

ВПЛИВ ОКРЕМИХ МІНЕРАЛЬНИХ ЕЛЕМЕНТІВ НА РІСТ МІКРООРГАНІЗМІВ РУБЦЯ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ ТА УТВОРЕННЯ МЕТАНУ IN VITRO

І. В. Лучка, Г. О. Богданов, Ю. Т. Салига, М. Г. Герасимів

Інститут біології тварин УААН

У статті представлено результати досліджень in vitro впливу деяких мікроелементів на ріст мікроорганізмів рубця та утворення метану. Показано, що при додаванні до середовища інкубації сульфату натрію та сполук хрому інтенсифікується ріст мікроорганізмів рубця і знижується метаноутворення. Тоді як внесення у середовище інкубації сполук марганцю та цинку збільшує кількість мікробної маси, а додавання нікелю, кобальту і молібдену інтенсифікує метаногенез. Внесення до середовища інкубації суміші мікроелементів посилює ріст мікроорганізмів та утворення ними метану тоді як додавання суміші мікроелементів і сульфату стимулює ріст популяції мікроорганізмів і знижує продукцію метану.

До симбіотичної мікрофлори рубця жуйних тварин належить група архебактерій, які здатні на кінцевих етапах метаболізму продукувати метан [2, 6, 9, 13]. Основними субстратами при утворенні метану є вуглекислота і водень, тому метаногени є основними H_2 -утилізуючими бактеріями рубця всіх жуйних тварин [16]. З одного боку, цей процес сприяє розвитку рубцевих симбіонтів, оскільки при цьому зв'язується водень, який є сильним інгібітором целюлолітичних бактерій [13, 16], а з іншого, на утворення метану затрачається енергія кормів, що споживають тварини, отже знижується ефективність годівлі тварин і зростає вартість продукції [4, 12]. Крім цього, метан, який виділяють жуйні тварини в довкілля, як парниковий газ, посилює процес глобального потепління [7, 8, 16]. Тому пошук зниження емісії метану жуйними тваринами є доцільним як з економічної так із екологічної, точки зору.

Особливо актуальними будуть дослідження можливості скерованого впливу на утворення метану метаногеними бактеріями в рубці жуйних тварин. Одним із шляхів регуляції метаногенезу може бути використання мінеральних елементів. Адже відомо, що ріст і життєдіяльність мікроорганізмів рубця жуйних тварин, і у тому числі метаногених бактерій, значною мірою, залежить від забезпечення їх клітин мінеральними елементами. У процесі утворення метану беруть участь також деякі мікроелементи, які включені як кофактори у специфічні реакції відновлення CO_2 і їх участь у цьому процесі є необхідною. Наприклад, відомо, що нікель входить у молекулу специфічного кофактора F_{430} , а також у молекули гідрогеназ, які каталізують транспортування водню на CO_2 [3]. На кінцевій стадії утворення метану у реакцію, каталізовану метилредуктазою, включений кобальт у вигляді кобаміду [5]. З іншого боку, деякі мікроелементи, навпаки, можуть стимулювати ріст інших конкурентних груп бактерій і тим самим інгібувати синтез метану.

Метою наших досліджень було з'ясувати роль деяких мікроелементів у процесах метаноутворення і їх вплив на життєдіяльність мікроорганізмів рубця великої рогатої худоби у дослідах in vitro.

Матеріали і методи. Дослідження проводились у дослідному господарстві «Чишки» Інституту біології тварин УААН на 3-ох головах телят 6-місячного віку української чорно-рябої молочної худоби, яким було накладено фістули на рубець. Матеріалом для досліджень був вміст рубця, який відбирали через 2 години після ранкової годівлі, фільтрували через 2 шари марлі і переносили в анаеробних умовах в буферну суміш (200 мл/л), яка містила (мг/л): K_2HPO_4 — 5,0; KH_2PO_4 — 4,0; $NaCl$ — 0,52; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,070; $CaCl_2$ — 0,035; $NaHCO_3$ — 5,9; цистеїн хлориду — 0,174 [11]. Після змішування, 50 мл цієї суміші вносили в 120 мл пляшки і додавали Na_2SO_4 (по 100 мМ), $CrCl_3$, Na_2CrO_4 , Na_2SeO_3 , $ZnCl_2$, $NiCl_2$, $CoCl_2$, Na_2MoO_4 , $MnCl_2$, $CuSO_4$, $FeSO_4$ (у кінцевій концентрації 10 мМ), та суміш

досліджуваних мікроелементів без сульфату натрію і при його додаванні, як джерело азоту додавали сечовину (30 мМ), а енергії — глюкозу (30 мМ), продували CO₂ інкубували протягом 24 годин при 38 °С. Після інкубації відбирали зразки рідини і газів для аналізів. У рідині визначали вміст бактеріальної маси ваговим методом після центрифугування визначеного об'єму інкубаційної суміші [14], в зразках газової фази визначали CH₄ і H₂ на газовому хроматографі Gas Chromatograph SRI 8610/9300 [9].

Результати та обговорення. З отриманих результатів видно (рис 1), що додавання до середовища інкубації окремих катіонів і аніонів проявляє неоднаковий вплив на ріст популяції мікроорганізмів. Бачимо, що під впливом сульфату натрію рівень мікробної маси зріс на 33 % в порівнянні з ростом мікроорганізмів за цей період у контрольних зразках. Паралельно в інкубаційних зразках, під впливом доданого аніону, спостерігається зниження продукції метану (рис. 2) на 31 %. Відомо, що серед рубцевих мікроорганізмів існує група сульфатредукуючих бактерій, які здатні редукувати неорганічний сульфат і тим самим створювати конкуренцію метаногенним бактеріям за молекулярний водень. Тому можна припустити, що сумісний вплив сульфату як аніону та катіону Na⁺ стимулює ріст сульфатредукуючих бактерій. Що стосується впливу інших форм сульфату, то можна відзначити збільшення на 27 % мікробної маси при додаванні сульфату цинку, а змін в утворенні метану відзначенно не було.

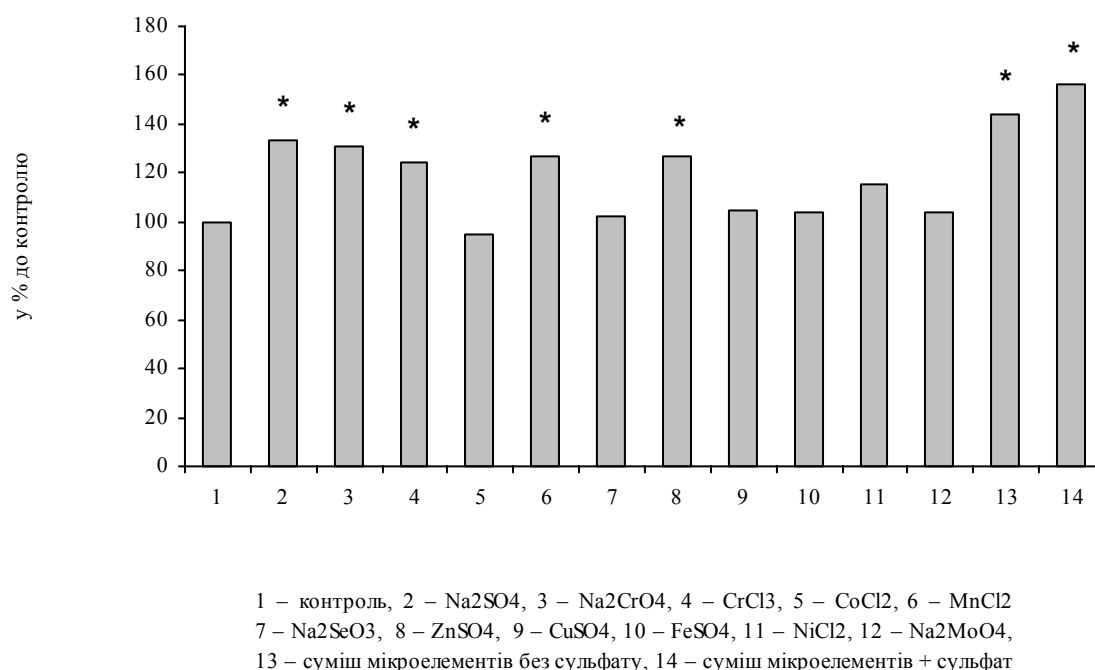


Рис. 1. Вплив окремих мінеральних елементів на ріст мікробної маси рубця телят за умов in vitro.

При доданні до середовища сполук хрому, зокрема 3-ох і 6-ти валентного, також спостерігається інтенсифікація росту мікробної маси в порівнянні з контрольними інкубатами на 24 і 31 % відповідно (рис. 1). Відомо, що в клітинах мікроорганізмів є високоактивні редуктази, які швидко відновлюють окисненні форми хрому. Що стосується механізмів дії хрому на проліферацію мікробних клітин, то згідно існуючих уявлень цей елемент може активувати і реплікацію геному і транскрипцію генів в клітинах. У той же час під його впливом в інкубованих зразках знижується метаногенез (на 22 і 20 %). Можливо, хромом активуються інші акцептори водню і тим самим зменшується забезпечення метанопродукції відновними еквівалентами. Водночас, час ми спостерігали інтенсифікацію метаноутворення при додаванні до середовища сполук кобальту і нікелю на — 21 і 29 % відповідно. Перший із них стимулює кінцеву реакцію синтезу молекули метану, а другий входить у молекулу специфічного кофактора у синтезі цього газу — F₄₃₀. Правдоподібно, вони активують також ріст популяції метаногенів, але у зв'язку з тим, що кількість цієї групи бактерій є порівняно невелика, (не більше 5 % від маси всіх бактерій рубця [13]), то їх ріст вирішального

впливу на загальну масу популяції мікроорганізмів не має. Збільшення утворення метану виявлено також під впливом молібдену (на 20 %), хоч безпосередня участь цього елемента в реакціях утворення цього газу не відома.

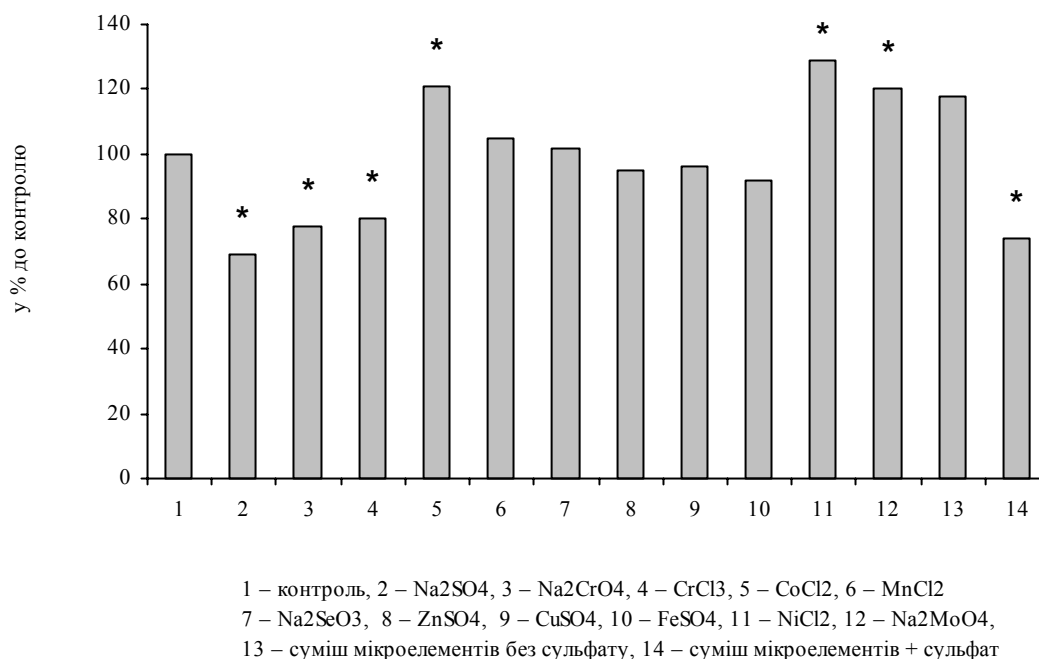


Рис. 2. Вплив окремих мінеральних елементів на утворення метану мікроорганізмами рубця телят за умов *in vitro*.

Що стосується таких мікроелементів як залізо, мідь, селен і молібден, то ми не спостерігали їх впливу на ріст мікроорганізмів, тоді як на утворення метану не впливало додавання марганцю, селену, цинку, міді та заліза, у доданих концентраціях.

Розглянувши вплив окремих мікроелементів на ріст мікроорганізмів рубця великої рогатої худоби і створення ними метану, слід зупинитися на впливі суміші цих мікроелементів на досліджувані показники. Як видно із рисунку 1, при додаванні суміші цих мікроелементів без сульфату спостерігається збільшення росту популяції в порівнянні з ростом у контрольних зразках (на 44 %), але також одночасно зростає і інтенсивність метаногенезу (на 18 %). У той же час при додаванні до інкубаційного середовища з мікроелементами також сульфату натрію зростання мікробної маси є ще більшим, ніж у досліді з додаванням суміші мікроелементів (на 56 %), але вірогідно знижується утворення метану в порівнянні з контрольними зразками (на 26 %). Очевидно, у цьому випадку під впливом сульфату збільшується популяція сульфатредуючих бактерій та використання ними водню, який за відсутності цього аніону йде на редукцію CO₂ до метану.

ВИСНОВКИ

Дослідження, проведені за умов *in vitro*, показали, що додавання до інкубаційного середовища:

- сульфату натрію та іонів хрому стимулює збільшення маси мікроорганізмів рубця і одночасно знижує продукцію метану рубцевими бактеріями;
- іонів марганцю та цинку стимулює лише ріст мікроорганізмів рубця, а сполук нікелю, кобальту і молібдену інтенсифікує тільки процес метаногенезу рубцевими мікроорганізмами;
- суміші мікроелементів і сульфату стимулює ріст популяції мікроорганізмів на 56 % і знижує продукцію метану на 26 % порівняно з контрольними зразками.

Перспектива подальших досліджень. Отримані результати будуть використані для розробки шляхів зниження метаноутворення в рубці великої рогатої худоби.

ВЛИЯНИЕ ОТДЕЛЬНЫХ МИКРОЭЛЕМЕНТОВ НА РОСТ МИКРООРГАНИЗМОВ РУБЦА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА И ОБРАЗОВАНИЕ МЕТАНА

И. В. Лучка Г. О. Богданов, Ю. Т. Салыга, М. Г. Герасымив

А Н Н О Т А Ц И Я

В статье представлены результаты исследований *in vitro* влияния некоторых минеральных элементов на рост микроорганизмов рубца и образования метана. Показано, что при добавлении к среде инкубации сульфата натрия и соединений хрома интенсифицируется рост микроорганизмов рубца и снижается метанообразование. Тогда как внесение в среду инкубации соединений марганца и цинка увеличивает количество микробной массы, а добавление никеля, кобальта и молибдена, интенсифицирует метаногенез. Внесение в среду инкубации смеси микроэлементов усиливает рост микроорганизмов и образование ими метана, а добавление к смеси микроэлементов и сульфата стимулирует рост популяции микроорганизмов и снижает продукцию метана.

INFLUENCE OF SEPARATE MINERAL ELEMENTS ON THE GROWTH OF RUMEN CATTLE MICROORGANISMS AND METHANE FORMATION IN VITRO

I. V. Luchka G. O. Bogdanov, Y. T. Salyha, M. G. Herasymiv

S U M M A R Y

The results of researches *in vitro* of some microelements influence on rumen microorganisms growth and methane production are given in this article. It is shown, that at adding sodium sulfate and chromium compounds to the incubation environment the growth of rumen microorganisms and product intensifies and methanogenesis decreases. While bringing compounds of nickel, cobalt and molybdenum into the incubation environment intensifies methanogenesis, adding the mixture of elements to the incubation environment strengthens microorganism growth and production of methane by them, adding microelements mixture and sulfate stimulates microorganism population growth and decreases methane production.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. *Belay N.* Relationship of formate to growth and methanogenesis by *Methanococcus thermolithotrophicus* / Belay N., Sparling R., Daniels L. // *Appl. Environ. Microbiol.* — 1986. — V. 52, № 5. — P. 1080–1085.
2. *Crutzen P.* Methane production by domestic animals, wild ruminants, and other herbivorous fauna, and humans / Crutzen P., Aselman I., Seiler W. // *Tellus.* — 1986. — № 38 B, — P. 271–284.
3. *Eirich L. D.* Proposed structure for coenzyme F₄₂₀ from *Methanobacterium* / Eirich L. D., Vogels G. D., Wolfe R. S. // *Biochemistry.* — 1978. — Vol. 31, № 17(22). — P. 4583–4593.
4. *Firkins J. L.* Integration of ruminal metabolism in dairy cattle/ Firkins J. L., Hristov A. N., Hall M. B. et al. // *J. Dairy Sci.* — 2006. — Vol. 89, Suppl. 1. — P. 31–51.
5. *Huster R.* Is coenzyme M bound to factor F₄₃₀ in methanogenic bacteria / Huster R., Gilles M.-H., Thauer R. K. // *Eur. J. Biochem.* — 1985. — Vol. 148, № 1 — P. 107–111.
6. *Iason G.* The role of plant secondary metabolites in mammary herbivory : ecological perspectives / Iason G. // *Proc. Nutr. Soc.* — 2005. — Vol. 64, № 1. — P. 123–131.
7. *IPCC (1996),* Climate Change 1995 : Impacts Adaptations and Mitigation of Climate Change: Scientific — Technical Analyses. Contribution of Working Group II to the Second Assessment report of the IPCC. Eds., Watson R.T. Zinyowera M.C. and Moss R.H. Cambridge University Press.

8. *Johnson D. E.* Ruminants and other animals in Atmospheric Methane: Its Role in the Global Environment / Johnson D. E., Johnson K. A., Ward G. M., Branine M. E. // M. A. K. Khalil, ed. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany. — 2000. — P. 112–133.
9. *Johnson K.* Measurement of methane emissions from ruminant livestock using a SF₆ tracer technique / Johnson K., Huyler M., Westberg H., et al. // Environ. Sci. Technol. — 1994. — Vol. 28. — P. 359–362.
10. *Johnson K. A.* Methane emissions from cattle / Johnson K. A., Johnson D. E. // J. Anim. Sci. — 1995. — Vol. 73, — P. 2483–2492.
11. *Lopez S.* Influence of sodium fumarate addition on rumen fermentation in vitro / Lopez S., Valdes C., Newbold C.J., Wallace R.J. // Brit. J. Nutr. — 1999. — V 81, №1. — P. 59–64.
12. *McAllister T. A.* Dietary, environmental and microbiological aspects of methane production in ruminants / McAllister T. A., Okine E. K., Mathison G. W., Cheng K. -J. // Can. J. Anim. Sci. — 1996. — Vol. 76. — P. 231–243.
13. *Peter H. Janssen.* Structure of the Archaeal Community of the Rumen / Peter H. Janssen, Marek Kirs// Applied and environmental microbiology, — 2008. — Vol. 74, № 12. — P. 3619–3625.
14. *Алиев А. А.* Метод фракционирования содержимого преджелудков на составные части / Алиев А. А., Кафаров М. Ш. // Бюлл. ВНИИФБиП с.х. животных. — 1971. — № 5. — С. 69–72.
15. *Богданов Г. О.* Метан: біологічні та екологічні аспекти, джерела утворення, проблема зниження емісії газу в контексті регіональних і галузевих особливостей та глобальних наслідків / Богданов Г. О., Зубець М. В., Мельничук Д. О. і ін. // Біологія тварин. — 2000. — Т. 2, № 2. — С. 5–22.
16. *Янович В. Г.* Біологічні основи трансформації поживних речовин у жуйних тварин / Янович В. Г., Сологуб Л. І. — Львів : Тріада плюс, 2000. — 384 с.

Рецензент: завідувач лабораторії живлення овець та вовноутворення, доктор сільськогосподарських наук, с. н. с П. В. Стапай.