

ВПЛИВ ПРЕПАРАТУ БАЦИЛЯРНИЙ СУБТИЛІС БПС-44 НА СТАНОВЛЕННЯ МІКРОФЛОРИ РУБЦЯ ТЕЛЯТ

О. М. Стефанишин

Інститут біології тварин НААН України

*Проведено дослідження активності гідролітичних ферментів вмісту рубця і заселення рубця бичків чорно-рябої української молочної породи у 4–6-місячному віці мікроорганізмами при додаванні до раціону тварин бациллярного препарату *Bacillus subtilis* БПС-44. Встановлено підвищення протеолітичної активності та зниження амілолітичної та целюлозолітичної активностей у вмісті рубця бичків дослідної групи порівняно до контрольної. Ці різниці зумовлені зменшенням кількості целюлозолітичних і амілолітичних мікроорганізмів та збільшенням кількості протеолітичних мікроорганізмів у вмісті рубця бичків дослідної групи.*

Ключові слова: РУБЕЦЬ, МІКРООРГАНІЗМИ, ПРОБІОТИЧНИЙ ПРЕПАРАТ

У світі розроблено цілий ряд пробіотичних препаратів, використання яких в дієтології людини покращує процеси травлення і запобігає розладам шлунково-кишкового тракту. Що стосується сільськогосподарських тварин, зокрема жуйних тварин, то таких препаратів є небагато [15,12]. Тому проводяться дослідження, метою яких є створення нових пробіотичних препаратів, які позитивно впливають на розвиток мікрофлори і мікрофауни шлунково-кишкового тракту і засвоєнню поживних речовин корму. У склад пробіотичних препаратів входять мікроорганізми, клітини яких містять різні білки, в тому числі ферменти, незамінні амінокислоти, а також інші біологічно активні речовини, які після всмоктування з травного тракту проявляють позитивний вплив на життєдіяльність організму тварини-господаря. Тому їх добавка до раціону може позитивно впливати на розвиток екосистеми рубця жуйних, і на обмінні процеси в організмі тварин та їх продуктивність [1,2]. Проте вплив окремих видів мікроорганізмів як пробіотиків на мікрофлору і мікрофауну рубця не вивчено. Цим зумовлена актуальність вивчення впливу створених пробіотичних препаратів на окремі види бактерій та інфузорій у рубці тварин, та їхню метаболічну активність [10].

У зв'язку з цим метою даної роботи було дослідження впливу нового пробіотика *Bacillus subtilis* БПС-44 на мікрофлору і фауну рубця телят у період становлення рубцевого типу травлення.

Матеріали і методи

У дослідному господарстві «Прут-Генетик» було сформовано дві групи (контрольна і дослідна) бичків чорно-рябої української молочної породи за методом пар-аналогів, по 5 голів у кожній, від яких у 4-, 5- і 6-місячному віці відбирали для досліджень вміст рубця. Вміст рубця одержували через 4 години після ранкової годівлі бичків за допомогою зонда. Перша група тварин, які не отримували пробіотик *Bacillus subtilis* БПС-44, слугувала контролем, а друга – дослідна група, отримували пробіотик *Bacillus subtilis* БПС-44 у вигляді водного розчину під час ранкового напування. Тривалість досліду — 2 місяці. Одержані зразки вмісту рубця транспортували в анаеробних умовах у лабораторію, фільтрували через 4 шари марлі і переносили у буферну суміш. Інкубаційне середовище містило наступні інградієнти (г на 1 л рідини рубця): K_2HPO_4 — 0,45, KH_2PO_4 — 0,45,

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 0,9, NaCl — 0,9, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 0,12, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,19, цистеїн хлорид — 0,6, дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* — 1 [4]. Після змішування, 50 мл цієї суміші вносили в інкубаційні посудини. Посудини закривали корками, продували CO_2 і інкубували протягом 24 год. при температурі 38 С. У зразках рідини визначали протеолітичну активність [5], амілолітичну активність [6], целюлозолітичну активність [7] та вміст білків [8]. Підрахунок загальної кількості мікроорганізмів у вмісті рубця проводили в лічильній камері Горяєва під мікроскопом. На 1 cm^2 скельця наносили 40мкл рубцевої рідини розведеної у 10^8 . Мазок висушували і фарбували по Грамму. Посів і підрахунок загальної кількості целюлозолітичних, протеолітичних та амілолітичних груп бактерій проводили методом ролл-туб (roll tube culture) за методом Р. Н. Smith і Р. Е. Hungate [3]. Годівля тварин проводилась згідно існуючих норм. Утримання тварин — стійлове.

Результати й обговорення

При дослідженні кількісних змін мікроорганізмів рубця бичків було встановлено, що кількість бактерій у рубці тварин контрольної і дослідної груп у 4-, 5- і 6-місячному віці були майже однаковими (рис. 1), а кількість інфузорій у вмісті рубця телят дослідної групи була дещо менша, ніж у телят контрольної групи ($P=0,5$).

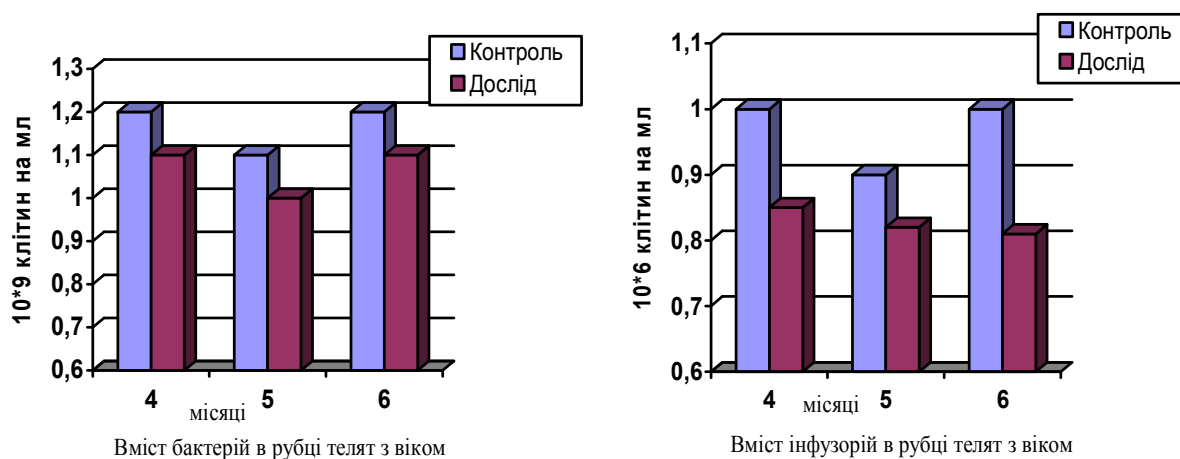


Рис. 1. Кількість бактерій і інфузорій в рубці телят з віком ($M \pm m$, клітин на мл, $n=5$)

Як видно з рисинку 2, кількість целюлозолітичних мікроорганізмів у вмісті рубця бичків дослідної групи, яким згодовували пробіотик *Vac. subtilis* БПС-44 на всіх стадіях досліджень, була дещо більша, ніж у телят контрольної групи ($P<0,5$).

Відомо, що ріст і відносна кількість певних груп мікроорганізмів у рубці жуйних тварин у значній мірі залежить від наявності певного субстрату [1]. Використання клітковини організмом жуйних тварин в основному залежить від ферментативної активності целюлозолітичних мікроорганізмів.

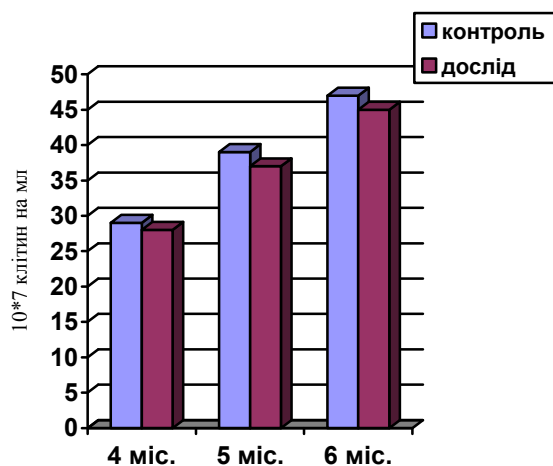


Рис. 2. Кількість целюлозолітичних мікроорганізмів у рубці телят з віком (M±m, n=5)

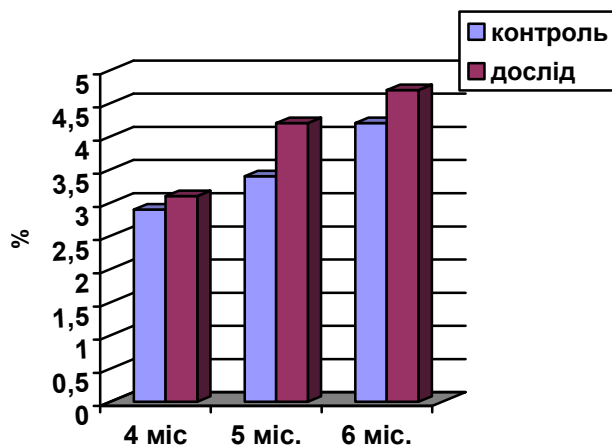


Рис. 3. Целюлозолітична активність у рубці телят з віком (M±m, n=5)

Протягом нашого дослідження було відзначено суттєві різниці целюлозолітичної активності у вмісті рубця телят дослідної групи (рис. 3). У контрольній групі телят активність целюлозолітичних мікроорганізмів у вмісті рубця була вищою, ніж у дослідній групі. Зниження целюлозолітичної активності у вмісті рубця телят дослідної групи, можливо, зумовлено із впливом концентрації водневих іонів (рН), яка у рубцевій рідині телят дослідної групи була нижчою (6,53), ніж у телят контрольної (7,09) (рис. 4). Зниження концентрації водневих іонів відповідно викликало і зниження целюлозолітичної активності, оскільки оптимум дії целюлозолітичних ферментів знаходиться у межах рН 6,8–7,2.

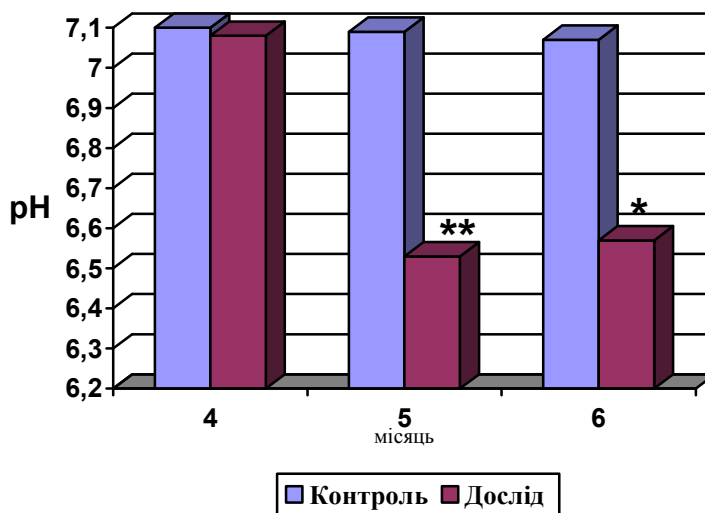
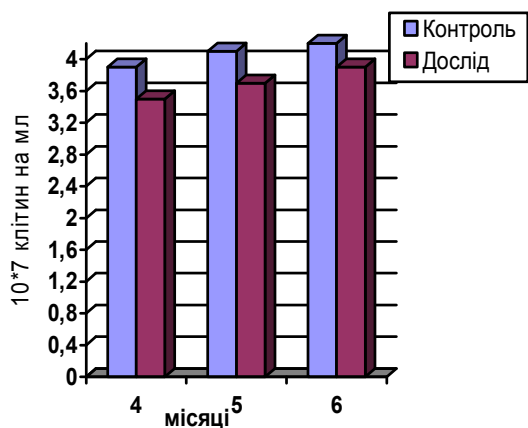


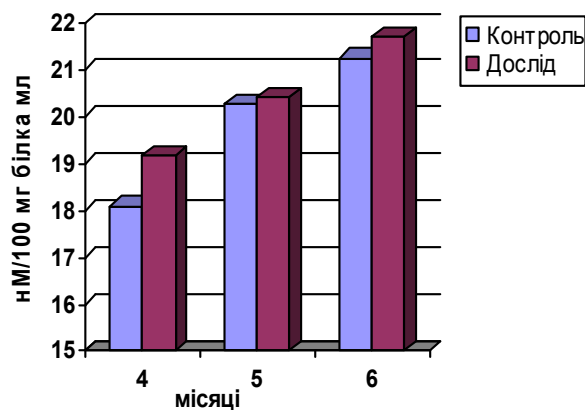
Рис. 4. рН рубцевої рідини досліджуваних телят

Jadamus і ін. [14], показали, що пробіотичні штами *Bacillus* spp. виділяють дипіколінову кислоту, яка пригнічує *in vitro* ріст більшості лактобацил та ентеробактерій. Таким чином, нижча концентрація водневих іонів у рідині рубця телят дослідної групи може бути зумовлена виділенням спорами *Bacillus subtilis* БПС-44 дипіколінової кислоти у середовище рубця тварин.

Кількість амілолітичних мікроорганізмів у вмісті рубця телят дослідної групи була меншою, ніж у телят контрольної групи, але ці різниці не були суттєвими. Також це стосується і амілолітичної активності вмісту рубця як контрольних, так і дослідних тварин.



Кількість амілолітичних мікроорганізмів у рубці телят з віком



Амілолітична активність у рубці телят з віком

Рис. 5. Кількість мікроорганізмів і амілолітична активність у рубці телят ($M \pm m$, $n=5$)

Кількісний і якісний склад протеолітичної мікрофлори в рубці телят істотно змінюється в залежності від рівня і джерела протеїну в раціоні та від віку тварин. На рис.6 показано зміни кількості протеолітичних бактерій в рубці телят з віком і при згодовуванні пробіотика *Bac. subtilis*. З них видно, що кількість протеолітичних мікроорганізмів у вмісті рубця телят з віком зростала як у контрольній, так і у дослідній групах. Проте у дослідній групі їхня кількість була більшою, ніж у контрольній групі. Одним із механізмів профілактичної дії пробіотичних препаратів на основі *Bac. subtilis* вважають синтез мікроорганізмами ферментів, які каталізують гідролітичні та окиснювально-відновні реакції [13]. Тому можна припустити, що на збільшення кількості протеолітичних мікроорганізмів вплинуло згодовування телятам пробіотика із підсиленням рубцевого метаболізму.

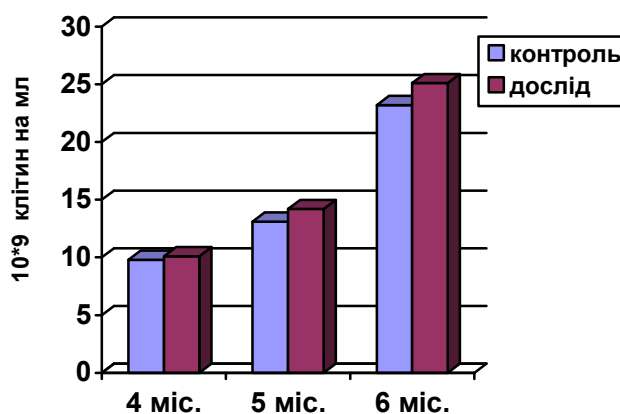


Рис. 6. Кількість протеолітичних мікроорганізмів у рубці телят з віком ($M \pm m$, $n=5$)

Відомо, що симбіотичні бактерії, інфузорії і гриби в рубці жуйних тварин інтенсивно розщеплюють протеїн кормів. З наведених у таблиці 1 даних видно, що активність кислих протеїназ, які приймають участь у процесах деградації білка, у вмісті рубця телят дослідної групи у 5- і 6-місячному віці була вища, ніж у телят контрольної групи.

Активність кислих і нейтральних протеїназ у вмісті рубця телят. (M±m, нМ/100мг білка/30 хв, n=5)

| Кислі протеїнази (рН 6,0) | | Нейтральні протеїнази (рН 7,2) | |
|---------------------------|-----------|--------------------------------|-----------|
| контроль | дослід | контроль | дослід |
| <i>4-місячні телята</i> | | | |
| 25,4±0,7 | 25,6±0,4 | 108,3±2,5 | 107,2±3,9 |
| <i>5-місячні телята</i> | | | |
| 29,8±0,8 | 39,6±1,0* | 126,9±2,7 | 96,2±2,3* |
| <i>6-місячні телята</i> | | | |
| 32,7±0,6 | 42,5±1,6* | 131,4±2,2 | 95,4±1,1* |

Примітка. (у цій таблиці) * — різниця між групами з віком вірогідна (* — P<0,02)

При цьому активність нейтральних протеїназ, до яких в основному належать регуляторні ферменти була, навпаки, вищою у вмісті рубця телят контрольної групи. Це, в певній мірі, може свідчити про високу інтенсивність метаболізму у вмісті рубця і складну систему його регуляції за участю білків-регуляторів. Тому ми можемо припустити, що згодовування пробіотика *Bac. subtilis* проявляло інгібуючий вплив на нейтральні протеїнази, та в певній мірі частково активувало кислі протеїнази [2].

Висновки

Отже, проведені дослідження активності гідролітичних ферментів вмісту рубця і заселення рубця бичків чорно-рябої української молочної породи у 4–6-ти місячному віці мікроорганізмами при додаванні до раціону тварин бацилярного препарату *Bacillus subtilis* БПС-44 в комплексі із окремими мікроелементами. Встановлено підвищення протеолітичної активності та зниження амілолітичної і целюлозолітичної активностей у вмісті рубця бичків дослідної групи порівняно до контрольної групи. Ці різниці зумовлені зменшенням кількості целюлозолітичних і амілолітичних мікроорганізмів та збільшенням кількості протеолітичних мікроорганізмів у вмісті рубця бичків дослідної групи.

Перспективи подальших досліджень. Науково-практичний інтерес становить вивчення впливу пробіотика *Bac. subtilis* на клінічні показники телят протягом терміну відгодівлі.

О. М. Stefanyshyn

INFLUENCE OF PREPARATION BACILLIC SUBTILIS BPS-44 ON GROWTH RUMEN MICROORGANISMS OF CALVES**S u m m a r y**

Researches were conducted of hydrolysis activity in rumen content of calves of black-and-white Ukrainian milk breed in 4–6 monthl age by rumen microorganisms at adding to the ration of bacillary preparation of *Bacillus subtilis* BPS-44. The increase of proteolytic activity and decline of amylolytic is set and cellulolytic activities in rumen content of calves of experimental group comparatively with control was established. These differences are predefined by diminishing of amount of cellulolytic and amylolytic microorganisms and increase of amount of proteolytic microorganisms in rumen content of experimental group calves.

О. М. Стефаньшын

ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТА БАЦИЛЛЯРНЫЙ СУБТИЛИС БПС-44 НА СТАНОВЛЕНИЕ МИКРОФЛОРЫ РУБЦА БЫЧКОВ

А н н о т а ц и я

Проведено исследование активности гидролитических ферментов содержимого рубца и заселение рубца бычков черно-пестрой украинской молочной породы в 4–6-месячном возрасте микроорганизмами при добавлении к рациону животных бактериального препарата *Bacillus subtilis* БПС-44. Установлено повышение протеолитической активности и снижение амилолитической и целлюлозолитической активностей в содержимом рубца бычков опытной группы сравнительно с контрольной. Эти различия предопределены уменьшением количества целлюлозолитических и амилолитических микроорганизмов, а также увеличением количества протеолитических микроорганизмов в содержимом рубца бычков опытной группы.

1. Янович В. Г. Біологічні основи трансформації поживних речовин у жуйних тварин [Текст] / В. Г. Янович, Л. І. Сологуб. — Львів : Тріада плюс, 2000. — 384 с.
2. Сологуб Л. І. Протеази клітин та їх функції [Текст] / Л. І. Сологуб, І. С. Пашковська, Г. Л. Антоняк. — Київ : Наукова думка, 1992. — 196 с.
3. Тараканов Б. В. Методы исследований микрофлоры пищеварительного тракта с.-х. животных и птицы / Б. В. Тараканов // Бюлл. Всес. н.-и. Ин-та физиол., биохим. и питания с.-х. животных. — 1998. — 145 с.
4. Lopez S. Influence of sodium fumarate addition on rumen fermentation in vitro / C. Valdes, C. J. Newbold, R. J. Wallace // Brit. J. Nutr. — 1999. — Vol. 81, № 1. — P. 59–64.
5. Kunitz M. Crystalline soybean trypsin inhibitor / M. Kunitz // J. Gen. Physiol. — 1947. — Vol. 30. — P. 291–310.
6. Лабораторные методы исследования в клинике / под ред. В. В. Меньшикова. — М. : Медицина, 1987. — С. 191–192.
7. 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.
8. 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.
9. Дерев'янюк С. В. Розробка та впровадження пробіотичного препарату БПС-44 у виробництво [Текст] : міжвід. темат. наук. зб. ІІ УААН «Птахівництво» / С. В. Дерев'янюк, Л. В. Божок, В. Г. Скрипник та ін. — Харків, 2004. — Вип. 55. — С. 524–529.
10. Stein T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific func // Molecular microbiology. — 2005. — 56, N. 4. — P. 845–857.
11. Похиленко В. Д. Пробиотики на основе спорообразующих бактерий и их безопасность / В. Д. Похиленко, В. В. Перелыгин // Химич. и биол. безопасность — 2007. — Вип. 32–33, № 1–2. — С. 20–41.
12. Тараканов Б. В. Использование пробиотиков в животноводстве. — Калуга : ВНИИ ФБ и П с/х животных, 1998. — С. 5–6.
13. Mackie R. I. Recent advances in rumen microbial ecology and metabolism: potential impact on nutrient output / R. I. Mackie, B. A. White // J. Dairy Sci. — 1990. — Vol. 73, № 10. — P. 2971–2995.
14. Jadamus. A. Studies on the mode of action of probiotics; effects of the spore-specific dipicolinic acid on selected intestinal bacteria / A. Jadamus, W. Vahjen, O. Simon // J Agr.Sci. — 2005. — Vol. 143. — P. 529–535.

Рецензент: доктор біологічних наук, професор Янович В. Г.