

DISTRIBUZIONE DELL'ATTIVITA' UREASICA E DEI BATTERI UREOLITICI NEL TUBO  
DIGERENTE DEL CONIGLIO

Crociani Franca, Minardi Annalisa, Castagnoli Paola, Matteuzzi D.

\* Istituto di Microbiologia Agraria e Tecnica, Facoltà di Agraria

° Cattedra di Chimica delle Fermentazioni e Microbiologia Industriale,

Facoltà di Farmacia

Università degli Studi di Bologna, Italia

Introduzione

Da molti anni il problema dell'utilizzazione dell'urea da parte del coniglio ha suscitato l'interesse di numerosi ricercatori. Gli studi effettuati sono stati quasi sempre condotti da nutrizionisti o fisiologi mentre l'aspetto microbiologico non è mai stato approfondito. D'altra parte è noto (Candau *et al.* 1980) che l'urea ingerita dall'animale raggiunge solo in minima parte (circa il 10%) il cieco in quanto viene assorbita o idrolizzata nei tratti anteriori del canale digerente; per questo motivo si ritiene in genere che l'impiego dell'urea per l'alimentazione del coniglio non trovi una giustificazione sperimentale. Numerosi infatti sono i ricercatori che hanno dimostrato che l'aggiunta di urea alla dieta non porta a significativi incrementi in peso dell'animale (Olcese e Pearson, 1948; Houpt, 1963; King, 1971; Lebas e Colin, 1973; Hoover e Heitmann, 1975). Solo Slade (1970) ha trovato che l'aggiunta del 3% di urea ad una dieta contenente solo il 7% di proteine ha un effetto positivo per l'animale. Circa il ruolo fisiologico svolto dall'urea, di particolare interesse debbono essere considerate le ricerche di Houpt (1963) e Knutson *et al.* (1977) sull'utilizzazione dell'urea e sulla distribuzione dell' $\text{NH}_3$ , dell'urea e dell'ureasi nei vari tratti intestinali del coniglio. Secondo questi autori il coniglio utilizza urea endogena liberata nel cieco ove viene idrolizzata a  $\text{NH}_3$  ad opera dei batteri ureolitici. L' $\text{NH}_3$  sarebbe in parte assorbita e successivamente utilizzata per la sintesi epatica di aminoacidi non essenziali ed in parte

utilizzata nelle biosintesi microbiche. Solo recentemente sono stati effettuati studi microbiologici sul numero dei batteri ureolitici del contenuto ciecale, del ciecotrofo e delle feci di coniglio (Emaldi et al., 1979) e sulla identificazione delle principali specie batteriche responsabili della degradazione dell'urea nel cieco e ciecotrofo (Crociani et al., 1983). In questo lavoro viene descritto uno studio sulla distribuzione dei batteri ureolitici e dell'attività ureasica nei vari tratti del canale digerente del coniglio.

### Materiali e Metodi

Le caratteristiche dei conigli studiati, la composizione della dieta e le modalità di raccolta dei campioni sono quelle descritte da Emaldi et al. (1979).

E' stato esaminato il contenuto di sei porzioni dell'apparato digerente di 12 conigli, sacrificati mediante dissanguamento. Le porzioni prese in esame sono: stomaco, intestino tenue, cieco, appendice ciecale, colon e retto (feci). Le tecniche anaerobiche impiegate per la preparazione e sterilizzazione dei substrati preridotti, per l'inoculo e le diluizioni dei campioni sono quelle descritte da Holdeman et al. (1977). Le diluizioni decimali in serie nella soluzione minerale anaerobica (ADS) di John et al. (1974) sono state ottenute secondo Emaldi et al. (1979); per il conteggio dei batteri ureolitici è stato impiegato il substrato di Wozny et al. (1977) modificato omettendo il solfato ferroso. La concentrazione di urea-N impiegata è 50 mM. Le prove sono state condotte in quintuplo incubando per 5 gg a 37°C. Il MPN è stato valutato dal numero di colture che mostravano reazione positiva allo "spot test" di Wozny et al. (1977); come controllo positivo è stato impiegato il ceppo Bifidobacterium suis ATCC 27533. L'attività ureasica dei campioni è stata valutata mediante il metodo di Cook (1976) modificato aumentando il periodo di incubazione a 20 minuti, come descritto da Crociani e Matteuzzi (1982). L'attività specifica è stata espressa come  $\mu\text{moli NH}_3/\text{g campione}/\text{min}$ .

Per il calcolo del MPN sono state usate le tavole proposte da de Man :

(1975). I risultati sperimentali sono stati analizzati statisticamente con l'impiego del "t" di Student.

### Risultati e Conclusioni

Il dosaggio dell'attività ureasica nei vari tratti del tubo digerente del coniglio ha messo in evidenza (Tab. 1) che fra lo stomaco e l'intestino tenue non vi è differenza significativa ( $P < 0.05$ ), mentre differenza altamente significativa ( $P < 0.01$ ) è stata osservata confrontando fra loro tutti gli altri tratti esaminati; solo fra colon e retto la differenza è significativa per  $P < 0.05$ . L'attività ureasica, particolarmente bassa nello stomaco e nell'intestino tenue, risulta assai elevata soprattutto nel cieco e quindi decresce nel colon, retto e appendice ciecale.

Il conteggio dei batteri ureolitici ha messo in evidenza che vi è differenza altamente significativa ( $P < 0.01$ ) tra stomaco e intestino tenue e tra questi due tratti e tutti gli altri ed inoltre tra il cieco e le altre porzioni del tubo digerente esaminate; unica eccezione ( $P < 0.05$ ) tra cieco e retto. Non è stata osservata differenza significativa ( $P < 0.05$ ) tra appendice ciecale da una parte e colon e retto dall'altra, né tra questi ultimi due.

I valori e la distribuzione dell'attività ureasica da noi ritrovati (Fig.1) sono in generale accordo con quelli di Knutson et al. (1977): l'attività ureasica è molto scarsa nello stomaco e nell'intestino tenue e molto elevata nel cieco. Secondo Knutson et al. (1977) la quantità di urea presente nel piccolo intestino è elevata e costituisce la principale fonte di urea ciecale. Nel cieco invece, ove la popolazione batterica ureolitica e l'attività ureasica sono molto attive (Emaldi et al. 1979; Crociani et al. 1983), la quantità di urea è relativamente scarsa (Knutson et al., 1977). Anche l'attività ureasica del colon e del retto è relativamente alta e ciò trova giustificazione nell'elevato numero di batteri ureolitici ivi presenti.

Circa il numero di batteri ureolitici ritrovati nei vari tratti intesti-

nali e al loro rapporto con l'attività ureasica del tratto corrispondente, si può osservare che tale numero è molto basso nello stomaco e nell'intestino tenue, raggiunge il valore massimo nel cieco e si mantiene elevato nel colon e nel retto; esiste inoltre una stretta correlazione fra tale numero e l'attività ureasica dei vari tratti. Se si considera inoltre che recentemente sono state riconosciute le principali specie di batteri ureolitici presenti nel cieco e nel ciecotrofo (Crociani et al., 1983) appare sufficientemente chiarito il metabolismo dell'urea nel coniglio ed il ruolo svolto dai microorganismi in questo processo.

#### Riassunto

E' stata studiata la distribuzione dell'attività ureasica e il numero dei batteri ureolitici nello stomaco e nei vari tratti intestinali del coniglio. Sia l'attività ureasica che il numero dei batteri ureolitici sono bassi nello stomaco e nell'intestino tenue e raggiungono i valori più elevati nel cieco. Anche nel colon e nel retto questi valori si mantengono elevati. Viene discusso il ruolo svolto dai microorganismi ureolitici ciecali nel metabolismo dell'urea del coniglio.

#### Summary

The distribution of urease activity and the enumeration of anaerobic ureolytic bacteria in the gastrointestinal tract of rabbits were investigated. The urease activity and the number of ureolytic bacteria reached maximum level in the caecum whereas their values in the stomach and small intestine were very low. Also in the colon and rectum high values were found. The role that the ureolytic caecal bacteria play in urea metabolism was discussed.

Bibliografia

- CANAU M., FIORAMONTI J., TOUITOU M. Sites de degradation de l'urée dans le tube digestive du lapin. II° Congresso Mondiale Coniglicoltura - Barcellona - 81-89, 1980.
- COOK A.R. Urease activity in the rumen of sheep and the isolation of ureolytic bacteria. J. gen. Microbiol., 1976, 92, 32-48.
- CROCIANI F., MATTEUZZI D. Urease activity in the genus Bifidobacterium. Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur), 1982, 133 A, 417-423.
- CROCIANI F., BIAVATI B., CASTAGNOLI P. MATTEUZZI D. Anaerobic ureolytic bacteria from caecal content and soft faeces of rabbit. J. Appl. Bact. 1983 (in corso di stampa).
- de MAN J.C. The probability of most probable numbers. Europ. J. Appl. Microbiol., 1975, 1, 67-68.
- EMALDI O., CROCIANI F., MATTEUZZI D., PROTO V. A note on the total viable counts and selective enumeration of anaerobic bacteria in the caecal content, soft and hard faeces of rabbit. J. Appl. Bact., 1979, 46, 169-172.
- HOLDEMAN L.V., CATO E.P., MOORE W.E.C. (ed.) Anaerobe laboratory manual, 4th ed. Anaerobe Laboratory, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, 1977.
- HOOVER W.H., HEITMANN R.N. Cecal nitrogen metabolism and amino acid absorption in the rabbit. J. Nutr., 1975, 105, 245-252.
- HOUP T.R. Urea utilization by rabbits fed a low-protein ration. Am. J. Physiol., 1963, 205, 1144-1150.
- JOHN A., ISAACSON H.R., BRYANT M.P. Isolation and characteristics of a ureolytic strain of Selenomonas ruminantium. J. Dairy Sci., 1974, 57, 1003-1014.
- KING J. O. L. Urea as a protein supplement for growing rabbits. Brit. Vet. J., 1971, 127, 523-528.
- KNUTSON R. S., FRANCIS R. S., HALL J.L., MOORE B. H., HEISINGER J. F. Ammonia and urea distribution and urease activity in the gastrointestinal tract

of rabbits (Oryctolagus and Sylvilagus). Comp. Bioch. Physiol., 1977, 50 A, 151-154.

LEBAS F., COLIN M. Effect de l'addition d'urée à un régime pauvre en protéines chez le lapin en croissance. Ann. Zoot., 1973, 22, 111-113.

OLCESE O., PEARSON P.B. Value of urea in the diet of rabbits. Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 1948, 69, 377-379.

SLADE L.M., ROBINSON D.W. Nitrogen metabolism in rabbits and guinea pigs. J. Anim. Sci., 1970, 30, 1044.

WOZNY M.A., BRYANT M.P., HOLDEMAN L.V., MOORE W.E.C. Urease assay and urease-producing species of anaerobes in the bovine rumen and human feces. Appl. Environ. Microbiol., 1977, 33, 1097-1104.

Lavoro eseguito con un contributo del CNR nell'ambito del P.F. IPRA. Sottoprogetto 1. Pubblicazione N. 90

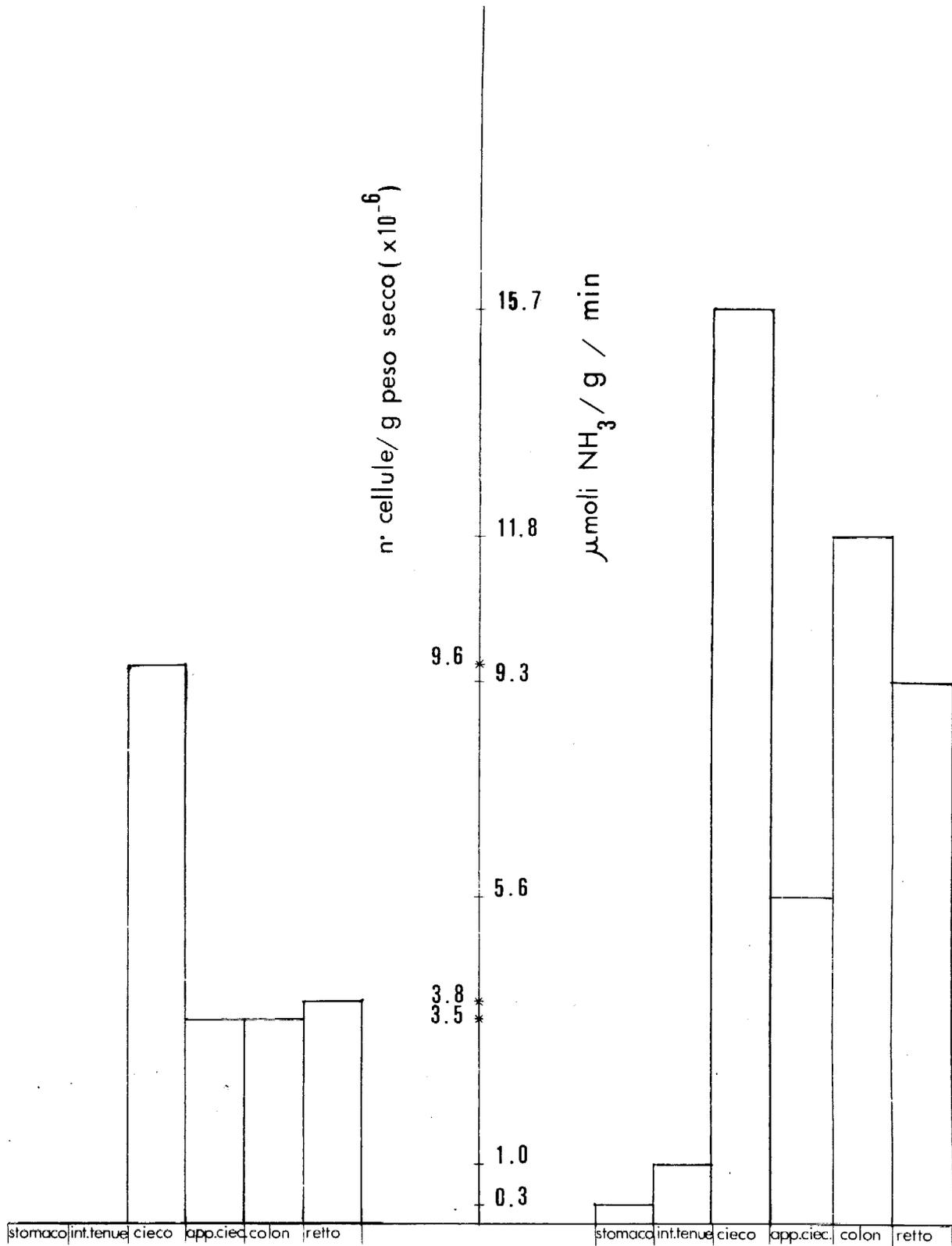


Fig.1\_ Distribuzione dell'attività ureasica e dei batteri ureolitici nei vari tratti del tubo digerente del coniglio.

Tab. 1 Attività ureasica e conteggio di batteri ureolitici nei vari tratti del tubo digerente del coniglio\*.

Tratto del tubo digerente	Stomaco	Intestino tenue	Cieco	Appendice ciecale	Colon	Retto
Attività ureasica specifica <sup>°</sup>	(8) <sup>§</sup> 0.3±0.04 (a)	(9) 1.02±0.14 (a)	(12) 15.67±1.0 (b)	(11) 5.6±0.51 (c)	(10) 11.8±0.51 (d)▲	(10) 9.26±0.96 (e)▲
Conteggio ureolitici <sup>+</sup>	(8) 1.84±0.47×10 <sup>3</sup> (A)	(8) 1.15±0.29×10 <sup>4</sup> (B)	(10) 9.6±1.18×10 <sup>6</sup> (D)▲	(10) 3.46±0.71×10 <sup>6</sup> (C)	(10) 3.48±0.61×10 <sup>6</sup> (C)	(10) 3.8±0.8×10 <sup>6</sup> (C)▲

\* I valori indicano la media e l'errore standard.

§ I numeri fra parentesi indicano il numero dei campioni esaminati.

° L'attività ureasica specifica è espressa in  $\mu\text{mol}$  di  $\text{NH}_3/\text{g}$  campione/min.

+ Il conteggio è espresso per g di materiale (peso secco).

Le medie con la stessa lettera indicano differenze non statisticamente significative per  $P < 0.05$ .

Le medie con lettere diverse indicano differenze statisticamente significative per  $P < 0.01$ .

▲ Indica differenze statisticamente significative per  $P < 0.05$ .

