

ВПЛИВ ДЖЕРЕЛА АЗОТУ НА РІСТ І ЖИТТЄДІЯЛЬНІСТЬ МІКРООРГАНІЗМІВ РУБЦЯ ТЕЛЯТ

О. М. Стефанишин, І. В. Лучка, Л. І. Сологуб

Інститут біології тварин УААН

У статті наведені результати досліджень in vitro впливу сечовини, сульфату амонію та нітрату і нітриту на ріст мікроорганізмів рубця телят та інтенсивність метаноутворення у клітинах мікроорганізмів. Показано особливості дії цих ксенобіотиків на протеолітичну, целюлозолітичну та амілолітичну активності вмісту рубця бичків, а також на утворення летких жирних кислот. Під впливом нітрату, і особливо нітриту, у рубці бичків за умов in vitro зменшується утворення летких жирних кислот, знижується мікробна маса і інтенсивність утворення метану мікроорганізмами. Протеолітична та амілолітична активності вмісту рубця вірогідно знижуються при дії нітратів і нітритів, а целюлозолітична активність мікроорганізмів рубця бичків не зазнає значних змін при додаванні до інкубаційного середовища даних азотових сполук.

Мікроорганізми рубця жуйних тварин здатні синтезувати в основному всі необхідні для їх життєдіяльності і росту популяції компоненти за умов забезпечення їх енергетичними сполуками, мінеральними елементами і джерелами азоту [1, 2]. Із останніх, у найбільшій мірі використовується аміак, який звільнюється в процесах дезамінування амінокислот та інших аміносполук рослинних кормів, приймає участь в переамінуванні, а шляхом амінування карбонових кислот включається в синтез нових амінокислот [3]. Важливим джерелом азоту є сечовина, яку часто застосовують в годівлі жуйних тварин, але в результаті швидкого розщеплення її молекули зі звільненням двох аміногруп в рубці, використання її може часом давати небажані наслідки. Інше джерело азоту таке як нітрати і нітрити застосовуються широко в агрономічних заходах як мінеральні добрива і надходять з рослинними кормами в організм тварин. При всмоктуванні в кров ці токсичні сполуки у моногастричних тварин можуть зв'язуватися з гемоглобіном еритроцитів, переводячи його у функціонально неактивну форму метгемоглобін [4]. Проте, у жуйних тварин існує група нітратредукуючих бактерій, яка володіє ферментами, що відновлюють ці токсичні сполуки до молекулярного азоту і аміаку [5], який може включатися в метаболізм і використовуватися в синтезі азотових сполук. Тому важливо з'ясувати роль окремих джерел азоту у забезпеченні росту популяції мікроорганізмів азотом та участі окремих із них у метаболічних процесах їх клітин. У статті розглядаються результати досліджень впливу аміаку, сечовини, сульфату амонію та нітрату і нітриту на активність гідролітичних ферментів і продукцію метану в рубці бичків.

Матеріали і методи. Дослідження проводилися у дослідному господарстві Інституту біології тварин УААН «Чишки» на трьох бичках-аналогах чорно-рябої української породи 12-місячного віку. Зразки вмістимого рубця для досліджень одержували через 2 год після ранкової годівлі, фільтрували і переносили в анаеробних умовах у буферну суміш. Інкубаційне середовище містило наступні інгредієнти (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 і інкубували протягом 24 год за температури 38 °С. Після закінчення інкубації відбирали зразки рідини і газу для досліджень. У зразках

рідини протеолітичну активність [7], амілолітичну активність [8], целюлозолітичну активність [9] та вміст білків визначали за методом Лоурі і ін. [10]. У газовій фазі визначали кількість метану на газовому хроматографі SR18610B GAS (США).

Результати та обговорення. Як бачимо із результатів дослідження, що представлені у таблиці 1 і рисунку 1, досліджувані азотові сполуки при додаванні їх до інкубаційного середовища проявляють неоднаковий вплив на гідролітичні процеси і активність ферментів та утворення метану мікроорганізмами рубця жуйних тварин.

Таблиця 1.

Вплив азотових сполук на досліджувані показники у мікроорганізмів рубця телят при додаванні їх до інкубаційного середовища (M±m, n=3)

Показники	Сечовина	Сульфат амонію	Нітрат	Нітрит
Метан, мкмоль	372±23	360±19	279±15**	259±19**
ЛЖК, ммоль/л	141±13	150±11	94±7*	79±6**
Мікробна маса, мг/100 мл	165±5	159±7	145±5*	135±4*
Протеолітична активність, нМ/100мг білка	6,5±0,3	5,1±0,3***	4,2±0,2***	4,0±0,2**
Амілолітична активність, нМ/100мг білка	28,6±0,6	26,9±0,2** *	25,1±0,3***	22,2±0,4***
Целюлозолітична активність, %	49±2	59±6	53±2	45±3

Примітка: * — ступінь вірогідності різниці між даним показником і показником у зразках із додаванням сечовини (* — p < 0,05, ** — p < 0,02, *** — p < 0,01).

Встановлено, що інтенсивність утворення метану під впливом нітрату, і в ще більшій мірі нітриту, вірогідно знижується у порівнянні з даними отриманими при додаванні сечовини чи амоній сульфату. Що стосується кількості мікробної маси, то вона також є вірогідно меншою при інкубації зразків із нітратом чи нітритом, ніж при інкубації з сечовиною, проте у процентному відношенні ці зміни є меншими, ніж зниження продукції метану. Можливо, в даному випадку відбувається відновлення нітрату нітрат- і нітритредукуючими бактеріями до аміаку з конкурентним використанням водню, необхідного для утворення метану. Відомо, що афінність цих бактерій до водню є значно більшою, ніж у метаногених бактерій [11]. Значне зниження під впливом нітратів і нітритів відзначено і в утворенні летких жирних кислот, навіть у більшій мірі, ніж зменшення мікробної маси, у порівнянні із зразками, інкубованими з сечовиною чи амонієм. Очевидно, що їх додавання проявляє якісь додаткові інгібуючі ефекти на реакції утворення цих карбонових сполук.

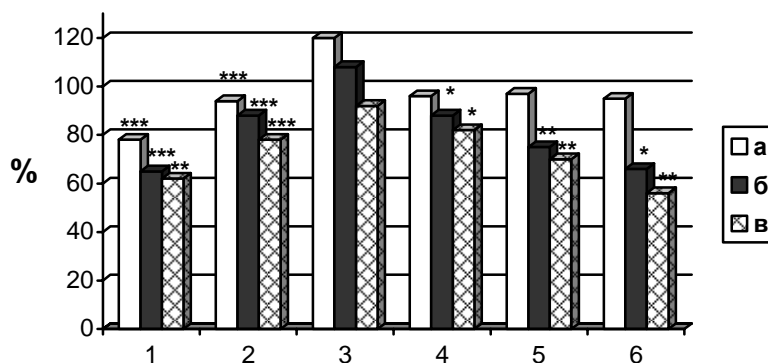


Рис.1. Зміни активності гідролітичних ферментів та кількості мікробної маси, утвореного метану і летких жирних кислот в інкубаційному середовищі при додаванні амоній сульфату (а), нітрату (б) і нітриту (в) (відносно сечовини — 100%). 1 — протеолітичних, 2 — амілолітичних, 3 — целюлозолітичних, 4 — мікробна маса, 5 — метан, 6 — леткі жирні кислоти

Звертають на себе увагу одержані результати відносно впливу застосовуваних азотових сполук на активність гідролітичних ферментів мікроорганізмів рубця. Відомо, що в різних видів бактерій та інфузорій рубця активність протеаз, амілаз і целюлоз виражена не в однаковій мірі. Нами встановлено відсутність змін у активності целюлозолітичних мікроорганізмів під впливом нітратів і нітритів. Очевидно, при відновленні цих окислювачів використовується водень, який є потужним інгібітором целюлозолітичних бактерій [11], тобто інтенсифікується їх діяльність.

Потрібно зазначити, що під впливом як нітратних так і нітритних сполук знижується мікробна маса (на 12 і 18 % відповідно), тобто в розрахунку фактично на однакову кількість клітин мікроорганізмів у цих зразках і зразках із сечовиною целюлозолітична активність є ще вищою. На користь зв'язування водню, як інгібітора целюлозолітичних мікроорганізмів, свідчить також зростання активності целюлоз під впливом амоній сульфату у порівнянні з сечовиною. Відомо, що сульфатредукуючі бактерії для відновлення сірчаноокислого аніону сульфатредуктазою також використовують водень, а спорідненість до нього у них є більша, ніж у нітратредукуючих чи метаногених бактерій [12]. Що стосується протеолітичної та амілолітичної активностей мікроорганізмів рубця, то при дії нітратів чи нітритів ми спостерігали їх вірогідне зниження, паралельно до зниження мікробної маси.

ВИСНОВКИ

Під впливом нітрату, і особливо нітриту, у вмістимому рубця бичків за умов *in vitro* зменшується утворення летких жирних кислот, знижується мікробна маса і інтенсивність утворення метану метаногеними бактеріями. Протеолітична та амілолітична активності вірогідно знижуються при дії нітратів і нітритів, а целюлозолітична активність мікроорганізмів рубця бичків не зазнає значних змін.

ВЛИЯНИЕ ИСТОЧНИКОВ АЗОТА НА РОСТ И ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ РУБЦА БЫЧКОВ

О. М. Стефаньшин, И. В. Лучка, Л. И. Сологуб

АННОТАЦИЯ

В статье приведены результаты исследований *in vitro* влияния мочевины, сульфата аммония, нитрата и нитрита на рост микроорганизмов рубца телят и интенсивность метанообразования в клетках микроорганизмов. Показано особенности действия этих ксенобиотиков на протеолитическую, целюлолитическую и амилолитическую активности содержимого рубца бычков, а также на образование летучих жирных кислот. Под влиянием нитрата, и особенно нитрита, в рубце бычков при условиях *in vitro* уменьшается образование летучих жирных кислот, снижается микробная масса и интенсивность образования метана микроорганизмами. Протеолизическая и амилолитическая активности содержимого рубца достоверно снижаются при действии нитратов и нитритов, тогда как целюлолитическая активность микроорганизмов рубца бычков значительно не изменяется при добавлении к инкубационной среде данных азотистых соединений.

NITROGEN SOURCE INFLUENCE UPON THE GROWTH AND VITAL FUNCTIONS OF CALVES' RUMEN MICROORGANISMS

O. M. Stefanyshyn, I. V. Luchka, L. I. Solohub

SUMMARY

Researches results *in vitro* of urea, ammonia sulphate, nitrate, nitrite influence upon calves' rumen microorganism growth and methanogenesis intensity in microorganism cells are presented in this article. The characteristic features of these xenobiotics influence upon proteolytic, cellulolytic and

starch-splitting activity of bull-calves rumen content activity and also upon volatile-fatty acids are shown. Under nitrate and especially nitrite the production of volatile-fatty acids, the microbial mass and methanogenesis decreases in the bull-calves rumen in conditions in vitro. Proteolytic and amilolytic activity of rumen content probably decreases at nitrates and nitrites action, cellulolytic activity of bull-calves rumen microorganisms doesn't change significantly at addition of nitrogen compositions to the incubation environment.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Laven R. A.* The effect of pasture nitrate concentration and concentrate intake after turnout on embryo growth and viability in the lactating dairy cow / R. A. Laven, H. J. Biggadike, R. D Allison. // *Reprod. Domest. Animals.* — 2002.— Vol. 37.—P. 111–119.
2. *Miyazaki A.* Effects of dietary nitrate on the performance of ruminants / A. Miyazaki // *Jap. J. Zootechn. Sci.* — 1977. — Vol. 48. — P. 53–61.
3. *Iwamoto M.* Ability of *Selenomonas ruminantium*, *Veillonella parvula*, and *Wolinella succinogenes* to reduce nitrate and nitrite with special reference to the suppression of ruminal methanogenesis / M. Iwamoto, N. Asanuma, T. Hino // *Anaerobe.* — 2002. — Vol. 8. — P. 209–215.
4. *Asanuma N.* Molecular characterization and transcriptional regulation of nitrate reductase in a ruminal bacterium, *Selenomonas ruminantium* / N. Asanuma, M. Iwamoto, T. Yoshii, T Hino. // *J. Gen. Appl. Microbiol.* — 2004. — Vol. 50. — P. 55–63.
5. *Тараканов Б. В.* Микрофлора рубца коров при разных уровнях нитратного азота в рационе / Б. В. Тараканов, Н. Н. Гушин, Т. А. Николичева и др. // *Бюлл. Всес. н.-и. Ин-та физиол., биохим. и питания с.-х. животных.* — 1987. — В. 3. — С. 24–28.
6. *Lopez S.* Influence of sodium fumarate addition on rumen fermentation in vitro / S. Lopez, C. Valdes, C. J. Newbold, R. J. Wallace // *Brit. J. Nutr.* — 1999. — Vol. 81, № 1. — P. 59–64.
7. *Kunitz M.* Crystalline soybean trypsin inhibitor / M. Kunitz // *J. Gen. Physiol.* — 1947. — Vol. 30. — P. 291–310.
8. *Лабораторные методы исследования в клинике / под ред. В. В. Меньшикова.* — М.: Медицина, 1987, — С. 191–192.
9. *Паенок С. М.* До методики визначення целюлолітичної активності ферментних препаратів та вмісту передшлунків жуйних тварин / С. М. Паенок // *Фізіол. біохім. с-г тварин.* — 1970. — Вип. 15. — С. 61–62.
10. *Lowry O. H.* Protein measurement with the Folin reagent / O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall // *J. Biol. Chem.* — 1951. — Vol. 193, — N. 1. — P. 265–273.
11. *Yoshii T.* Number of nitrate- and nitrite reducing *Selenomonas ruminantium* in the rumen, and possible factors affecting its growth / T. Yoshii, N. Asanuma, T. Hino // *Animal Sci. J.* — 2003. — Vol. 74. — P. 483–491.
12. *Ushida K.* Sulphate reduction and methanogenesis in the ovine rumen and porcine caecum: a comparison of two microbial ecosystems / K. Ushida, Y. Ohashi, M. Tokura et al. // *DTW Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* — 1995. — Vol. 102, — N 4. P. 154–156.