

ВПЛИВ МІНЕРАЛЬНИХ ЕЛЕМЕНТІВ НА ДЕЯКІ ПОКАЗНИКИ ЖИТТЄДІЯЛЬНОСТІ МІКРООРГАНІЗМІВ РУБЦЯ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

А. В. ВОЛТОРНІСТІЙ, Л. І. СОЛОГУБ, М. Г. ГЕРАСИМІВ

Інститут біології тварин УААН

У статті наведені дані про результати досліджень впливу різних мінеральних елементів на життєдіяльність бактерій і інфузорій рубця й утворення летких жирних кислоті in vitro.

Ключові слова: ТЕЛЯТА, РУБЕЦЬ, БАКТЕРІЇ, ІНФУЗОРИЇ, МІНЕРАЛЬНІ ЕЛЕМЕНТИ, МАСА МІКРООРГАНІЗМІВ, ЛЕТКІ ЖИРНІ КИСЛОТИ, АМІАК, МЕТАН.

Більшість мікроорганізмів рубця жуйних тварин належать до облигантних і факультативних анаеробів, однак на них постійно впливає кисень, який попадає у рубець з водою, кормами або при жуйці [1]. З кормами в рубець поступають у вигляді мінеральних солей різні мікро- і макроелементи, які володіють як прооксидантними, так і антиоксидантними властивостями і тим самим впливають на захисні системи мікроорганізмів, їх ріст і життєдіяльність. Відомо, що деякі перехідні метали можуть, у залежності від рівня відновлюваності, посилювати токсичний вплив кисню на клітини мікроорганізмів, або, навпаки, стимулювати у них захисні процеси. Деякі з мікроелементів у клітинах еукаріот входять до складу антиоксидантних ферментів. Зокрема, селен вважається сильним антиоксидантом, оскільки він входить у вигляді селеноцистеїну в молекулу глутатіонпероксидази [2]. Залізо у вигляді гему входить до складу каталази, а марганець, цинк і мідь – до складу супероксиддисмутази [3]. Вказані мікроелементи при збільшенні їх кількості в раціонах тварин підвищують активність антиоксидантних ферментів. Що стосується прокаріотичних рубцевих мікроорганізмів, то їх відношення до різних мікроелементів як з про- чи антиоксидантними властивостями, з'ясоване мало, хоч є дані, що у глутатіонпероксидазі відсутній селен, а каталазі – залізо [4]. У той же час у бактерій, на відміну від вищих тварин, переважає супероксиддисмутаза, яка активується залізом (II) або марганцем (II). Тому науково-практичний інтерес становляють дані про вплив окремих перехідних мікроелементів на мікроорганізми рубця великої рогатої худоби. Метою наших досліджень було вивчення впливу деяких мікроелементів на ріст бактерій і інфузорій рубця та вміст деяких продуктів їх життєдіяльності при введенні їх у вмістиме рубця in vitro.

Матеріали і методи

Дослідження проведено на трьох бичках 6-місячного віку в дослідному господарстві інституту “Чишки”. У склад збалансованого за основними елементами живлення раціону тварин входив силос, кормовий буряк, сіно та концкорми. Поживність його відповідала віковим потребам телят. Через 2 години після годівлі через фістули брали зразки вмістимого рубця, проціджували його через 4 шари марлі, центрифугували протягом 20 хвилин при 2000 об/хв. Рідку його фракцію центрифугували протягом 20-ти хвилин при 20000 об/хв і одержували в осаді фракцію бактерій (фракція 2). Осад від першого центрифугування розчиняли у фільтраті, одержаному при центрифугуванні 20000 об./хв, змішували його у 250-мілілітровій ділільній лійці і брали нижній білий шар інфузорій (фракція 3). Зразки 2 і 3 фракцій двічі промивали 0,05М тріс-НС1 буфером (рН 7,2) з наступним центрифугуванням при 20000 об/хв протягом 10-ти хвилин. Одержані в осаді клітини використовували у дослідженнях. До інкубаційної рідини, що містила бактерії й інфузорії, додавали окремо

Na₂S, Na₂SO₄, CrCl₃, Na₂CrO₄, Na₂SeO₃, ZnCl₂, NiCl₂, FeCl₃, MnCl₂, CuSO₄ (по 10 мМ). Контролем служили зразки, в які не додавали досліджувані субстрати. Після інкубації в інкубаційному середовищі визначали вміст маси бактерій і інфузорій (ваговим методом), аміаку [5], сумарної кількості летких жирних кислот [6]. В газовій фазі визначали кількість утвореного метану на газовому хроматографі.

Результати й обговорення

Як видно із таблиць 1 і 2, у життєдіяльності і метаболізмі клітин мікроорганізмів рубця важливу роль відіграють мінеральні елементи. Особливе значення у цьому відношенні становить сірка. Так, при додаванні до інкубаційного середовища сульфату або сульфіді натрію маса бактерій зростала відповідно на 36 і 37 % (P < 0,05). При цьому в інкубаційному середовищі вірогідно збільшувалася концентрація летких жирних кислот (на 23 і 31 %) та зменшувався вміст аміаку відповідно на 33 і 39 % (P < 0,05). Під впливом аніону сульфату продукція метану бактеріями також знижувалася. Подібний вплив сульфату натрію і сульфіді натрію, внесених у середовище, на досліджувані показники виявлено при інкубації інфузорій. Маса їх клітин при додаванні вказаних солей сірки за час інкубації збільшилась відповідно на 10 і 44 % при (P < 0,5 і P < 0,005), а вміст аміаку знизився на 35 і 39 %. Це може бути зумовлено підвищеним використанням мікроорганізмами рубця сірки для синтезу сірковмісних амінокислот (цистеїну, метіоніну), які є лімітуючими амінокислотами при синтезі білків, а також інших сполук у їх клітинах. Разом з тим, вміст летких жирних кислот в інкубаційному середовищі з бактеріями під впливом іонів сульфату і сульфіді вірогідно зростав у порівнянні з контролем на 24 і 32 % відповідно, тоді як у інкубаційному середовищі інфузорій збільшення ЛЖК відмічене лише в дослідах з сульфатом. Якщо врахувати, що у клітинах сірка засвоюється перетворенням сульфату в органічну форму шляхом утворення аденозин-5-фосфосульфату [7], то з цих даних випливає, що в інфузорій швидкість відновлення сульфіді є недостатня для забезпечення оптимальних потреб їх клітин у органічній сірці. До того ж специфіка живлення інфузорій за рахунок бактерій виключає потребу інтенсивного синтезу сірковмісних амінокислот в їх клітинах.

Проведені дослідження показали, що у життєдіяльності мікрофлори і мікрофауни рубця суттєву роль відіграють також мікроелементи. Як видно із даних, наведених у таблиці 1, внесення в інкубаційне середовище 3-валентного хрому підвищувало масу мікрофлори і мікрофауни рубця. Що стосується 6-валентного хрому, то стимулюючий вплив цього мікроелемента на ріст бактерій виявлено лише тоді, коли в інфузорій він був відсутній. Очевидно, у мембранах клітин інфузорій активність гідрогеназ, що відновлюють хром (VI) у (хром (III)), є більш слабкою, ніж у клітинах бактерій [8]. У цілому маса бактерій за період інкубації при додаванні до інкубаційного середовища 3- і 6-валентного хрому, зросла у порівнянні до контрольних зразків на 39 і 38 % відповідно, а маса інфузорій – на 70 і 24 %.

Таблиця 1

Деякі показники життєдіяльності бактерій і інфузорій при додаванні до інкубаційного середовища різних сполук сірки і хрому (M±m, n=3)

Показники	Контроль	SO ₄ ²⁻	S ²⁻	Cr ²⁺	CrO ₄ ²⁻
Бактерії					
Маса бактерій, мг/100 мл	112±8	155±7**	157±9**	156±5**	155±7*
Аміак, мг/л	18±1	12±2*	11±1*	13±2*	12±1**
ЛЖК, мМ/л	140±5	174±6*	185±9*	163±9	153±6
Метан, мкМ	372±23	258±11*	289±12*	390±10	300±14*
Інфузорії					
Маса інфузорій мг/100мл	50±4	55±7*	72±4*	85±5*	62±5
Аміак, мг/л	12±1	12±2*	11±1*	9±1	13±1

ЛЖК, мМ/л	74±2	94±6*	82±7	85±8	81±3
Метан, мкМ	36±3	58±11*	39±4	39±4	32±2

Примітка. Міжгрупові різниці вірогідні: * P< 0,05; ** P< 0,01; ***P< 0,001.

При інкубації бактерій вміст аміаку в середовищі, до якого додавали сполуки хрому, вірогідно зменшувався (P<0,05–0,01), що свідчить про підвищення використання його для синтезу мікробного білка. Менш вираженим був вплив обох хромвмісних сполук на продукти життєдіяльності інфузорій: Різниці у вмісті загальної кількості ЛЖК в інкубаційному середовищі у дослідних зразках порівняно до контрольного невірогідні (P<0,5).

Інші досліджувані мікроелементи – селен, цинк, залізо, мідь, марганець і нікель по-різному впливають на ріст і функціональну активність бактерій рубця (табл. 2).

Таблиця 2

Деякі показники життєздатності бактерій і інфузорій рубця при додаванні до інкубаційного середовища деяких мікроелементів(M±m, n=3)

Показники	Контроль	Se ²⁺	Zn ²⁺	Fe ³⁺	Cu ²⁺	Mn ²⁺	Ni ²⁺
Бактерії							
Маса бактерій, Мг/100 мл	114±8	143± 9*	158±12*	121±9	124±5	125±7	120±3
Аміак, мГ/л	18±1	13± 1*	12±1*	15±1	14±2	15±1	19±1
ЛЖК мМ/л	141±6	172± 8*	193±15*	152±9	155±7	139±7	152±10
Метан, мкМ	372±23	380± 10	355±19	364±19	350±11	388±20	482±25*
Інфузорії							
Маса інфузорій, мг/100мл	50±4	70±4*	83±5*	62±4	60±5	60±3	54±3
Аміак, мг/л	12±1	10± 1	7±1*	10±1	10±2	13±1	13±2
ЛЖК, мМ/л	74±2	71±7	88±9*	80±3	74±3	70±2	72±4
Метан, мкМ	36±3	35± 4	33±3	30±2	28±2	33±2	58±3**

Примітка. Вірогідність міжгрупових різниць як у табл.1.

При додаванні до інкубаційного середовища селену маса бактерій і інфузорій відповідно зростає на 25 і 40 %, під впливом цинку – на 39 і 66 %, тоді як при інкубації з іншими іонами (Fe³⁺, Cu²⁺, Mn²⁺, Ni²⁺) вона суттєво не змінюється (P >0,5). Очевидно, у бактерій селен і цинк впливають на інші системи захисту клітин шляхом активації гідрогеназ і транскрипційних та реплікаційних факторів [9]. На користь цього свідчить також посилення використання аміаку в біосинтетичних процесах, а також збільшення продукції легких жирних кислот під впливом цих двох мікроелементів. У інфузорій подібні зміни у використанні аміаку й утворенні легких жирних кислот відмічені лише під впливом цинку.

При аналізі одержаних результатів звертає на себе увагу посилення метаноутворення бактеріями рубця під впливом нікелю, який, як відомо, входить до складу кофактора цього процесу [10]. Що стосується метаногенезу в інфузорій, які не належать до метаногенних мікроорганізмів, то, очевидно, одержані результати відображають їх асоціацію з архебактеріями на поверхні їх клітин [11,12]. Як видно із цифрових даних таблиць, біля 10 % цих мікроорганізмів зв'язані з інфузоріями.

Висновки

Під впливом сірки, хрому, цинку при додаванні їх до інкубаційного середовища хрому, цинку маса мікроорганізмів вірогідно зростала, а концентрація аміаку в ньому знижувалася.

На утворення летких жирних кислот у бактерій стимулюючу дію мали сірка і цинк, тоді як у інфузорій додавання будь-якого із досліджуваних мінеральних елементів на цей процес не впливало.

Додавання до інкубаційного середовища заліза, нікелю, кобальту на ріст і показники життєздатності мікроорганізмів істотно не впливали.

Бактерії рубця в умовах *in vitro* продукують значну кількість метану. Цей процес інгібувався аніонами сульфату, активувався іонами нікелю.

A. V. Voltornisty, L. S. Solohub, M. G. Herasymiv

EFFECT OF MINERAL ELEMENTS ON SOME INDICES OF VITAL ACTIVITY OF RUMEN MICROORGANISMS IN CATTLE

S u m m a r y

The addition of mineral elements to the incubation medium has differently influenced growth and functional activity of bacteria and protozoa of rumen in cattle. Particularly, under the influence of sulphur, chromium and zinc the mass of microorganisms has increased, and the level of ammonium has decreased. On the production of volatile fatty acids in bacteria the stimulatory action has revealed sulphur and zinc, whereas in protozoa none of investigated elements has shown appreciable action. The addition to the incubation medium of iron, nickel and cobalt has had no apparent influence on growth and vital activity of microorganisms. It has been also shown, that rumen bacteria in conditions *in vitro* produce great amounts of methane. This process has been markedly suppressed by sulfate anions and activated by nickel.

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

1. *Holovska K., Lenartova V., Holovska K. et al.* Are ruminal bacteria protected against environmental stress by plant antioxidants // *Lett. Applied Microbiol.* – 2002. – V. 35. – P. 301–305.
2. *Снітинський В. В., Сологуб Л. І., Антоняк Г. Л.* Селен в організмі жуйних тварин: біохімічні та імунологічні аспекти // *Агробіол. еколог.* – 2004. – Т. 1, № 1–2. – С. 5–27.
3. *Flohe L., Andreesen J. R., Brigelius-Flohe R., et al.* Selenium, the element of the moon, in life on Earth // *IUBMB Life.* – 2000. – V. 49. – P. 411–420.
4. *Brioukhanov A., Netrusov A., Sordel M. et al.* Protection of *Methanosarcina barkeri* against oxidative stress: identification and characterization of an iron superoxide dismutase // *Arch. Microbiol.* – 2000. – V. 174, N3. – P. 213–216.
5. *Курилов Н. В., Радченкова Т. А.* Определение азотистых веществ в содержимом рубца // В кн. "Новые методы и модификации биохимических исследований в животноводстве". М.: Колос. – 1970. – С. 60–65.
6. *Кроткова А. П., Митин Н. И.* Определение летучих жирных кислот в содержимом рубца жвачных // *Вестник с.-х. науки.* – 1957. – № 10. – С. 13–17.
7. *Ратич І. Б.* Біологічна роль сірки і метаболізм сульфату в птиці. Львів – 1992. – 170 с.
8. *Сологуб Л. І., Герасимів М. Г.* Роль хрому в життєдіяльності тварин // *Біологія тварин.* – 1999. – Т. 01, № 2. – С. 12–17.
9. *Coleman J. E.* Zinc proteins; enzymes, storage proteins, transcription factors and replication proteins // *Annu. Rev. Biochem.* – 1992. – 61. – P. 897–946.
10. *DiMarco A. A., Bobik T. A., Wolfe R. S.* Unusual coenzymes of methanogenesis // *Annu. Rev. Biochem.* – 1990. – V. 59. – P. 355–394.
11. *Tokuda M., Ushida K., Miyazaki K., Kojima Y.* Methanogens associated with rumen ciliates // *FEMS Microbiol. Ecol.* – 1997. – V. 22, N2. – P. 137–143.
12. *Finlay B. J., Esteban G., Clarke K. J. et al.* Some rumen ciliate have endosymbiotic methanogens // *FEMS Microbiol. Lett.* – 1994. – V. 117, № 2. – P. 157–162.