового водорода, как и повышает количество пропионовой кислоты в пробах содержимого рубца. Не обнаружено существенных различий в действии хлоралгидрата как при дозе 0,5 mmol, так и при 7,0 mmol/10 мл рубцовой жидкости.

Zawadzki W., Zawadzki Z., Zalucki G. — **Metanogenesis and production of VFA *in vitro* after the application of chloral hydrate**

The purpose of the studies was to determine the influence of chloral hydrate on metanogenesis and

the level of volatile fatty acids in samples of the rumen content. The studies were performed on 8 mature female goats at the age of 2 years, weighing 43 kg of a good condition. The animals were individually fed, twice (7.00 and 15.00) with hay and a special concentrate „Kufor”, water was given ad libitum. Rumen content taken after 2 hours after the end of feeding by the use of rumen probe and a vacuum pump was incubated in the vessels of Wartburg's apparatus at 39°C for 12 hours. Each vessel contained 10 ml of the rumen liquid, 1.5 M

sodium pyroracemate as a substrate for bacterial growth and 0.5 or 1.0 mM of chloral hydrate. Controls were devoided of chloral hydrate. It was found that chloral hydrate caused a pronounced inhibition of methane production and an evident accumulation of gaseous hydrogen, it also increased the quantity of pyroracemic acid in the sample of the rumen content. There were not found significant differences in the action of chloral hydrate at a concentration of 0.5 mM and 1.0 mM per 10 ml of the rumen liquid.

JAN ŻELAZNY, JADWIGA PAŃCZYK

Wartość terapeutyczna wybranych preparatów leczniczych w dehelmintyzacji *Khawia sinensis* (Hsü, 1935) u karpia

Zakład Badania Chorób Ryb Instytutu Weterynarii w Puławach, Al. Partyzantów 57,
24-100 Puławy

Khawia sinensis jest nowym tasiemcem w Polsce, który bardzo szybko rozprzestrzenił się w gospodarstwach stawowych i jeziorowych. Pasożyt ten został wprowadzony do gospodarstw rybackich Związku Radzieckiego z Chin (4), a następnie innych krajów Europy (3, 5, 7) podczas introdukcji ryb roślinożernych. W Polsce występuje on od kilku lat u karpia oraz innych ryb z rodziny *Cyprinidae*, powodując poważne zagrożenie głównie dla obsad hodowlanych karpia w intensywnej hodowli stawowej (11). Straty z tytułu zarażenia karpia tym tasiemcem wyrażają się zmniejszeniem przyrostów jednostkowych ryb w wysokości około 20% oraz ubytkami ilościowymi, wynoszącymi około 15% obsady (14).

W dotychczasowych opracowaniach dotyczących zwalczania *Khawia sinensis* zalecane są fenotiazyna (16), kamala (8), Devermin (10), Fenosal (10) i Zestocarp (15). Preparaty te podawane są rybom doustnie w postaci granulatu (Fenosal, Devermin, Zestocarp) lub jako dodatek do karmy (kamala, fenotiazyna, Devermin). Odrobaczenie ryb przeprowadza się bezpośrednio w stawach, w których hodowana jest zarażona obsada. Stosowane środki lecznicze nie zawsze dają zadowalające wyniki; odnosi się to przede wszystkim do kamali i fenotiazyny (1) oraz Deverminu (11). W Polsce nie prowadzono dotychczas badań nad zwalczaniem inwazji *Khawia sinensis*. Biorąc pod uwagę straty zarówno ilościowe w pogłowiu ryb, jak i zmniejszenie przyrostów ryb zarażonych (14, 17) stało się konieczne podjęcie badań, mających na celu określenie wartości terapeutycznej wybranych środków leczniczych w odrobaczaniu *Khawia sinensis* u obsad karpioowych.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono w warunkach laboratoryjnych i terenowych, w gospodarstwach rybackich województw: lubelskiego, chełmskiego i radomskie-

go. Polegały one na ocenie skuteczności wybranych środków leczniczych w dehelmintyzacji karpia oraz określeniu koncentracji toksycznych tych preparatów dla karpia po wydalaniu przez nie leku do wody. Do badań użyto następujących środków przeciworobaczych: Savermin (produkcji Polfa, Warszawa), Zestocarp (produkcji VEB Agraria, Dresden) oraz mieszaninę Saverminu z siarczanem sodowym w stosunku 1:10 (siarczan sodowy — $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ produkcji Chemicznej Spółdzielni Pracy Zjednoczenie, Gorzów Wielkopolski). Dawki przedstawionych powyżej leków obliczano w stosunku do preparatów gotowych tych środków, a nie w odniesieniu do zawartości ich substancji czynnych.

Savermin jest lekiem przeciworobaczym stosowanym w Polsce od kilku lat u ssaków (2, 13) oraz w ostatnim czasie u ryb przeciwko tasiemcowi *Bothriocephalus acheilognathi* (18). Preparat ten stanowi pod względem chemicznym kompleks niclosamidu z adypinianem piperazyny. Farmakologiczne działanie tego środka polega na wywołaniu zaburzeń w metabolizmie pasożytów i gromadzeniu się w ich organizmach nadmiaru pośrednich i końcowych produktów przemiany materii. Powoduje to obumieranie tasiemców, które następnie wskutek ruchów perystaltycznych jelit wydalane są z kałem.

Zestocarp jest paszowym granulatem leczniczym stosowanym u obsad karpioowych w NRD przeciwko tasiemcom *Bothriocephalus acheilognathi* i *Khawia sinensis* (15). Preparat ten zawiera 1% niclosamidu (5-chlor-2-hydroxybenzol kwas-2-chlor-4-nitro anilid), który po podaniu rybom powoduje obumieranie tasiemców i wydalanie ich z kałem. Głównym składnikiem Zestocarpu, stanowiącym nośnik substancji czynnej, jest mąka pszenna.

Z danych piśmiennictwa wynika, że niektóre sole metali alkalicznych mają działanie przeciworobacze (12). Dlatego też podjęto próbę leczenia kawiozy przy użyciu powszechnie dostępnego preparatu, jakim jest siarczan sodowy. Działanie tego leku polega na rozpułchnieniu błony śluzowej przewodu pokarmowego i przyspieszeniu perystaltyki jelit. Przeprowadzone z użyciem tego preparatu badania nie dały jednak w pełni pozytywnych wyników terapii. Stwierdzono jednak przy tym, że zastosowanie mieszaniny Saverminu z siarczanem sodowym przyspiesza obumieranie i wydalanie tasiemców przy znacznym zmniejszeniu dawki leczniczej Saverminu. Proporcja 1:10 tych preparatów dała najlepsze wyniki w terapii kawiozy (badania własne w akwariach).

Określenie wielkości minimalnych dawek leczniczych Saverminu, Zestocarpu i mieszaniny Savermi-