



Nitrat til grise

2. Mikrobiel reduktion af nitrat og nitrit i forskellige tarm-afsnit hos unge grise tildelt nitratholdigt drikkevand

Bent Borg Jensen, Afd. for Dyrefysiologi og Biokemi

Hanne Damgaard Poulsen og Martin Tang Sørensen, Afd. for Forsøg med Svin og Heste

Torben Geest og Raymond P. Cox, Biokemisk Institut, Odense Universitet

I nærværende Meddelelse beskrives *in vitro* eksperimenter (inkubationsforsøg), der havde til formål at klarlægge, hvorledes nitrat og nitrit omsættes af mikrofloraen i mave-tarmkanalen hos unge grise.

Kort- og langtidsinkubationsforsøg med ^{15}N -mærket nitrat og nitrit viste klart, at der ikke skete nogen mikrobiel denitrifikation (reduktion af nitrat (NO_3^-) til frit kvælstof (N_2)) på noget sted i mavetarmkanalen hos grisene. Derimod viste nærværende forsøg, at der sker en nitratreduktion, hvorved nitrat og nitrit reduceres til ammoniak.

Forsøgene viste, at den tildelte nitrat kunne reduceres til ammoniak af mikrofloraen i grisenes mave, og at denne reduktion skete uden nogen nævneværdig ophobning af nitrit undervejs i processen. Kun ved reduktion af nitrat til ammoniak i tarmindehold fra den sidste trediedel af tyndtarmen skete der en betydelig intermedieær ophobning af nitrit.

Nærværende og tidligere undersøgelser tyder således stærkt på, at grise med en sund og stabil mave-tarmflora kan tåle endog store mængder nitrat i drikkevandet.

Indledning

I to foregående Meddelelser fra SH (nr. 750 og 764) har vi gennemgået, hvorledes store mængder nitrat i drikkevandet påvirker unge grisenes fysiologi og produktionsresultater, og hvorledes nitrat påvirker tarmfloraens sammensætning og aktivitet.

I nærværende meddelelse beskriver vi *in vitro* eksperimenter (inkubationsforsøg), der havde til formål at klarlægge mikrofloraens betydning for nitrat- og nitritomsætningen i mave-tarmsystemet hos unge grise.

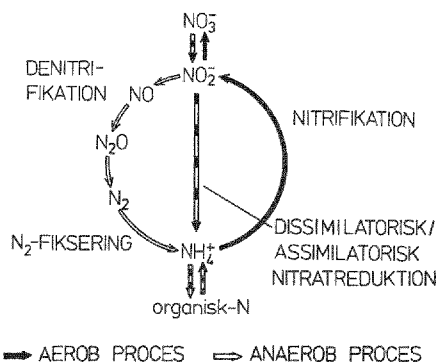


Fig. 1. Kvælstofcyklen.

Som det fremgår af figur 1 kan visse bakterier danne nitrat ud fra ammonium, medens andre kan danne ammonium ud fra nitrat.

Er der således iltmangel i et substrat (miljø) kan visse bakterietyper skaffe sig energi ved at anvende nitrat (NO_3^-) og nitrit (NO_2^-) til at oxidere bl.a. kulhydrater. Herved reduceres nitrat til nitrit og nitrit til enten ammonium (NH_4^+) eller frit kvælstof (N_2). Processen, hvorved der dannes frit kvælstof, via nitrogenoxid (NO) og lattergas (N_2O) kaldes denitrifikation, medens processen, hvor der dannes NH_4^+ kaldes dissimilatorisk nitratreduktion. Begge processer sker kun under anaerobe forhold.

Andre typer af bakterier er i stand til at benytte ammonium som energikilde i en proces, hvor ammonium oxideres til nitrit, der igen af andre typer af bakterier kan videre oxideres til nitrat. For at disse processer kan finde sted, har bakterierne brug for ilt. Processerne sker således kun under aerobe forhold.

Endelig kan nitrat også anvendes af mange bakterier til dannelse af aminosyrer og protein. Dette sker via en proces, der kaldes assimilatorisk nitratreduktion, i hvilken nitrat reduceres via nitrit til ammonium, der så indbygges som organisk bundet nitrogen i bakteriernes proteiner. Denne proces kan foregå såvel under anaerobe som under aerobe forhold, men i modsætning til den dissimilatoriske nitratreduktion hæmmes processen af ammonium.

Forholdene i mave-tarmsystemet hos grise, hvor der normalt hersker anaerobe forhold samtidigt med, at der findes høje koncentrationer af ammonium, er således optimale for denitrificerende bakterier og for dissimilatorisk nitratreducerende bakterier. Derimod synes der ikke at være mulighed for mikrobiel stimuleret nitrifikation (intet ilt) eller assimilatorisk nitratreduktion (for høj ammoniumkoncentration).

Materiale og metoder

Til undersøgelserne er anvendt tarmmateriale fra 8 grise fordelt på 2 hold, der fik drikkevand indeholdende hhv. 0 eller 2000 ppm nitrat.

Efter aflivningen (2 timer efter morgenfodringen) blev der fra hver gris på de to hold udtaget tarmprøver som beskrevet i Meddelelse

764. Af det udtagne tarmmateriale blev der fremstillet en anaerob opslemning. 3×50 ml fra hver opslemning blev inkuberet anaerobt ved 37°C i 100 ml infusionsflasker.

En flaske i hver serie blev brugt som kontrol, en blev tilsat 2mM NO_2^- og en 2mM NO_3^- . Den resterende del af hver opslemning blev anvendt til massespektrometrisk bestemmelse af denitrifikationskapaciteten.

Princippet bag den anvendte massespektrometriske (MS) teknik er kort, at man ved at anvende en membråndækket sonde, der er forbundet direkte til et massespektrometer, er i stand til – kontinuerligt – at måle koncentrationen af gasser i en væske (opslemning af tarmindhold), idet de opløste gasser diffunderer over membranen og ind i massespektrometret, hvor de ioniseres og adskilles, afhængig af deres masse til ladningsforhold (m/z).

For at kunne skelne N_2 og N_2O produceret ved denitrificering, fra atmosfærens N_2 ($m/z = 28$) og CO_2 ($m/z = 44$) blev der anvendt ^{15}N – NO_3^- og ^{15}N – NO_2^- , idet der ved denitrifikation af disse vil dannes $^{15}\text{N}_2$ ($m/z = 30$) og $^{15}\text{N}_2\text{O}$ ($m/z = 46$).

Resultater

Den anvendte MS-teknik blev testet med en kultur af den denitrificerende bakterie *Paracoccus denitrificans*. Et typisk forløb af en sådan test er vist i figur 2. Som det ses, sker der straks efter, at bakteriesuspensionen tilsættes $^{15}\text{NO}_2^-$ en dannelse af $^{15}\text{N}_2\text{O}$, og i løbet af mindre end et minut er alt det tilsatte $^{15}\text{NO}_2^-$ omsat til $^{15}\text{N}_2\text{O}$, der derefter blev videre reduceret til $^{15}\text{N}_2$. Efter ca. 20 min. var alt det tilsatte $^{15}\text{NO}_2^-$ reduceret til frit $^{15}\text{N}_2$.

Tilsvarende forsøg blev udført med de forskellige opslemninger af tarmindhold, men i intet tilfælde kunne der måles nogen produktion af hverken $^{15}\text{N}_2\text{O}$ eller $^{15}\text{N}_2$. Langtidsinkubationen (24 timer) viste heller ingen produktion af $^{15}\text{N}_2\text{O}$ eller $^{15}\text{N}_2$.

Den mikrobielle reduktion af nitrat og nitrit blev bestemt ved løbende at følge ændringer i koncentrationen af NO_3^- , NO_2^- og NH_4^+ i forsøg, hvor 50 ml fra hver suspension blev inkuberet hhv. uden nogen tilsætning, tilsat 2mM NO_2^- og tilsat 2mM NO_3^- . Typiske forløb fra sådanne inkubationsforsøg er vist i figur 3.

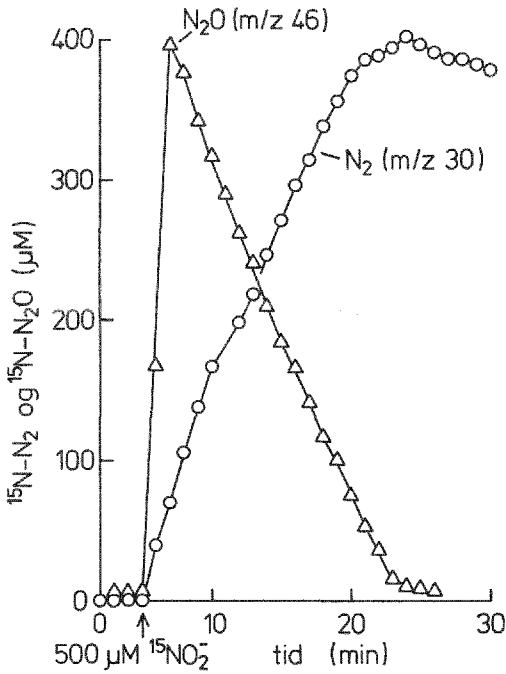


Fig. 2. Reduktion af $^{15}\text{NO}_2^-$ i ren kultur af den denitrificerende bakterie *Paracoccus denitrificans*.

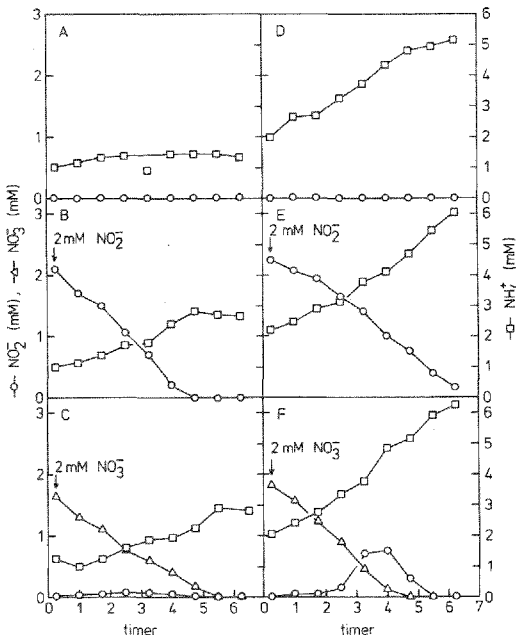


Fig. 3. Ændringen i koncentrationen af nitrat, nitrit og ammonium i en 25% opslemning af maveindhold (A-C) og tarmindhold fra den sidste trediedel af tyndtarmen (D-F) fra en gris fra kontrolholdet, inkuberet anaerobt ved 37°. hhv. uden nogen tilsætning, tilsat 2mM NO_2^- og tilsat 2mM NO_3^- .

Som det fremgår af figur 3, forblev NH_4^+ koncentrationen konstant, når en 25% opslemning af maveindhold blev inkuberet uden nogen tilsætning (figur 3A). Tilsætning af 2mM NO_2^- til en sådan opslemning (figur 3B) medførte derimod en stigning i produktionen af NH_4^+ , en stigning, der svarede nøje til reduktionen af NO_2^- . Også tilsætning af 2mM NO_3^- (figur 3C) medførte en øget NH_4^+ -produktion. Også her var der god overensstemmelse mellem mængden af reduceret NO_3^- og mængden af produceret NH_4^+ . Figur 3C viser endvidere, at der kun skete en ganske svag intermediær ophobning af NO_2^- , når NO_3^- reduceres til NH_4^+ i en opslemning af maveindhold.

Figur 3D-E viser lignende forsøg, blot blev der her anvendt en 25% opslemning af tarmindhold fra den sidste trediedel af tyndtarmen. Som det fremgår af figuren, sker der en kraftig produktion af ammoniak selv ved inkubering uden tilsætning af hverken NO_2^- eller NO_3^- (Figur 3D). Ammoniakproduktionen var dog højere (ca. 1mM), når der blev tilsat NO_2^- og NO_3^- . Endvidere ses det af Figur 3F, at ved reduktion af NO_3^- i en opslemning af tarmindhold fra den sidste trediedel af tyndtarmen, sker der en kraftig intermediær ophobning af NO_2^- .

Ud fra hældningen af kurverne for nitrit- og nitratkoncentrationerne i figur 3, blev nitrit- og nitrat-reduktionskapaciteten bestemt for de respektive opslemninger. Dette blev gjort for samtlige opslemninger fra alle 8 grise. Midelværdierne for nitrat-reduktionskapaciteten, er vist i figur 4.

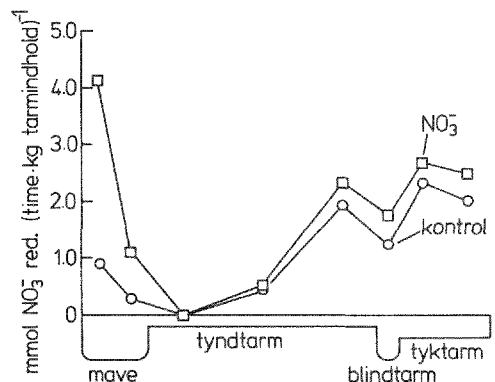


Fig. 4. Nitrat-reduktionskapaciteten i forskellige afsnit af mave-tarmsystemet hos hhv. kontrolholdet (-o-) og nitrat holdet (-□-).

Som det fremgår af figur 4 var der ikke nogen stor forskel på reduktionskapaciteten for nitrat mellem kontrolholdet og nitratholdet. Dog var den i første halvdel af maven ca. 3 gange så høj hos nitratholdet som hos kontrolholdet, ligesom tyktarmsindhold fra nitratholdet også havde en højere nitrat-reduktionskapacitet end indholdet fra kontrolholdet. Heller ikke for nitrit-reduktionskapaciteten var der den store forskel mellem de to hold. Den højeste aktivitet blev dog fundet i første halvdel af maven hos grise fra nitratholdet (resultater ikke vist).

Som det ses af figur 5 er nitrit-reduktionskapaciteten højere end nitrat-reduktionskapaciteten i alle tarmafsnit med undtagelse af den sidste trediedel af tyndtarmen. Dette stemmer godt overens med, at kun ved inkubation af tarmindehold fra dette afsnit af mave-tarmsystemet blev der iagttaget en intermediær ophobning af nitrit.

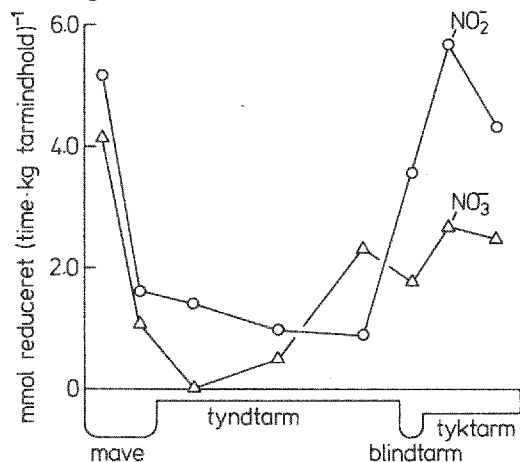


Fig. 5. Nitrat- (—△—) og nitritreduktionskapaciteten (—○—) i forskellige afsnit af mave-tarmsystemet hos grisene fra nitratholdet.

Diskussion

Nærværende kort- og langtidsinkubations-

forsøg med $^{15}\text{NO}_2^-$ og $^{15}\text{NO}_3^-$ viste klart, at der ikke på noget sted i mave-tarmkanalen hos grisene skete nogen mikrobiel denitrifikation.

Derimod viste vore forsøg, at der sker en dissimilatorisk nitratreduktion, hvorved nitrat og nitrit reduceres til ammoniak. Dette stemmer godt overens med udenlandske undersøgelser, der har vist, at denitrifikation er den dominerende proces i anaerobe miljøer med mangel på organisk materiale (sedimenter, jord, m.m.), hvorimod dissimilatorisk nitratreduktion er den dominerende proces i anaerobe miljøer med højt indhold af organisk materiale (rensingsanlæg, biogasanlæg, m.m.).

Som det fremgår af figur 4 blev der iagttaget en betydelig mikrobiel reduktion af nitrat til ammoniak af maveindhold fra den første halvdel af maven. For grisene på nitratholdet blev nitrat-reduktionskapaciteten bestemt til 4 mmol pr. kg pr. time. Da der var ca. 1,5 kg indhold i maven, vil der således kunne omsættes op til 6 mmol NO_3^- pr. time i maven eller 144 mmol pr. dag. 144 mmol NO_3^- svarer til 9 g NO_3^- pr. dag. Heraf kan ses, at grisene på nitratholdet, der fik tildelt op til 2,0 l drikkevand indeholdende 2000 ppm NO_3^- svarende til 4 g NO_3^- pr. dag, faktisk er i stand til at reducere hele den tildelte nitratmængde til ammoniak alene i maven. At alt den tildelte nitrat kan omsættes i maven, er ret væsentlig, da nitratreduktionen i maven sker uden at der under omsætningen sker nævneværdig ophobning af nitrit. Og det er nitrit og ikke nitrat, der er skadeligt.

Kun ved inkubation af indhold fra den sidste trediedel af tyndtarmen, blev der iagttaget en betydelig intermediær ophobning af nitrit. Det må således forventes at være særdeles uheldigt for grisenes sundhed, hvis nitrat ikke omsættes i maven, men føres helt ned til den sidste del af tyndtarmen.