

ВПЛИВ НІТРАТУ І НІТРИТУ НА СИСТЕМУ АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ У МІКРООРГАНІЗМІВ РУБЦЯ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

С. М. МЕЛІКЯН, Л. І. СОЛОГУБ

Інститут біології тварин УААН

У статті наведені результати досліджень in vitro впливу нітрату і нітриту на інтенсивність перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) та на активність ферментів антиоксидантного захисту в клітинах мікроорганізмів рубця. Показані особливості дії цих ксенобіотиків на вміст гідроперекисів ліпідів і малонового діальдегіду, на активність супероксиддисмутази і каталази, а також на інтенсивність метаноутворення у клітинах мікроорганізмів.

Ключові слова: ТЕЛЯТА, РУБЕЦЬ, МІКРООРГАНІЗМИ, НІТРАТИ І НІТРИТИ, ГІДРОПЕРЕКИСИ ЛІПІДІВ, МАЛОНОВИЙ ДІАЛЬДЕГІД, ФЕРМЕНТИ АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ.

Велика рогата худоба споживає з кормами значну кількість нітратів і нітритів антропогенного походження, які можуть впливати на обмінні процеси як у клітинах мікроорганізмів рубця, так і у клітинах організму тварини-господаря [1, 2]. Відомо, що серед симбіотичних бактерій є види здатні відновлювати ці оксиданти до аміаку, але частка їх у загальній популяції мікроорганізмів, і зокрема кількість бактерій переважаючого у цьому процесі виду *Selenomonas ruminantium*, є відносно невелика (10^7 клітин на мл) [3]. Тому, незважаючи на значну активність нітратредуктази цього і деяких менш поширених видів бактерій (*Wolinella succinogenes*, *Veillonella parvula*), інші види мікроорганізмів незахищені від дії цих ксенобіотиків. Слід також мати на увазі, що у зв'язку з неоднаковим рівнем активності нітрат- і нітритредуктази у клітинах мікроорганізмів рубця, перетворення нітриту в аміак є повільнішим, ніж перетворення нітрату в нітрит. Тому при надлишку нітрату в їх клітинах і у середовищі може нагромаджуватися особливо токсичний нітрит [4]. І нітрати, і нітрити як сильні окислювачі впливають на антиоксидантну систему клітин анаеробних мікроорганізмів, для яких кисень є токсичний [5]. Тому науково-практичний інтерес становить з'ясування впливу нітратів і нітритів на систему антиоксидантного захисту клітин мікроорганізмів рубця. У статті представлені результати досліджень впливу цих азотових сполук на рівень продуктів перекисного окислення ліпідів, а також активність ферментів антиоксидантного захисту в клітинах мікроорганізмів рубця великої рогатої худоби в дослідах in vitro.

Матеріали і методи

Дослідження проводилися у дослідному господарстві Інституту біології тварин УААН “Чишки” на трьох бичках чорно-рябої породи 12-місячного віку. Зразки вмістимого рубця для досліджень одержували через 2 години після ранкової годівлі, фільтрували і переносили в анаеробних умовах у буферну суміш. Інкубаційне середовище містило наступні інгредієнти (1 г на 1 л): рідини рубця – 300, K_2HPO_4 – 0,45, KH_2PO_4 – 0,45, $(NH_4)_2SO_4$ – 0,9, NaCl – 0,9, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ – 0,12, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,19, цистеїн хлорид – 0,6, дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* – 1 [6]. Після змішування, 50 мл цієї суміші вносили в інкубаційні посудини. Як джерело азоту додавались окремо: сечовина (30 мМ), сульфат амонію (60 мМ), нітрат або нітрит натрію (по 60 мМ), як джерело енергії – глюкоза (30 мМ). Посудини закривали корками, продували CO_2 й інкубували протягом 24 годин при температурі 38 °С. Після закінчення інкубації брали зразки рідини і газу для досліджень. У зразках рідини визначали вміст гідроперекисів ліпідів (ГПЛ) [7], малонового діальдегіду (МДА) [8], а також

активність супероксиддисмутази (СОД) [9], каталази [10], глутатіонпероксидази (ГП), глутатіонредуктази (ГР) [11], глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (Г-6ФД) [12], а також вміст білків за методом Лоурі й ін. [13]. У газовій фазі визначали кількість метану на газовому хроматографі SR18610B GAS (США).

Результати й обговорення

Як видно із таблиці і рисунка, досліджувані азотові сполуки при додаванні їх до інкубаційного середовища проявляють неоднаковий вплив на утворення продуктів перекисного окислення ліпідів, активність ферментів антиоксидантного захисту й утворення метану мікроорганізмами рубця. Так, вплив сульфату амонію і сечовини на ці показники був приблизно однаковий, а нітрит більшою мірою впливав на підвищення їх рівня, ніж нітрат. Зокрема, під впливом нітрату утворення гідроперекисів ліпідів і малонового діальдегіду зросло відповідно на 36 % і 67 %, а під впливом нітриту на 61 % і 126 %.

Таблиця

Вплив досліджуваних азотових сполук на вміст продуктів ПОЛ і активність антиоксидантних ферментів у мікроорганізмів рубця великої рогатої худоби при додаванні їх до інкубаційного середовища ($M \pm m$, $n=3$)

Показники	Контроль (сечовина)	Сульфат амонію	Нітрат	Нітрит
ГПЛ, Ех1000	459±13	433±12	623±15 ^{2*}	789±20 ^{3*}
МДА, ммоль/л	3,0±0,1	2,6±0,1	5,0±0,2*	6,8±0,2 ^{3*}
СОД, у.о./мг білків/хв	51±3	49±2	45±3	40±2*
Каталаза, у.о./мг білків/хв	2214±70	2005±53	1534±42 ^{2*}	865±40 ^{3*}
ГП, нмоль GSH/мг білків/хв	4,8±0,1	4,6±0,3	4,5±0,2	4,4±0,2
ГР, нмоль NADPH/мг білків/хв	5,9±0,1	5,6±0,2	5,0±0,2*	4,9±0,1 ^{2*}
Г-6-ФД, нмоль NADPH/мг білка/хв	45,4±2,0	44,7±1,8	35,4±1,4*	25,6±1,1 ^{3*}
Метан, мкмоль	372±23	360±19	279±15*	259±19*

Примітка. * – Різниця між даним показником і показником у контролі (з сечовиною) вірогідна (* – $P < 0,05$, ^{2*} – $< 0,01$, ^{3*} – $< 0,001$).

Відомо, ці азотові сполуки є активними окислювачами і можуть деякими видами бактерій відновлюватися до аміаку. Зокрема, показано [14], що основним нітратредукуючим мікроорганізмом у рубці жуйних тварин є бактерія виду *Selenomonas ruminantium*, популяція якої становить у залежності від характеру кормів $1,3 - 6,7 \times 10^7$ клітин/мл, тобто біля 1/100 частини всієї популяції мікрофлори рубця. Кількість двох інших видів бактерій рубця, які володіють нітратредукуючою активністю – *Veillonella parvula* і *Wollinella succinogenes* – набагато менша – відповідно $3,2 - 6,7 \times 10^3$ і $10^2 - 1,6 \times 10^3$ клітин/мл [15]. Цим і деяких інших видам [16] властива також нітритредуктазна активність, але інтенсивність редукції нітриту до аміаку є набагато менша, ніж швидкість утворення нітриту з нітрату [17]. Тому звичайно спостерігається нагромадження в рубці і всмоктування в кров цієї токсичної сполуки [18].

Відновлення нітрату і нітриту бактеріями рубця проявляє істотний вплив на ріст популяції інших видів і метаболізм в їх клітинах. Дані літератури [19, 20] свідчать про пригнічення цими сполуками, зокрема нітритом, целюлолітичних мікроорганізмів у рубці. Як видно з таблиці, в інкубованих з нітратом і нітритом зразках вмісту рубця спостерігається різке зниження продукції метану (на 25–30 %). Очевидно, у цьому випадку спостерігається конкуренція за водень між нітратредукуючими бактеріями і метансинтезуючими архебактеріями рубця, які його використовують для відновлення вуглекислого газу.

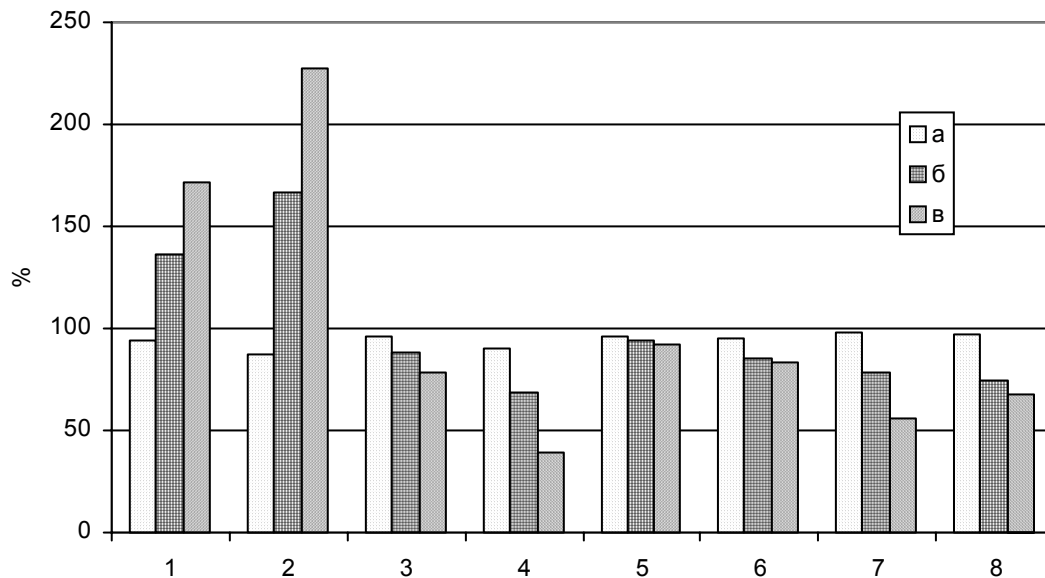


Рис. Зміни вмісту продуктів перекисного окислення ліпідів, активності ферментів антиоксидантного захисту та кількості утвореного метану в інкубаційному середовищі при додаванні аміаку (а), нітрату (б) і нітриту (в) (відносно сечовини – 100 %). 1 – гідроперекиси ліпідів, 2 – малоновий діальдегід, 3 – супероксиддисмутаза, 4 – каталаза, 5 – глутатіонпероксидаза, 6 – глутатіонредуктаза, 7 – глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа, 8 – метан

Значний вплив проявляють нітрат і нітрит на антиоксидантну систему захисту в мікроорганізмів. Відомо, що в клітинах бактерій є супероксиддисмутаза і каталаза [21, 22]. Як видно із діаграми на рисунку 1, на супероксиддисмутазну активність мікроорганізмів рубця нітрат істотно не впливає, а при інкубації з нітритом спостерігається вірогідне її зниження. (на 22 %). Особливо впливають нітрат і особливо нітрит на активність каталази (зниження відповідно на 40 і 60 %), яку деякі автори вважають цілком токсичної дії останнього [18]. У той же час на активність глутатіонпероксидази і глутатіонредуктази нітрати і нітрити впливають мало. Вважається, що у клітинах бактерій глутатіонова система антиоксидантного захисту дуже слабка [23], а основну роль у перетворенні перекису водню до води і молекулярного кисню відіграє каталаза. Очевидно, виявлена нами деяка активність ферментів цієї системи зв'язана з інфузоріями вмістимого рубця. Активність глюкозо-6-фосфатдегідрогенази і нітрат, і нітрит інгібує.

Висновки

Під впливом нітрату, й особливо нітриту, у рубці за умов *in vitro* збільшується вміст продуктів перекисного окислення та зменшується активність супероксиддисмутази (під впливом нітриту) й особливо каталази (під впливом і нітрату, і нітриту). На активність глутатіонпероксидази досліджувані азотові сполуки помітного впливу не проявляють, а інтенсивність метаногенезу під їх дією знижується.

S. M. Melikyan, L. I. Solohub

THE INFLUENCE OF NITRATE AND NITRITE ON ANTIOXIDANT DEFENSE SYSTEM IN RUMEN MICROORGANISMS OF CATTLE

Summary

The influence of nitrate and nitrite on peroxidative processes, antioxidant defense system and methanogenesis in rumen microorganisms of calves has been studied. It has been established, that under the influence of nitrate, and particularly nitrite, the content of peroxidative products has increased, whereas the activity of superoxide dismutase and

especially the activity of catalase has decreased. The investigated nitrogen compounds have not exerted any noticeable influence on the activity of glutathione peroxidase and the intensity of methanogenesis under their action has reduced.

The Institute of Animal Biology of the Academy of Agrarian Sciences of Ukraine

1. *Laven R. A., Biggadike H. J., Allison R. D.* The effect of pasture nitrate concentration and concentrate intake after turnout on embryo growth and viability in the lactating dairy cow // *Reprod.Domest.Animals.*–2002. – Vol. 37. – P. 111–119.
2. *Miyazaki A.* Effects of dietary nitrate on the performance of ruminants // *Jap. J. Zootechn. Sci.* – 1977. – Vol. 48. – P. 53–61.
3. *Iwamoto M., Asanuma N., Hino T.* Ability of *Selenomonas ruminantium*, *Veillonella parvula*, and *Wolinella succinogenes* to reduce nitrate and nitrite with special reference to the suppression of ruminal methanogenesis // *Anaerobe.* – 2002. – Vol. 8. – P. 209–215.
4. *Asanuma N., Iwamoto M., Yoshii T., Hino T.* Molecular characterization and transcriptional regulation of nitrate reductase in a ruminal bacterium, *Selenomonas ruminantium* // *J. Gen. Appl. Microbiol.* – 2004. – Vol. 50. – P. 55–63.
5. *Тараканов Б. В., Гуцин Н. Н., Николичева Т. А. и др.* Микрофлора рубца коров при разных уровнях нитратного азота в рационе // *Бюлл. Всес. н.-и. Ин-та физиол., биохим. и питания с.-х. животных.* – 1987. -В. 3. – С. 24–28.
6. *Lopez S., Valdes C., Newbold C. J., Wallace R. J.* Influence of sodium fumarate addition on rumen fermentation in vitro // *Brit. J. Nutr.* – 1999. – Vol. 81, N 1. – P. 59–64.
7. *Мирончик В. В.* Способ определения гидроперекисей липидов в биологических тканях // Автор. Свидетельство СССР № 1084681 А.
8. *Коробейникова С. Н.* Модификация определения ПОЛ в реакции с ТБК // *Лаб. дело.* – 1989. – В. 7. – С. 8–9.
9. *Дубинина Е. Е., Сальникова Л. Я., Ефимова Л. Ф.* Активность и коферментный спектр СОД эритроцитов // *Лабораторное дело.* – 1983. – В. 10. – С. 30–33.
10. *Королюк М. А., Иванова И. Г., Майорова И. Г., Токарев В. Е.* Метод определения активности каталазы // *Лабораторное дело.* – 1988. – В. 1. – С. 16–18.
11. *Моин В. М.* Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах // *Лабораторное дело.* – 1986. – В. 12. – С. 724–733.
12. *Астауров Б. Л.* Методы биологии развития. – М. 1974. – С. 346–433
13. *Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.* Protein measurement with the Folin reagent // *J. Biol. Chem.* – 1951. - Vol. 193, N1. – P. 265–273.
14. *Yoshii T., Asanuma N., Hino T.* Number of nitrate- and nitrite reducing *Selenomonas ruminantium* in the rumen , and possible factors affecting its growth // *Animal Sci. J.* – 2003. – Vol. 74. – P. 483–491.
15. *Asanuma N., Iwamoto M., Kawato M., Hino T.* Numbers of nitrate-reducing bacteria in the rumen as estimated by competitive polymerase chain reaction // *Animal Sci. J.* – 2002. – Vol. 73, N 3. – P. 1334–1349.
16. *Cheng K. J., Phillippe R. C., Majak W.* Identification of rumen bacteria that anaerobically degrade nitrite // *Can. J. Microbiol.* – 1988. – Vol. 34, N 9. – P. 1099–1102.
17. *Yoshii T., Asanuma N., Hino T.* Effect of ethanol on nitrate and nitrite reduction and methanogenesis in the ruminal microbiota // *Anim. Sci. J.* – 2005. – Vol. 76. – P. 37–42.
18. *Тумов В. Ю., Петренко Ю. М.* Нитрит-каталазное взаимодействие как важный элемент токсичности нитрита // *Биохимия.* – 2003. – Т. 68, N 6. – С. 627–633.
19. *Marais J. P., Therion J. J., Mackie R. I. et al.* Effect of nitrate and its reduction products on the growth and activity of the rumen microbial population // *Br. J. Nutr.* – 1988. – Vol. 59, N 2. – P. 301–313.
20. *Iwamoto M., Asanuma N., Hino T.* Effect of nitrate combined with fumarate on methanogenesis, fermentation, and cellulose digestion by mixed ruminal microbes in vitro // *Animal Sci. J.* – 1999. – Vol.70, – P. 471–478.
21. *Laukova A., Marounek M.* Physiological and biochemical characteristics of staphylococci isolated from the rumen of young calves and lambs // *Zentralbl. Microbiol.* – 1992. – Vol. 147, N 7. – P. 489–494.

22. *Fulghum R. S., Worthington J. M.* Superoxide dismutase in ruminal bacteria // *Appl Environ Microbiol.* – 1984. – Vol. 48, N 3. – P. 675–677.
23. *Волторністий А. В., Сологуб Л. І., Антоняк Г. Л. і ін.* Вплив вітаміну Е і селеніту натрію тна перекисні процеси та антиоксидантний захист у рубці телят // *НТБюлетенгь Ін-ту біології тварин.* – 2004. – Вип. 5, N 5. – С. 97–101.

