

Katedra Higieny Zwierząt i Środowiska Wydziału Zootechnicznego Akademii Rolniczej w Lublinie

MARTA FIOŁKA, TADEUSZ MAJEWSKI

*Kształtowanie się poziomu lizozymu we krwi i narządach
zwierząt żywionych dietą z dodatkiem azotanów, azotynów,
fitazy i lędwianu siewnego*

Level of Lysozyme Activity in Tissues and Blood of Animals Fed on the Diet
Supplemented with Nitrite, Nitrate, Phytase and Raw Flat Pea Seeds

Lizozym jest enzymem bakteriolitycznym zaliczanym do β -1,4-N-acetylomuramidaz (EC.3.2.1.17), występującym w organizmach zwierzęcych i roślinnych. Ten ważny składnik odporności bezkręgowców jest również stałym elementem odporności u człowieka i wielu zwierząt należących do różnych grup kręgowców. Lizozym występuje w narządach, płynach fizjologicznych i wydzielinach, a jego funkcje obronne i odpornościowe u zwierząt i człowieka nie zostały dotychczas w pełni poznane.

Wyniki badań ostatnich lat dowodzą, że nie tylko stan zdrowotny, ale także warunki utrzymania i żywienia wywierają wpływ na poziom odporności nieswoistej, powodując zmianę wrodzonego miana aktywności lizozymu surowicy krwi.

Stosowanie intensywnego nawożenia azotem w uprawie roślin powoduje kumulację w częściach jadalnych znacznych ilości azotanów i azotynów. Dotychczasowe badania nad azotanami i azotynami dotyczyły ich oddziaływania toksycznego na organizm zwierzęcy (10, 11). Nieliczne są doniesienia o wpływie związków azotowych na układ immunologiczny (2), w tym na poziom lizozymu we krwi i tkankach zwierząt.

Fitaza jest enzymem należącym do wielkocząsteczkowych białek, aktywnym w ziarnach zbóż. Fitaza jest wytwarzana przez niektóre grzyby, drożdże i bakterie. Występuje ona również w jelitach niektórych zwierząt. Enzym ten odgrywa zasad-

niczą rolę w hydrolizie fityny do kwasu fosforowego lub jego soli, stanowiąc cenne źródło fosforu. U zwierząt przeżuujących fityna ulega hydrolizie pod wpływem fitazy syntetyzowanej przez bakterie występujące w przedżołądkach, co u drobiu nie występuje.

W dostępnej literaturze brak jest danych dotyczących odpowiedzi układu immunologicznego w następstwie stosowania dodatku fitazy do diety. Dlatego postanowiono zbadać wpływ suplementacji diety tym enzymem na jeden z czynników odporności nieswoistej – lizozym.

Ostatnio duże zainteresowanie wzbudziły nasiona lędwianu siewnego, które posiadają wartości odżywcze, ale mogą też wywierać niekorzystny wpływ na niektóre układy i funkcje narządowe organizmu (14). W związku z tym podjęto badania nad wpływem dodatku surowych i ekstrudowanych nasion lędwianu siewnego na aktywność lizozymu w surowicy krwi u świnek morskich. Celem badań było określenie poziomu lizozymu we krwi i wybranych narządach po dodaniu diety związków azotowych fitazy i lędwianu siewnego.

MATERIAL I METODY

Doświadczenia nad immunotoksycznym oddziaływaniem azotanu i azotynu potasowego przeprowadzono na 60 kurczętach, brojlerach linii Petra w wieku 6 tygodni. Zwierzęta podzielono na trzy równe grupy: grupa I (grupa kontrolna) otrzymywała wodę pitną bez dodatków, zwierzęta grupy II otrzymywały wodę z dodatkiem azotanu potasowego o stężeniu 0,02N, zaś grupy III z dodatkiem azotynu potasowego o stężeniu 0,005N *ad libitum*. Okres doświadczeń trwał 10 dni i po tym czasie zwierzęta ubijano i pobierano krew oraz próby wątroby, płuc, śledziony, nerki i serca.

Badania nad wpływem fitazy na poziom lizozymu przeprowadzono na 40 przepiórkach rasy faraon i takiej samej liczbie kurcząt brojlerów rasy starbro. Poziom aktywności lizozymu oceniano w surowicy krwi kurcząt i przepiórek żywionych paszą z dodatkiem fitazy *Aspergillus* firmy BASF (750 jednostek/ kg) oraz w surowicy krwi ptaków grup kontrolnych żywionych dietą standardową bez dodatku fitazy. Ptaki utrzymywane były w klatkach w jednakowych warunkach termiczno-wilgotnościowych i miały stały dostęp do wody. Doświadczenie trwało przez okres 8 tygodni, a próby krwi do analiz pobrano po czterech tygodniach od rozpoczęcia doświadczeń oraz po ich zakończeniu.

Badania nad wpływem nasion lędwianu siewnego na aktywność bakteriolityczną lizozymu w surowicy krwi przeprowadzono na 33 świnkach morskich obojga płci, w różnym wieku, o masie ciała od 290 do 540 g. Zwierzęta podzielono na trzy grupy, z których pierwszą stanowiły świnki morskie żywione paszą kontrolną. Drugą grupę stanowiły świnki morskie żywione paszą zawierającą 25% surowych nasion lędwianu siewnego, zaś trzecią grupę żywiono paszą zawierającą do 25% ekstrudowanych nasion lędwianu siewnego. Zwierzęta miały swobodny dostęp do karmy i wody. Okres doświadczeń trwał 6 tygodni, a po tym okresie świnki wykrawiano.

Poziom aktywności bakteriolitycznej lizozymu we krwi i w narządach badanych zwierząt oceniano metodą basenikowo-dyfuzyjną w buforze Sørensen'a o pH 6,4 (8). Substratem działania lizozymu był liofilizat komórek *Micrococcus luteus* (SIGMA). W wątrobie, śledzionie, płucach, nerkach i sercu stężenie lizozymu oznaczono sporządzając homogenaty narządów w *aqua pro injectione*, które

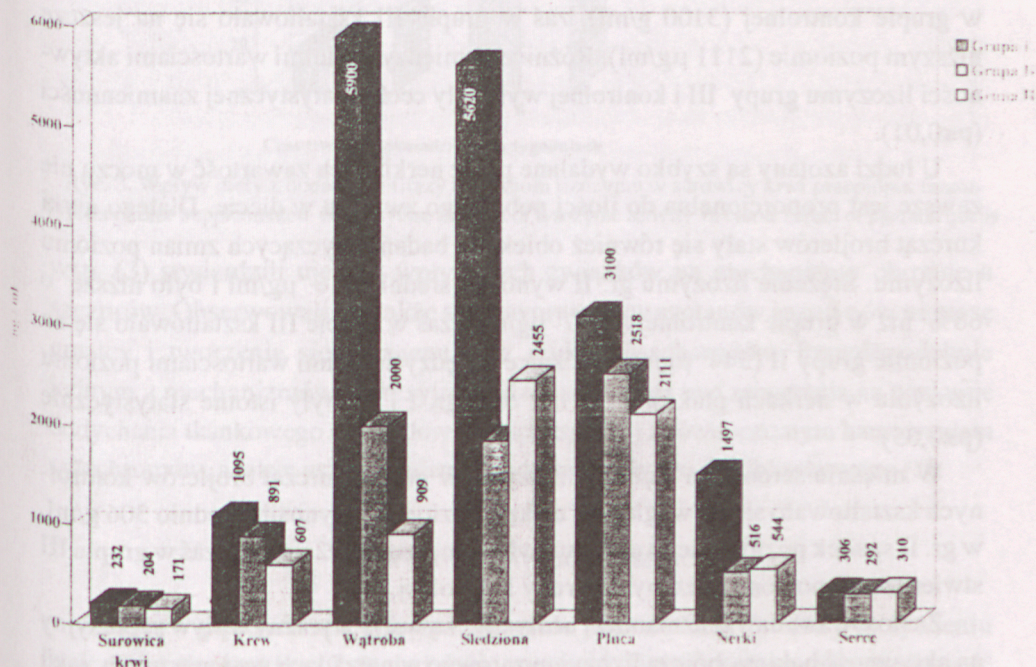
nanoszono do baseników w podłożu agarowym. Strefy bakteriolizy wokół baseników oceniano po 24 godz. inkubacji w 37,0°C. Aktywność bakteriolityczną lizozymu we krwi i narządach odczytywano z krzywej standardowej, wyznaczonej ze znanych stężeń EWL (Egg White Lysozyme) i wyrażono w $\mu\text{g/ml}$, w przeliczeniu na aktywność lizozymu białka jaja kurzego (E.C.3.2.1.17). Wyniki badań poddano analizie statystycznej, stosując test t-Studenta.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

WPLYW AZOTANÓW I AZOTYNÓW NA POZIOM LIZOZYMU

Zastosowane przez 10 dni dawki azotanów i azotynów w wodzie pitnej spowodowały obniżenie apetytu i pragnienia oraz nastroszenie piór i zahamowanie przyrostów masy ciała u kurcząt. Świadczy to o toksycznym działaniu podawanych dawek. Nie stwierdzono jednak istotnych zmian we wskaźnikach hematologicznych i biochemicznych. Natomiast zanotowano bardzo wyraźne supresyjne działanie związków azotowych na status immunologiczny ptaków (ryc. 1).

Azotany i azotyny w przewodzie pokarmowym przechodzą do tkanek i narządów za pośrednictwem krwi. We krwi lizozym występuje w osoczu, w leukocytach i trombocytach. W pełnej krwi aktywność lizozymu w grupie kontrolnej (gr. I) wynosiła średnio 1095 $\mu\text{g/ml}$, u ptaków pojęnych roztworem azotanu potasowego



Ryc. 1. Wpływ azotanów i azotynów na poziom lizozymu we krwi oraz narządach kurcząt brojlerów
Effects of potassium nitrite and potassium nitrate on level of lysozyme activity in blood and tissues of broiler chickens

(gr. II) obniżyła się do 891 $\mu\text{g/ml}$, tj. o 19%, zaś w gr. III poziom był jeszcze niższy: obniżył się do 607 $\mu\text{g/ml}$, tj. o 31%. Różnice między średnimi wartościami grupy kontrolnej a grupami doświadczalnymi były statystycznie istotne ($p \leq 0,01$).

W surowicy krwi aktywność bakteriolityczna uległa tylko nieznacznemu obniżeniu w porównaniu ze zmianami w badanych narządach i wynosiła 232 $\mu\text{g/ml}$ w grupie kontrolnej, 204 $\mu\text{g/ml}$ w grupie II, zaś 171 $\mu\text{g/ml}$ w grupie III.

Tkanka wątrobowa ma decydujący wpływ na utrzymanie równowagi azotowej organizmu, gdyż w wątrobie w cyklu ornitynowym powstaje mocznik jako końcowy metabolit przemian azotowych. Poziom lizozymu w wątrobie kurcząt grupy kontrolnej wynosił średnio 5900 $\mu\text{g/ml}$. U ptaków otrzymujących wodę z dodatkiem azotanu potasowego aktywność lizozymu obniżyła się do 2000 $\mu\text{g/ml}$ i była niższa od stwierdzonej w grupie kontrolnej o 66%, zaś w grupie ptaków otrzymujących wodę z dodatkiem azotynu potasowego wynosiła 909 $\mu\text{g/ml}$, a tym samym obniżyła się aż o 85% w porównaniu z grupą kontrolną. Różnice między średnimi wartościami w poszczególnych grupach ptaków były statystycznie istotne ($p \leq 0,01$).

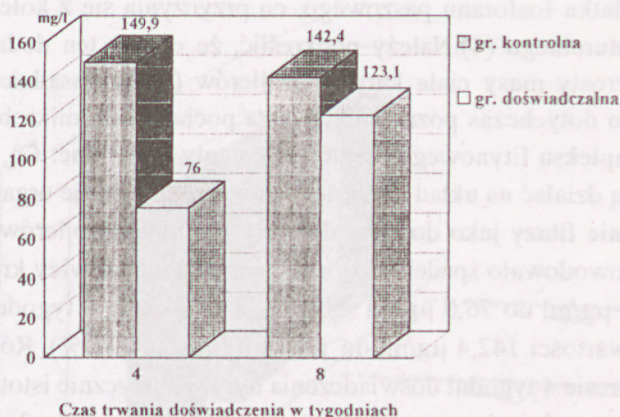
Także w śledzionie kurcząt grupy II stwierdzono statystycznie istotny spadek aktywności lizozymu do wartości 1849 $\mu\text{g/ml}$ ($p \leq 0,01$) oraz w gr. III do poziomu 2455 $\mu\text{g/ml}$ ($p \leq 0,01$) w porównaniu z grupą kontrolną (5620 $\mu\text{g/ml}$).

Stężenie lizozymu w płucach grupy II wynosiło 2518 $\mu\text{g/ml}$ i było niższe niż w grupie kontrolnej (3100 $\mu\text{g/ml}$), zaś w grupie III kształtowało się na jeszcze niższym poziomie (2111 $\mu\text{g/ml}$). Różnice pomiędzy średnimi wartościami aktywności lizozymu grupy III i kontrolnej wykazały cechy statystycznej znamienności ($p \leq 0,01$).

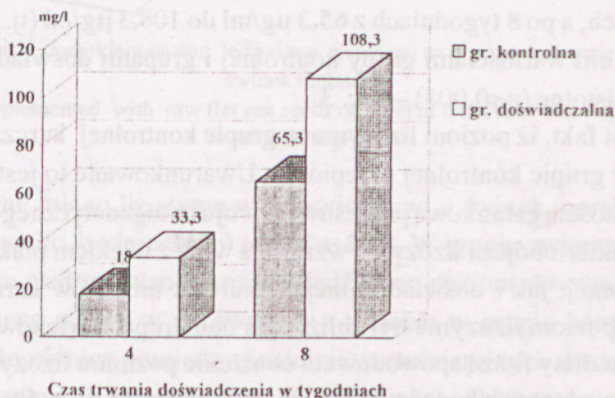
U ludzi azotany są szybko wydalone przez nerki, a ich zawartość w moczu nie zawsze jest proporcjonalna do ilości pobranego związku w diecie. Dlatego nerki kurcząt brojlerów stały się również obiektem badań dotyczących zmian poziomu lizozymu. Stężenie lizozymu gr. II wynosiło średnio 516 $\mu\text{g/ml}$ i było niższe o 66% niż w grupie kontrolnej (1497 $\mu\text{g/ml}$), zaś w grupie III kształtowało się na poziomie grupy II (544 $\mu\text{g/ml}$). Różnice między średnimi wartościami poziomu lizozymu w nerkach ptaków gr. I i II oraz gr. I i III były istotne statystycznie ($p \leq 0,05$).

W mięśniu sercowym stężenie lizozymu w grupie kurcząt brojlerów kontrolnych kształtowało się na względnie niskim poziomie i wynosiło średnio 306 $\mu\text{g/ml}$, w gr. II spadek poziomu tego enzymu był nieznaczny (292 $\mu\text{g/ml}$), zaś w grupie III stwierdzono poziom zbliżony do grupy kontrolnej.

Zastosowane dawki azotanów i azotynów wywarły wyraźny wpływ supresyjny na aktywność bakterioobójczą lizozymu zarówno w narządach wewnętrznych, jak i w surowicy krwi brojlerów. A t e f i wsp. (2) oraz De Saint Blanquat i



Ryc. 2. Wpływ diety z dodatkiem fitazy na poziom lizozymu w surowicy krwi kurcząt rasy starbro
Effects of diet supplemented with phytase on level of lysozyme activity in blood serum of chickens starbro



Ryc. 3. Wpływ diety z dodatkiem fitazy na poziom lizozymu w surowicy krwi przepiórek faraon
Effects of diet supplemented with phytase on level of lysozyme activity in blood serum of pharaoh quails

wsp. (3) stwierdzili ujemny wpływ tych związków na mechanizmy obronne u szczurów. Obserwowali oni także supresyjny wpływ azotanów i azotynów na masę grasicy i tworzenie się kolagenu oraz mukopolisacharydów. Prawdopodobnie jednym z mechanizmów supresyjnego działania mogą być zaburzenia na poziomie oddychania tkankowego spowodowane hipoksją (13) z równoczesnym hamowaniem cytochromów, a także uszkodzeniem układu siateczkowo-śródbłonkowego (1).

WPŁYW FITAZY NA POZIOM LIZOZYMU

Fitaza w praktyce znalazła zastosowanie jako dodatek do diety w żywieniu kurcząt brojlerów i kur (7, 9), indyków oraz świń. Fitaza zwiększa przyswajalność fosforu (6, 15), przez co stosowanie jej pozwala na znaczne ograniczenie lub nawet

eliminację dodatku fosforanu paszowego, co przyczynia się z kolei do ochrony środowiska naturalnego (4). Należy podkreślić, że enzym ten dodany do paszy poprawia przyrosty masy ciała kurcząt brojlerów (9) na zasadzie uczynniania procesów mało dotychczas poznanych. Fitaza pochodzenia mikrobiologicznego uwalnia z kompleksu fitynowego niektóre elementy mineralne: Ca, Mg, Mn, Fe, Zn, które mogą działać na układ odpornościowy i inne funkcje organizmu.

Zastosowanie fitazy jako dodatku do diety u kurcząt brojlerów starbro po 4 tygodniach spowodowało spadek poziomu lizozymu w surowicy krwi z wartości średniej 149,9 $\mu\text{g/ml}$ do 76,0 $\mu\text{g/ml}$ (50,7%), a po okresie 8 tygodni poziom ten zmienił się z wartości 142,4 $\mu\text{g/ml}$ do 123, 1 $\mu\text{g/ml}$ (tj. 13,6%). Różnice między grupami po okresie 4 tygodni doświadczenia były statystycznie istotne ($p \leq 0,001$), natomiast po 8 tygodniach istotnych różnic nie stwierdzono (ryc. 2).

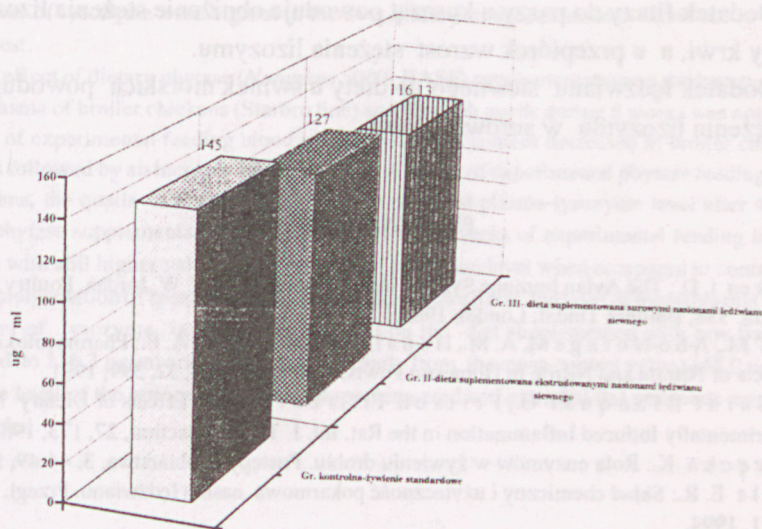
Suplementacja diety fitazą u przepiórek spowodowała wzrost poziomu lizozymu w surowicy krwi z 18,0 $\mu\text{g/ml}$ (kontrola) do poziomu 33,3 $\mu\text{g/ml}$ (o 72,4%) po 4 tygodniach, a po 8 tygodniach z 65,3 $\mu\text{g/ml}$ do 108,3 $\mu\text{g/ml}$ (tj. 40%). Różnice między średnimi wartościami grupy kontrolnej i grupami doświadczalnymi były statystycznie istotne ($p \leq 0,001$) – ryc. 3.

Istotny jest fakt, iż poziom lizozymu w grupie kontrolnej kurcząt jest znacznie wyższy niż w grupie kontrolnej przepiórek. Uwarunkowane to jest najprawdopodobniej swoistością gatunkową procesów rozwoju ontogenetycznego. U przepiórek aktywność bakteriobójcza lizozymu wzrastała wraz z wiekiem ptaków zarówno w grupie kontrolnej, jak i doświadczalnej. U kurcząt brojlerów karmionych paszą standardową poziom lizozymu był zbliżony u obu grupach wiekowych, natomiast suplementacja diety fitazą spowodowała obniżenie poziomu lizozymu.

Z przeprowadzonych badań wynika, że suplementacja diety fitazą w ilości 750 jedn./kg wywiera różny wpływ na poziom aktywności bakteriobójczej lizozymu u kurcząt brojlerów i przepiórek. Odmienne działanie fitazy u badanych ptaków wskazuje na specyficzność gatunkową i zdolność zróżnicowanego reagowania intensywnością syntezy lizozymu, co nie pozwala na porównywanie wyników u różnych gatunków.

WPŁYW LĘDŹWIANU SIEWNEGO NA POZIOM LIZOZYMU

Nasiona lędźwianu siewnego mogą być wykorzystywane jako dodatki do mieszanek paszowych ze względu na korzystny skład aminokwasowy (5). Rola zawartych w nasionach lędźwianu siewnego czynników antyodżywczych (12) w zakresie ich wpływu na parametry układu immunologicznego nie została dotychczas określona zarówno w odniesieniu do człowieka, jak również zwierząt domowych i laboratoryjnych.



Ryc. 4. Wpływ diety z dodatkiem nasion lędwianu siewnego na poziom lizozymu w surowicy krwi świnek morskich

Effects of diet supplemented with raw flat pea seeds on level of lysozyme activity in blood serum of guinea pigs

Fizjologiczne miano lizozymu w surowicy krwi u świnek morskich w grupie kontrolnej wynosiło średnio $145,0 \mu\text{g/ml} \pm 14,2$. W grupie zwierząt karmionych dietą z udziałem ekstrudowanych nasion lędwianu poziom aktywności badanego enzymu był nieco niższy w porównaniu z mianem w grupie kontrolnej ($127,0 \pm 8,5$). Jednakże różnice pomiędzy średnimi wartościami tych dwu grup nie były statystycznie istotne. W surowicy krwi świnek żywionych dietą z surowymi nasionami lędwianu średnia wartość stężenia lizozymu wynosiła $116,3 \mu\text{g/ml} \pm 5,1$ i była niższa w stosunku do miana w grupie kontrolnej (I). Różnice między średnimi wartościami grupy kontrolnej i grupy III wykazywały cechy statystycznej znamienności ($p \leq 0,01$) – ryc. 4.

Uzyskane wyniki wykazują, że skarmianie surowymi nasionami lędwianu siewnego przyczynia się do spadku aktywności lizozymu, powodując tym samym obniżenie odporności nieswoistej u świnek morskich. Ekstrudowanie nasion w znacznym stopniu likwiduje ten negatywny wpływ, ale nie w pełni, co wymaga dalszych badań.

WNIOSKI

1. Azotany i azotyny wywierają inhibicyjny wpływ na stężenie lizozymu u brojlerów kurzych we krwi i narządach (wątroba, śledziona, płuca, nerki).

2. Dodatek fitazy do paszy u kurcząt powoduje obniżenie stężenia lizozymu w surowicy krwi, a u przepiórek wzrost stężenia lizozymu.

3. Dodatek lędwianu siewnego do diety u świnek morskich powoduje obniżenie stężenia lizozymu w surowicy krwi.

PIŚMIENNICTWO

1. Aitken I. D.: The Avian Immune System. in R. F. Gordan & F. T. W. Jordan, Poultry Diseases, 2nd edn. 338, Baillere Tindal, London 1982.
2. Atef M., Abo-Norag M. A. M., Hanafy M. S. M., Agag A. E.: Pharmacotoxicological Aspects of Nitrate and Nitrite in Domestic Fowls. Brit. Poult. Sci., 32, 399, 1991.
3. De Saint Blanquat G., Fritsch F. Cazottes C.: Effects of Dietary Nitrate on Experimentally Induced Inflammation in the Rat. Int. J. Tissue Reaction, 27, 173, 1983.
4. Gawęcka K.: Rola enzymów w żywieniu drobiu. Postępy Drobiarstwa, 3, 44-49, 1995.
5. Grela E. R.: Skład chemiczny i użyteczność pokarmowa nasion lędwianu. Przegl. Hod., 62, 2, 9-11, 1994.
6. Kołodziej L.: Dodatek fitazy do paszy poprawia przyswajalność fosforu. Biul. Inf. Drob., 3, 19-20, 1991.
7. Korol W., Wójcik S., Niedźwiadek T., Adamczyk T.: Biul. Nauk. Przem. Pasz., 7-15, 3-4, 1996.
8. Mohrig W. and Messner B.: Immunoreaktionen bei Insekten. I. Lysozym als grundlegender antibakterieller Faktor im humoralen Abwehrmechanismus der Insekten Biol. Zbl., 87, 439-70, 1968.
9. Pisarski R. K., Lipiec A.: Wpływ fitazy paszowej na wyniki kurcząt brojlerów. Dodatki Paszowe w Żywieniu Zwierząt. XXVI Sesja Naukowa Komisji Żywienia Zwierząt KNZ. PAN. Olsztyn, 27-28, 1996.
10. Samół S., Sokołowski M.: Zatrucie azotanami i azotynami u bydła. Med. Wet., 36, 477, 1980.
11. Staśkiewicz G.: Zatrucia azotanami i azotynami u zwierząt. Med. Wet., 20, 608, 1964.
12. Studziński T., Grela E. R.: Składniki przeciwżywieniowe nasion lędwianu siewnego (*Lathyrus sativus* L.) i mechanizmy ich szkodliwego działania. Międzynarodowe Sympozjum Naukowe: Lędwian siewny – agrotechnika i wykorzystanie w żywieniu zwierząt i ludzi, 72-79, Radom 9-10 VII 1997.
13. Swan P. F.: The Toxicology of Nitrate, Nitrite and N-nitroso Compounds. J. Sci. of Food and Agric. 26, 1761, 1975.
14. Troszyńska A., Honke J., Milczak M., Kozłowska H.: Antinutritional Substances in Lentil (*Lens culinaris*) and Everlasting Pea (*Lathyrus sativus* L.). Pol. J. Food Nutr. Sci., 43, 2, 49-54, 1993.
15. Żyła K., Koreleski J.: In-vitro and In-vivo Dephosphorylation Rapeseed Meal by Means of Phytate-Degrading Enzymes Derived from *Aspergillus niger*. J. Sci. Food Agriculture, 16, 1-6, 1993.

SUMMARY

The suppressive effects of potassium nitrite and potassium nitrate was noted on the lysozyme level in tissues and blood of broiler chickens. The growth rate of the chickens from experimental groups was depressed distinctly, but the level of lysozyme in tissues and blood was lowered. The changes

in the level of lysozyme were highest in the liver, kidney, lungs, spleen and blood but in the heart it was lowest.

The effect of dietary phytase (*Natuphos 5000*- BASF) supplementation on the lysozyme level in blood plasma of broiler chickens (Starbro line) and Pharaoh quails during 8 weeks was noticed. After 4 weeks of experimental feeding blood plasma lysozyme content decreased in broiler chickens and then was followed by an increase after the further 4 weeks of experimental phytase feeding. Contrary to chickens, the quails reacted with an increase of blood plasma lysozyme level after 4 weeks of dietary phytase supplementation. After the following 4 weeks of experimental feeding there was a decrease with still higher values by about 40% of lysozyme level when compared to control values.

Supplementation of basal diets with raw flat pea seeds affects the level of blood plasma lysozyme. The level of lysozyme in the guinea-pigs fed on the diet supplemented with raw flat pea seed amounted to 116.3 $\mu\text{g/ml}$ and differed significantly from the mean control value (145.0 $\mu\text{g/ml}$). The lysozyme level of the guinea-pigs fed on supplemented and extruded flat pea seeds amounted to 127.0 $\mu\text{g/ml}$.

Wpływ kompostów z udziałem kału lisów na stan sanitarny rzodkiewki i jej plonowanie

Effect of Composts with Rat Faeces Share on the Hygienic State of Radish and its Yielding

Kał lisów jest powszechnie stosowany głównie w nawożeniu warzyw. W dostępnym piśmiennictwie nie spotkał się jeszcze opis określonych efektów i składu chemicznego tego nawozu. Istotnym ograniczeniem w stosowaniu kału lisów jest raczej częsta obecność w nim patogennej drożdżki *Salmonella*, która zagraża zdrowiu ludzi i zwierząt. Drożdżakostwo to występuje często u lisów ze względu na żywienie ich mięsem lub odpadkami poubojowymi pochodzącymi od zwierząt chorych na salmonellozę lub rzodkiewki.

Zanieczyszczeniu wywołanej choroby zwierząt często słęgi glebi (10, 12). Patogen *Salmonella* odznaczają się długą przetrwalnością w glebie. W ten sposób M. J. B. (7) w przeprowadzonych badaniach stwierdził, że *S. typhimurium* w glebie około 115 dni, zaś *S. paratyphi B* do 210 dni.

Bakterie te cechują się również długotrwałą przetrwalnością w ściółce ściłkowej. Fakt ten ma duże znaczenie w związku z planowaniem uprawy ziemniaków. W wielu krajach od 40 do 50 lat nie jest wykazywany wzrost wrażliwości. W badaniach próbkach tzw. podłożonych z pił, stwierdzano silnym podłożym procesowi biologicznemu, skutkiem, wykazywane obecność salmonelli w okresie do 6 tygodni (11). Podobnie w próbkach piaskowych z zanieczyszczenia w czasie 3 tygodni bakterie przetrwały 40 tygodni (11).

Wyodrębniając z wyizolowanych próbek podłożonych salmonelli bakterie, odnotowano ich dużą ilość przed zwałkowaniem piasku z rodzaju *Salmonella* w kale lisów, nawet w