

УДК 577.124/577.125.3

ВПЛИВ pH НА ФЕРМЕНТАЦІЮ СОСВОЇ, СОНЯШНИКОВОЇ ТА РІПАКОВОЇ МАКУХИ У ВМІСТІ РУБЦЯ КОРІВ IN VITRO

О. В. Гультяєва, Н. В. Голова, В. В. Влізло
inenbiol@mail.lviv.ua

Інститут біології тварин НААН, вул. В. Стуса, 38; Львів, 79034, Україна

Дефіцит енергії у раціонах високопродуктивних корів частково поповнюється жировими добавками, які можуть пригнічувати метаболізм у рубці. Проведено дослідження впливу додавання до раціону з високим вмістом макухи алкілуючої суміші на ензиматичні процеси у рубці в умовах in vitro. Зразки вмісту рубця протягом 8 годин інкубували з соєвою, соняшниковою та ріпаковою макухами (25 мл фільтрату вмісту рубця + 75 мл буферного розчину Мак-Дугала + 0,5 г макухи) з додаванням до інкубатів алкілуючої суміші, яка містила 100 мг бікарбонату натрію, 50 мг карбонату кальцію та 50 мг карбонату магнію. Вміст жиру в макухах становив 8,1–8,5 %.

Введення алкілуючої суміші забезпечило стабілізацію pH вмісту рубця, наприкінці інкубування цей показник в контрольних інкубатах становив 6,54–6,61, а у дослідних — 6,73–6,82. Додавання суміші бікарбонату натрію та карбонатів кальцію і магнію підвищувало целюлозолітичну ($p < 0,001$) та знижувало амілолітичну активності ($p < 0,05$). Протеолітичні бактерії менш чутливі до pH, проте протеолітична активність у дослідних інкубатах дещо зростала. При інкубуванні з ріпаковою макухою у вмісті рубця виявлено меншу кількість мікробного азоту та нижчу концентрацію аміаку і лактату, порівняно до його інкубування з соняшниковою макухою. Додавання до вмісту рубця алкілуючої карбонатної суміші сприяло зростанню кількості білкового азоту за рахунок азоту мікроорганізмів у дослідженнях з усіма видами макухи ($p < 0,05–0,001$). При цьому, концентрація лактату зменшувалась ($p < 0,01–0,001$), що пояснюється зростанням pH. Додавання алкілуючої сольової суміші збільшувало кількість загальних ліпідів та неестерифікованих жирних кислот ($p < 0,05–0,01$).

Ключові слова: КОРОВИ, МАКУХА, ВМІСТ РУБЦЯ, ЕНЗИМАТИЧНА АКТИВНІСТЬ, АЗОТОВО-ВУГЛЕВОДНИЙ ОБМІН, ЛІПІДИ, IN VITRO

EFFECT OF PH ON SOYBEAN, SUNFLOWER AND RAPESEED OIL-CAKES FERMENTATION IN THE RUMEN OF CATTLE IN VITRO

A. V. Hulyayeva, N. V. Golova, V. V. Vlizlo
inenbiol@mail.lviv.ua

Institute of animal biology NAAS, st. Vasyl Stus, 38; Lviv, 79034, Ukraine

Requirement of metabolizable energy in the diets of high-yielding cows partially provided by fat supplements what can inhibit rumen metabolism. The influence of the addition of alkalizing mixture to the diet with high content of oil-cake on enzymatic processes in the rumen in vitro has been investigated. Oil-cakes contained 8,1–8,5 % of fat. Samples of rumen fluid were incubated for 8 hours with soybean, sunflower seed or rapeseed oil-cake (25 ml rumen content filtrate + 75 ml of McDougall's buffer + 0.5 g of oil-cake) with the addition of alkalizing mixture containing 100 mg of sodium bicarbonate, 50 mg of carbonate calcium and 50 mg of magnesium carbonate.

Alkalizing mixture provided stabilization of rumen content pH, which at the end of incubation was in control samples 6.54–6.61 vs. 6.73–6.82 in the samples with added carbonates. Addition of the mixture of sodium bicarbonate and calcium and magnesium carbonates increased cellulolytic activity ($p < 0.001$) and decreased amylolytic activity ($p < 0.05$). Proteolytic bacteria are less sensitive to pH, but the proteolytic

activity in the experimental incubates were slightly increased too. Incubation of rumen fluid with rapeseed cake resulted in lower total nitrogen and ammonia and lactate concentration compared to incubation with sunflower cake.

Adding to rumen fluid alkalizing carbonates mixture boosted the level of microbial protein in studies with all types of oil-cake ($p < 0.05$ – 0.001). The concentration of lactate was decreased ($p < 0.01$ – 0.001) due to rising pH. Alkalizing salts mixture increased the amount of total lipids and non-esterified fatty acids ($p < 0.05$ – 0.01).

Keywords: COWS, OIL-CAKE, RUMEN CONTENT, ENZYMATIC ACTIVITY, NITROGEN, CARBOHYDRATES, LIPIDS, IN VITRO

ВЛИЯНИЕ PH НА ФЕРМЕНТАЦИЮ СОЕОВОГО, ПОДСОЛНЕЧНОГО И РАПСОВОГО ЖМЫХА В СОДЕРЖИМОМ РУБЦА КОРОВ IN VITRO

A. B. Гультяева, Н. В. Голова, В. В. Влизло
inenbiol@mail.lviv.ua

Институт биологии животных НААН, ул. В. Стуса, 38; Львов, 79034, Украина

Дефицит энергии в рационах высокопродуктивных коров частично пополняется жировыми добавками, которые могут угнетать метаболизм в рубце. Проведено исследование влияния добавления в рацион с высоким содержанием жмыха алкилирующей смеси на ферментативные процессы в рубце в условиях *in vitro*. Образцы содержимого рубца в течение 8 часов инкубировали с соевым, подсолнечным и рапсовым жмыхами (25 мл фильтрата содержимого рубца + 75 мл буферного раствора Мак-Дугала + 0,5 г жмыха) с добавлением к инкубатам алкилирующей смеси, которая содержала 100 мг бикарбоната натрия, 50 мг карбоната кальция и 50 мг карбоната магния. Содержание жира в жмыхах составляло 8,1–8,5 %.

Добавление алкилирующей смеси обеспечило стабилизацию pH содержимого рубца, в конце инкубирования этот показатель в контрольных инкубатах составлял 6,54–6,61, а в опытных — 6,73–6,82. Добавление смеси бикарбоната натрия и карбонатов кальция и магния повышало целлюлозолитическую ($p < 0,001$) и снижало амилолитическую активности ($p < 0,05$). Протеолитические бактерии менее чувствительны к pH, однако протеолитическая активность в опытных инкубатах несколько возрастала. При инкубировании с рапсовым жмыхом в содержимом рубца обнаружено меньшее количество микробного азота и более низкую концентрацию аммиака и лактата, по сравнению с его инкубированием с подсолнечным жмыхом. Добавление к содержимому рубца алкилирующей карбонатной смеси способствовало увеличению количества белкового азота за счет азота микроорганизмов в инкубатах с всеми видами жмыха ($p < 0,05$ – $0,001$). При этом уменьшалась концентрация лактата ($p < 0,01$ – $0,001$), что объясняется повышением pH. Добавление алкилирующей солевой смеси увеличивало количество общих липидов и неэстерифицированных жирных кислот ($p < 0,05$ – $0,01$).

Ключевые слова: КОРОВЫ, ЖМЫХ, СОДЕРЖИМОЕ РУБЦА, ЭНЗИМАТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ, АЗОТНО-УГЛЕВОДНЫЙ ОБМЕН, ЛИПИДЫ, IN VITRO

Головним джерелом енергії для жуйних тварин є клітковина, за рахунок розщеплення якої у рубці забезпечується до 90 % енергетичних потреб низькопродуктивних корів. Вміст у раціоні клітковини, яка наявна, головним чином, у об'ємистих кормах обмежується розміром

рубця, тому кількість її споживання незначно зростає зі збільшенням молочної продуктивності.

Внаслідок цього, дефіцит метаболічної енергії поповнюється, переважно, за рахунок неструктурних вуглеводів (крохмаль, цукор) зернових

кормів [1–4] і ліпідів олійних культур та жирових добавок [1, 3, 5, 6]. Висока енергетична цінність крохмалю і цукру дозволяє збалансувати загальний вміст обмінної енергії раціону, проте відмінності у розщепленні клітковини та неструктурних вуглеводів викликають зміни загального перебігу рубцевого травлення та впливають на обмін речовин у цілому і продуктивність корів. Великий вміст неструктурних вуглеводів викликає надмірне утворення у рубці транс-10 ізомерів ненасичених довголанцюгових жирних кислот [7] і молочної кислоти та звужує ацетат-пропіонатне відношення [8], внаслідок чого знижується жирність молока [5]. Збільшення у складі раціону кількості жиру також може негативно вплинути на рубцеве травлення та молочну продуктивність через пригнічення поліненасиченими жирними кислотами життєдіяльності рубцевих бактерій [9–12]. Таким чином, забезпечення потреби корів у енергії за рахунок клітковини неможливе через обмежений об'єм рубця, а її поповнення неструктурними вуглеводами та жирами може спричинити порушення обміну речовин.

Для попередження негативної дії на рубцеве травлення неструктурних вуглеводів у тваринництві широко застосовують буферні сполуки: бікарбонат натрію та деякі інші алкілюючі речовини, механізм дії яких полягає у вирівнюванні pH рубцевої рідини, завдяки чому зростає активність целюлозолітичних бактерій та зменшується утворення пропіонової та молочної кислот [13, 14]. Вплив буферних добавок на розщеплення корму з високим вмістом жиру вивчений значно менше. Відомо, що за різного pH змінюється інтенсивність та спрямованість біогідрогенізації ненасичених жирних кислот, а саме – за вищого pH зменшується утворення транс-10 ізомерів олеїнової та лінолевої кислот, які пригнічують синтез молочного жиру [7]. Крім того, вільні жирні кислоти, які утворюються у рубці при гідролізі складних ліпідів, можуть

знижувати pH. Тому, можна припустити, що додавання буферних добавок до раціону з високим вмістом жиру сприятиме попередженню негативної дії жирових добавок на життєдіяльність рубцевої мікрофлори.

Метою нашої роботи було дослідити вплив pH на інтенсивність і спрямованість метаболічних процесів у вмісті рубця жуйних *in vitro* при інкубуванні його з різними за ліпідним складом компонентами.

Матеріали і методи

Для досліджень використали вміст рубця 5 корів продуктивністю 20–25 кг молока на добу, яких утримували на раціоні, що містив сіно лучне — 4 кг, сінаж різнотравний — 10 кг, силос кукурудзяний — 20 кг, брагу пшеничну — 10 кг, дерть пшеничну — 5 кг, шрот соняшниковий — 0,5 кг, мелясу — 1,5 кг.

Вміст рубця відбирали зондом через 2 години після ранкової годівлі. До 25 мл фільтрату вмісту рубця додавали 75 мл буферного розчину Мак-Дугала, до складу якого входили (на 1 л розчину): 9,8 г NaHCO_3 , 2,77 г Na_2HPO_4 , 0,57 г KCl , 0,47 г NaCl , 0,12 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ та 0,16 г $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$.

Виконано шість серій інкубувань: три контрольні та три дослідні. До інкубатів контрольних серій додавали по 0,5 г соєвої, соняшnikової або ріпакової макухи. Суха речовина соєвої, соняшnikової і ріпакової макух містили, відповідно: 40,22; 38,08 та 36,34 % сирого протеїну; 8,5; 8,1 і 8,3 % сирого жиру; 5,02; 11,31 і 8,44 % сирової клітковини; 2,21, 2,12 і 0,33 % крохмалю; 9,36; 5,73 і 0,56 % цукрів.

В інкубати дослідних серій, крім вказаних макух вносили алкілюючу суміш, яка містила 100 мг бікарбонату натрію, 50 мг карбонату кальцію та 50 мг карбонату магнію. Інкубування проводили за температури 39 °C у присутності CO_2 протягом 8 годин. Зразки інкубаційного середовища відбирали до початку інкубування та через 8 годин.

Досліджувані показники: рН, загальний та білковий азот, аміак, молочна кислота, езиматичні активності, ліпідний склад [15].

Результати опрацьовували статистично. Стандартну помилку середнього (SEM) визначали з використанням програми Microsoft Excel шляхом ділення стандартного відхилення (SD) на корінь квадратний кількості зразків.

Результати й обговорення

В інкубованому з ріпаковою макухою вмісті рубця виявлено вищу целюлозолітичну ($p < 0,001$) та амілолітичну ($p < 0,05$) активності, порівняно до інкубатів з соняшnikовою макухою (табл. 1). Зниження протеолітичної активності також наявне, проте ця різниця статистично невірогідна. Такі відмінності пов'язані з меншим вмістом клітковини, крохмалю та протеїну в ріпаковій макусі. Найвищу протеолітичну та амілолітичну активності

спостерігали при інкубуванні вмісту рубця з соєвою макухою. Це може бути зумовлено більшим вмістом протеїну, крохмалю та цукру в соєвій макусі, а також кращою доступністю протеїну соєвої макухи.

Додавання до інкубатів суміші бікарбонату натрію та карбонатів кальцію і магнію підвищувало целюлозолітичну активність ($p < 0,001$) та знижувало амілолітичну активність ($p < 0,05$) в усіх серіях досліджень. Це пояснюється різним оптимумом рН для існування і гідролітичної активності целюлозолітичних та амілолітичних бактерій, тобто додані солі підвищували рН рубцевої рідини, що впливало на гідролізуючу здатність відповідних ензимів. Хоча протеолітичні мікроорганізми менш чутливі до змін рН, протеолітична активність в інкубатах з соняшnikовою та ріпаковою макухами також дещо зростала. Очевидно, це пов'язано з посиленням функціонування інших типів бактерій і стимулюванням їх протеолітичної активності.

Таблиця 1

Ензиматична активність та рН вмісту рубця за інкубування з макухою ($M \pm m$, $n=5$)

Показники	Соняшnikова макуха		Ріпакова макуха		Соєва макуха	
	контроль	дослід	контроль	дослід	контроль	дослід
	$M \pm m$	$M \pm m$	$M \pm m$	$M \pm m$	$M \pm m$	$M \pm m$
Целюлозолітична, % активності	12,05 \pm 0,43	18,51 \pm 0,83***	14,96 \pm 0,84	20,27 \pm 0,71***	11,54 \pm 0,31	16,58 \pm 0,27***
Амілолітична, тис. ум. ам. од.	0,18 \pm 0,01	0,14 \pm 0,01*	0,14 \pm 0,01	0,11 \pm 0,01*	0,25 \pm 0,02	0,22 \pm 0,01
Протеолітична, екв.уг/100 мл/хв	2,62 \pm 0,13	2,75 \pm 0,10	2,47 \pm 0,10	2,71 \pm 0,08	2,89 \pm 0,16	2,82 \pm 0,19
рН	6,54 \pm 0,12	6,81 \pm 0,07*	6,61 \pm 0,13	6,82 \pm 0,08	6,60 \pm 0,05	6,73 \pm 0,03

Примітка: у цій та наступних таблицях: * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$

При інкубуванні з ріпаковою макухою (табл. 2) у вмісті рубця виявлено меншу кількість загального азоту, порівняно до його інкубування з соєвою та соняшnikовою макухою, що пов'язано з менш інтенсивним синтезом мікробного білка ($p < 0,01$). Оскільки концентрація аміаку в інкубатах з ріпаковою макухою

також була меншою ($p < 0,05$), можна зробити висновок про повільніше розщеплення протеїну ріпакової макухи. Підтвердженням цьому служить відсутність різниці у кількості білкового азоту. У вмісті рубця, інкубованого з ріпаковою макухою, було менше лактату і, відповідно, вищий показник рН.

Таблиця 2

Показники азотово-вуглеводного обміну у вмісті рубця за інкубування з макухою, ммоль/л ($M \pm m$, $n=5$)

Показники	Соняшникова макуха		Ріпакова макуха		Соева макуха	
	контроль	дослід	контроль	дослід	контроль	дослід
	$M \pm m$	$M \pm m$	$M \pm m$	$M \pm m$	$M \pm m$	$M \pm m$
Загальний азот	85,78 \pm 6,63	83,51 \pm 2,14	78,45 \pm 2,22	86,79 \pm 3,97	91,34 \pm 5,77	93,17 \pm 4,08
Білковий азот	66,61 \pm 3,65	70,63 \pm 0,80	63,38 \pm 2,01	68,32 \pm 1,05*	72,97 \pm 3,56	75,31 \pm 5,22
Мікробний азот	35,67 \pm 2,04	41,33 \pm 0,74*	28,68 \pm 0,44	36,67 \pm 0,82***	37,43 \pm 2,76	39,72 \pm 4,21
Аміак	7,93 \pm 0,36	5,38 \pm 0,29**	6,46 \pm 0,34	5,12 \pm 0,14*	8,38 \pm 0,21	6,57 \pm 0,29*
Лактат	3,89 \pm 0,35	2,14 \pm 0,14**	3,35 \pm 0,18	1,88 \pm 0,07**	4,59 \pm 0,22	2,67 \pm 0,15***

Такі відмінності пояснюються значно меншим вмістом крохмалю і цукрів у ріпаковій макусі, порівняно до соняшnikової, і особливо соєвої, макухи. Додавання до вмісту рубця алкілюючої карбонатної суміші сприяло зростанню кількості білкового азоту за рахунок азоту мікроорганізмів у дослідженнях з соняшnikовою ($p < 0,05$) та ріпаковою ($p < 0,01$) макухами, тоді як додавання алкілюючої суміші до інкубатів з соєвою макухою на синтез мікробного білка вплинуло незначно. Таким чином, на синтез у рубці мікробного білка алкілююча суміш ефективніше впливала за наявності у середовищі ріпакової макухи, порівняно до зразків вмісту рубця з додаванням соєвої та соняшnikової макухи.

Про інтенсифікацію синтезу мікробного білка свідчить й зменшення концентрації аміаку у вмісті рубця дослідних груп ($p < 0,05-0,01$). Отже, за додавання до інкубатів бікарбонату натрію

та карбонатів кальцію і магнію посилюється ріст мікробної маси. Лактату в інкубатах вмісту рубця дослідних груп усіх серій досліджень було вірогідно менше ($p < 0,01-0,001$), що пояснюється підвищенням у них рН, від значення якого залежить каталітична активність мікробних ензимів, що розщеплюють різні групи вуглеводів корму.

В інкубатах вмісту рубця з ріпаковою макухою виявлено дещо більший загальний вміст ліпідів. Це не може бути наслідком посилення синтезу ліпідів мікроорганізмів, оскільки, як видно з таблиці 3, синтез мікробного азоту, а відповідно і наростання мікробної маси в інкубованому з ріпаковою макухою вмісті рубця менший, ніж в інкубатах з соняшnikовою макухою. З іншого боку, збільшення кількості протеїну в інкубатах з ріпаковою макухою може бути зумовлене меншою протеолітичною активністю бактерій у них до інкубування.

Таблиця 3

Показники ліпідного обміну у вмісті рубця за інкубування з макухою ($M \pm m$, $n=5$)

Показники	Соняшникова макуха		Ріпакова макуха		Соева макуха	
	контроль	дослід	контроль	дослід	контроль	дослід
	$M \pm m$	$M \pm m$	$M \pm m$	$M \pm m$	$M \pm m$	$M \pm m$
Загальні ліпіди, г/л	1,88 \pm 0,06	2,09 \pm 0,06*	2,04 \pm 0,06	2,33 \pm 0,05*	1,95 \pm 0,03	2,19 \pm 0,07**
НЕЖК, ммоль/л	1,22 \pm 0,03	1,44 \pm 0,05**	1,31 \pm 0,05	1,51 \pm 0,08**	1,18 \pm 0,04	1,42 \pm 0,05**
ТГ, ммоль/л	0,36 \pm 0,04	0,28 \pm 0,03	0,40 \pm 0,04	0,33 \pm 0,02*	0,42 \pm 0,03	0,30 \pm 0,02**

Додавання алкілюючої сольової суміші збільшувало кількість загальних ліпідів, що очевидно пояснюється

інтенсифікацією росту мікробної маси. Суміш карбонатів збільшувала концентрацію вільних жирних кислот в усіх

серіях досліджень за рахунок більшого гідролізу триацилгліцеролів ($p < 0,05-0,01$).

Висновки

1. Додавання до вмісту рубця суміші бікарбонату натрію та карбонатів кальцію і магнію підвищує целюлозолітичну ($p < 0,001$) та знижує амілолітичну активність ($p < 0,05-0,01$).

2. Додавання до вмісту рубця алкілюючої карбонатної суміші сприяє зростанню кількості білкового азоту за рахунок азоту мікроорганізмів при інкубуванні з усіма досліджуваними макухами ($p < 0,01$). Концентрація аміаку при цьому зменшується, що пов'язано з більшим його використання для синтезу мікробного протеїну ($p < 0,05-0,01$).

3. Карбонатна суміш зменшує концентрацію лактату у вмісті рубця ($p < 0,05-0,01$), інкубованому з досліджуваними макухами, що узгоджується із зниженням у ньому амілолітичної активності.

4. Додавання до вмісту рубця макухи посилює у ньому гідроліз триацилгліцеролів ($p < 0,05-0,01$).

Перспективи подальших досліджень. Необхідно дослідити вплив рН на ензиматичні процеси у рубці за різної розщеплюваності протеїну раціону.

1. Nutrient Requirements of Dairy Cattle Washington, DC, USA : National Academic Press, 2001, 408 p.

2. McCormick M. E., Redfearn D. D., Ward J. D., Blouin D. C. Effect of protein source and soluble carbohydrate addition on rumen fermentation and lactation performance of Holstein cows. *J. Dairy Sci.*, 2001, Vol. 84, P. 1686–1697 (in Ukrainian).

3. Drackley J. K., Drackley J. K., Donkin S. S., Reynolds C. K. Major advances in fundamental dairy cattle nutrition. *J. Dairy Sci.*, 2006, Vol. 89, P. 1324–1336.

4. Vudmaska I. V., Golubets O. V., Tkach I. M., Nevostrujeva I. V. Fatty acids metabolism in the rumen of cows fed diets with different carbohydrates ratios. *The Animal Biology*, 2007, Vol. 9, № 1–2, P. 156–161.

5. Eastridge M. L. Major advances in applied dairy cattle nutrition. *J. Dairy Sci.*, 2006, Vol. 89, № 4, P. 1311–1323.

6. Vudmaska I. V. Fats in nutrition of high-yielding cows. *Animal Husbandry of Ukraine*. 2006, № 9, P. 24–27 (in Ukrainian).

7. Offer N. W., Marsden M., Phipps R. H. Effect of oil supplementation of a diet containing a high concentration of starch on levels of trans fatty acids and conjugated linoleic acids in bovine milk. *Anim. Sci.*, 2001, Vol. 73, P. 533–540.

8. Seymour W. M., Campbell D. R., Johnson Z. B. Relationships between rumen volatile fatty acid concentrations and milk production in dairy cows: a literature study. *Animal Feed Science and Technology*, 2005, Vol. 119, P. 155–169.

9. Khorasani G. R., Kennelly J. J. Influence of carbohydrate source and buffer on rumen fermentation characteristics, milk yield, and milk composition in late-lactation holstein cows. *J. Dairy Sci.* 2001, Vol. 84, P. 1707–1716.

10. Beam T. M., Jenkins T. C., Moate P. J., Kohn R. A., Palmquist D. L. Effects of amount and source of fat on the rates of lipolysis and biohydrogenation of fatty acids in ruminal contents. *J. Dairy Sci.*, 2000, Vol. 83, P. 2564–2573.

11. An J. K., Kang C. W., Izumi Y. Effects of dietary fat sources on occurrences of conjugated linoleic acid and trans fatty acids in rumen contents. *Asian-Australasian Journal of Animal Sci.*, 2003, Vol. 16, P. 222–226.

12. Calsamiglia S., Busquet M., Cardozo P. W., Castillejos L., Ferret A. Invited Review: Essential Oils as Modifiers of Rumen Microbial Fermentation. *J. Dairy Sci.*, 2007, Vol. 90, P. 2580–2595.

13. Kennelly J. J., Robinson B., Khorasani G. R. Influence of carbohydrate source and buffer on rumen fermentation characteristics, milk yield, and milk composition in early-lactation holstein cows. *J. Dairy Sci.*, 1999, Vol. 82, P. 2486–2496.

14. Khorasani G. R., Kennelly J. J. Effect of Added Dietary Fat on performance, rumen characteristics, and plasma metabolites of midlactation dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 1998, Vol. 81, P. 2459–2468.

15. Vlizlo V. V., Fedoruk R. S., Ratych I. B. et al. Laboratory methods of investigation in biology, stock-breeding and veterinary : Reference book ; Edited by V. V. Vlizlo. Lviv : SPOLOM, 2012, 764 p. (in Ukrainian).

