

## ВПЛИВ ПРОБІОТИКІВ НА ЖИТТЄДІЯЛЬНІСТЬ МІКРООРГАНІЗМІВ РУБЦЯ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ IN VITRO

*А. В. Волторністий<sup>1</sup>, М. Г. Герасимів<sup>1</sup>, Ю. Т. Салига<sup>1</sup>, В. М. Волторністий<sup>1</sup>,  
Л. І. Сологуб<sup>1</sup>, С. В. Дерев'янка<sup>2</sup>, Л. В. Божок<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Інститут біології тварин УААН, м. Львів

<sup>2</sup>Інститут сільськогосподарської мікробіології УААН, м. Чернігів

*У статті представлені результати досліджень впливу добавок пробіотичних штамів *Bacillus subtilis* на життєдіяльність мікроорганізмів рубця великої рогатої худоби in vitro. Показано, що застосовані чинники збільшують вміст мікробного білка і гідролітичну активність у середовищі. Разом з цим зростає продукція летких жирних кислот і стимулюється використання аміаку.*

Процеси травлення кормів у рубці телят на ранніх стадіях постнатального розвитку, характеризуються рядом особливостей. У цей період у них проходить морфофункціональний розвиток рубця і заселення його симбіотичною мікрофлорою та мікрофауною. Прерумінантний тип травлення змінюється на румінантний, при якому поживні речовини корму розщеплюються мікроорганізмами рубця [1]. З розвитком тварини відбувається перерозподіл співвідношення різних груп бактерій — молочнокислих, целюлозолітичних, протеолітичних, амілолітичних. Інтенсифікується розщеплення клітковини, крохмалу, білків і продукція летких жирних кислот. Завдяки посиленню ферментативних процесів у рубці телят зростає здатність до продукції і зв'язування аміаку [2].

У практиці вирощування здорового молодняка великої рогатої худоби застосовують різні добавки до раціонів, які позитивно впливають на ріст і розвиток телят. До таких добавок належать пробіотики — культури живих мікроорганізмів — бактерій та грибів, які можуть конкурувати з патогенними мікробами (*Lactobacillus*), які спричиняють діарею, або стимулювати ріст автохтонних мікроорганізмів своїми факторами росту (*Saccharomyces cerevisiae*) [3]. В Інституті сільськогосподарської мікробіології УААН протягом багатьох років досліджується вплив різних штамів бактерії *Bacillus subtilis* як пробіотика на ріст та розвиток телят на початкових етапах постнатального розвитку. У той же час зовсім не має відомостей відносно ролі цієї бактерії в метаболізмі мікроорганізмів рубця телят, про вплив на екологію вмісту передшлунків при додаванні її до раціону. У статті представлені результати досліджень впливу добавок бактерій *B. Subtilis* штамів БСП-44 і В-3 на ріст мікроорганізмів і їх життєдіяльність у вмістимому рубці телят впродовж інкубації in vitro.

**Матеріали і методи.** Дослідження виконувалися у дослідному господарстві Інституту біології тварин УААН «Чишки» на трьох бугайцях-аналогах чорно-рябої породи з фістулами на рубці у 2-місячному віці. Годівля тварин проводилась згідно існуючих норм. У раціон піддослідних телят входили молоко, сіно лукове, комбікорм, соковиті. Поживна вартість раціону за вмістом протеїну, енергії, мінеральних елементів та вітамінів відповідала віковим потребам телят. Утримання тварин стійлове.

Одержані зразки вмістимого рубця проціджували через 4 шари марлі, розділяли на окремі фракції (бактерії, інфузорії) шляхом диференційного центрифугування [4] та інкубували окремо в буферному середовищі (100 мл) в анаеробних умовах протягом 24-х годин при температурі 38 °С без і з додачею штамів бактерії виду *Bacillus subtilis* (штами БСП-44 і В-3) у кінцевій концентрації 10<sup>6</sup> клітин на мл. В інкубованих зразках визначали масу мікроорганізмів ваговим методом, вміст білків [5], аміаку [6], летких жирних кислот [7], целюлолітичну, амілолітичну і протеолітичну активність [8].

**Результати та обговорення.** Як видно із таблиці й рисунка, рН середовища у контрольних зразках на початку інкубації становила 6,9, а через 24 години інкубації вірогідно знижувалась до 6,4 ( $P < 0,05$ ). Очевидно, це зв'язано з підвищенням рівня карбонових кислот у середовищі, перш за все рівня летких жирних кислот, вміст яких за період інкубації збільшився в 2 рази. При цьому кількість ацетату і пропіонату збільшилася приблизно в 2 рази, тоді як рівень масляної — майже у 4 рази. Що стосується молочної кислоти, то у її концентрації значних змін не відмічено.

Звертає на себе увагу значна зміна у співвідношенні маси мікрофлори і мікрофауни впродовж інкубації. Якщо в неінкубованій рідині рубця телят їх кількість приблизно однакова, то через 24 години різко знижувалася маса інфузорій (на 44 %), тоді як маса бактерій, навпаки, зростала (на 56 %). Це може свідчити про особливості життєздатності цих двох таксономічних груп і чутливості їх до факторів середовища. Очевидно, інфузорії є більш чутливі до його змін. Можливо, ріст і розвиток останніх знижується у більшій мірі, ніж ріст бактерій при збільшенні кислотності середовища. Паралельно збільшувався вміст загального білка (на 27 %) і білка бактерій (на 60 %), тоді як вміст білка інфузорій зменшувався (на 39 %). Концентрація аміаку в середовищі за час інкубації зросла у 3 рази. Мабуть, це зумовлено меншою здатністю мікроорганізмів рубця телят у 2-місячного віці його утилізувати шляхом амінування карбонових кислот до амінокислот. Про зниження функціональної активності мікроорганізмів впродовж інкубації свідчить також зниження целюлозолітичної, протеолітичної і амілолітичної активності відповідно на 27, 22 і 28 % мікроорганізмів. Добавка пробіотичних мікроорганізмів *B. subtilis* при інкубації проявляла виражений вплив на рівень деяких досліджуваних показників.

Таблиця 1

**Вплив пробіотичних штамів на життєдіяльність мікроорганізмів рубця *in vitro* ( $M \pm m, n=3$ )**

| Показники                                 | До інкубації | Через 24 години інкубації |                                   |                                |
|---|--------------|---------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|
|   |              | Контроль                  | <i>Bacillus subtilis</i> (БСП-44) | <i>Bacillus subtilis</i> (B-3) |
| рН  | 6,9±0,2      | 6,4±0,1 *                 | 6,5 ± 0,2                         | 6,4±0,1                        |
| ЛЖК, ммоль/л                              | 70,0±7,0     | 140,0±9,1*                | 172,3 ± 6,1 <sup>+</sup>          | 168,0±5,2 <sup>+</sup>         |
| Ацетат, ммоль/л                           | 55,0±6,0     | 99,0±8,0*                 | 102 ± 12,2                        | 99,9±8,0                       |
| Пропіонат, ммоль/л                        | 8,0±1,0      | 15,0±2,0*                 | 22,6 ± 1,7 <sup>+</sup>           | 21,0±1,0 <sup>+</sup>          |
| Бутират, ммоль/л                          | 4,0±1,0      | 15,0±2,0*                 | 10,6 ± 1,4                        | 8,0±1,2 <sup>+</sup>           |
| Лактат, ммоль/л                           | 5,3±0,4      | 6,6±0,6                   | 6,6 ± 0,5                         | 6,6±0,6                        |
| Маса бактерій, мг/100 мл                  | 73,0±9,0     | 114,0±13,0*               | 162,8 ± 10,4 <sup>+</sup>         | 154,0±11,0                     |
| Маса інфузорій, мг/100 мл                 | 89,0±7,0     | 50,0±6,0*                 | 65,6 ± 4,8                        | 60,0±4,0                       |
| Загальний білок, мг/100 мл                | 108,0±7,0    | 135,0±10,0*               | 165,3 ± 9,1                       | 158,0±10,0                     |
| Білок бактерій, мг/100 мл                 | 15,0±2,0     | 24,0±1,5*                 | 31,8 ± 1,4 <sup>+</sup>           | 29,9±1,3 <sup>+</sup>          |
| Білок інфузорій, мг/100 мл                | 18,0±3,0     | 11,0±0,6*                 | 14,1 ± 0,6 <sup>+</sup>           | 15,0±0,5 <sup>+</sup>          |
| Аміак, ммоль/л                            | 6,0±1,0      | 18,0±1,0*                 | 8,2 ± 1,6 <sup>+</sup>            | 10,0±1,0 <sup>+</sup>          |
| Протеолітична активність, нМ/100 мг білка | 4,8±0,3      | 3,5±0,3*                  | 4,4 ± 0,2 <sup>+</sup>            | 4,5±0,2 <sup>+</sup>           |
| Целюлозолітична активність, %             | 63,0 ± 4,0   | 49,0±3,0*                 | 75,3 ± 2,3 <sup>+</sup>           | 82,8±3,0 <sup>+</sup>          |
| Амілолітична активність, нМ/100 мг білка  | 25,0± 2,0    | 18,0±2,0*                 | 29,3 ± 2,2 <sup>+</sup>           | 32,0±2,1 <sup>+</sup>          |

*Примітка:* \* — різниця в контрольних зразках до і після інкубації вірогідна ( $P < 0,05$ );  
+ — різниця у величині показників у контролі і досліді після інкубації вірогідна ( $P < 0,05$ ).

Як видно із таблиці і рисунка, внесення в інкубаційне середовище як першого, так і другого штамів сінної палички істотно збільшує утворення летких жирних кислот у порівнянні з інкубованими контрольними зразками (на 45 % і 40 %) в основному, за рахунок збільшення частки пропіонової кислоти, тоді як частка оцтової залишалась приблизно такою, як у контрольних зразках, а частка масляної кислоти зменшувалась. На рівень молочної кислоти з інкубованих зразках добавка про-біотичних мікроорганізмів не проявляла помітного впливу.

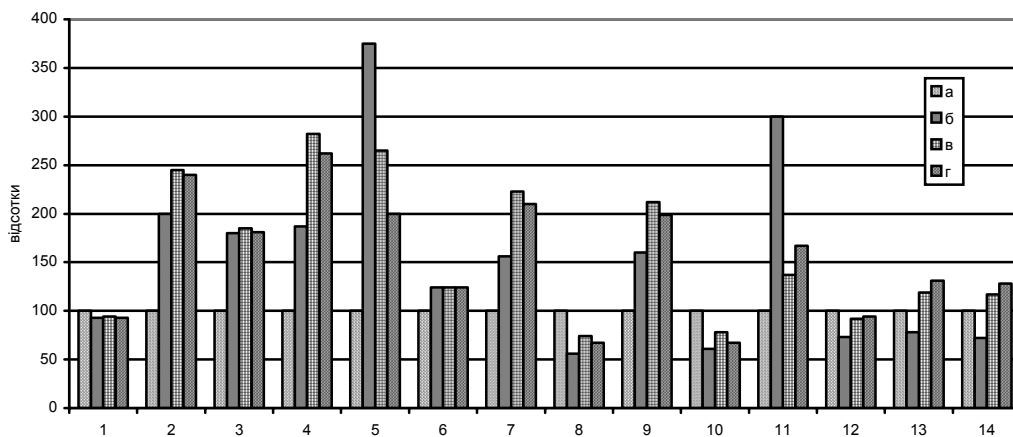


Рис. 1. Відносні зміни в досліджуваних показниках вмістимого рубця телят під час інкубації без і з доданими пробіотиками: а — контроль до інкубації (100 %), б — контроль після інкубації, в — зразки інкубовані з *B. subtilis* (штам BSP-44), г — зразки, інкубовані з *B. subtilis* (штам В-3). 1— рН, 2 — леткі жирні кислоти, 3- ацетат, 4 — пропіонат, 5 — бутират, 6 — лактат, 7 — маса бактерій, 8 — маса інфузорій, 9 — білок бактерій, 10 — білок інфузорій, 11 — аміак, 12 — протеолітична активність, 13 — целюлозолітична активність, 14 — амілолітична активність.

При внесенні в інкубаційне середовище бактерій *B. subtilis* штаму BSP-44 вірогідно зростала маса бактерій в порівнянні з інкубованими контрольними зразками, тоді як після добавки бактерій штаму В-3 — відмічена лиш тенденція до її зростання. На зміну в масі інфузорій при інкубації, вказані пробіотики не проявляли помітного впливу. Разом з цим цікавим є значно нижчий рівень аміаку в зразках інкубованих з доданими штамми пробіотичних мікроорганізмів у порівнянні з контрольними зразками, що може свідчити або про інгібування його звільнення з азотових сполук, або про підвищення його використання у синтетичних процесах. Слід відзначити також посилення в інкубаційному середовищі, до якого додавали бактерії *B. subtilis*, гідролітичних процесів, зокрема розщеплення целюлози, крохмалю і білків у дослідних зразках. Це, можливо, пов'язане з більшою масою бактерій у останніх або з нижчим рівнем аміаку, який, очевидно, токсично впливає на мікроорганізми.

## ВИСНОВКИ

1. У дослідженнях *in vitro* встановлено наявність у вмісті рубця телят раннього віку приблизно однакової кількості за масою фракцій бактерій та інфузорій.

2. Впродовж 24-х годин інкубації в середовищі вмістимого рубця з додаванням джерела азоту сечовини і джерела енергії глюкози маса бактерій зростає майже у 2 рази, тоді як маса інфузорій зменшилась на 44 %. Продукція летких жирних кислот збільшилась в 2 рази, а кількість аміаку при цьому зростає майже у 3 рази, що вказує на низький рівень використання останнього.

3. Внесення до інкубаційного середовища штамів мікроорганізмів *Bacillus subtilis* (BSP-44 і В-3) посилює використання аміаку мікроорганізмами рубця і одночасно збільшує продукцію ними летких жирних кислот (у 2,4 рази). Кількість загального білка зростає відповідно на 53 % і на 46 % відповідно), маси бактерій — у 2,2 і в 1,8 разів..

## THE INFLUENCE OF PROBIOTICS ON VITAL ACTIVITY OF CATTLE RUMEN MICROORGANISMS IN EXPERIMENTS IN VITRO

*A. V. Voltornisty, M. G. Herasymiv, Ju. T. Salyha, V. M. Voltornisty, L. I. Solohub, S. V. Derevianko, L. V. Boshok*

## SUMMARY

The data about the influence of two strains of *Bacillus subtilis* on vital activity of calf rumen microorganisms are presented in this article. It was shown, that these probiotics increased the

microbial protein content and hydrolytic activity in the surrounding. At the same time the volatile fatty acids production augmented and the ammonium utilization was stimulated.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Янович В. Г., Сологуб Л. І. Основи трансформації поживних речовин в організмі жуйних тварин. — Львів: Вид. «Тріада плюс», 2000. — 384 с.
2. Mackie R. I., White B. A. Recent advances in rumen microbial ecology and metabolism: potential impact on nutrient output // *J. Dairy Sci.* — 1990. — Vol. 73, N 10. — P. 2971–2995.
3. Microbial status and rumen profile of crossbred calves fed on different microbial feed additives / Agarwal N., Kamra D. N., Chaudhary L. C. et al. // *Lett. Applied Microbiology.* — 2002. — Vol. 34. — P. 329–336.
4. Алиев А. А., Кафаров М. Ш. Метод фракционирования содержимого преджелудков на составные части // *Бюлл. ВНИИФБиП с.х. животных.* — 1971. — № 5. — С. 69–72.
5. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. I., Randall R. J. Protein measurement with the Folin reagent // *J. Biol. Chem.* — 1951. — Vol. 193, № 1. — P. 265–273.
6. 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.
7. Кроткова А. П., Митин Н. И. Определение летучих жирных кислот у содержимом рубца у жвачных // *Вестник с.х. науки.* — 1957. — № 10. — С. 13–17.
8. Фізіолого-біохімічні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині. Довідник. // Колектив авторів (відп. редактор Влізло В. В.). Ін-т біології тварин УААН. — Львів, 2004. — 399 с.