

ФЕРМЕНТАЦІЙНІ СПЕКТРИ У СЛІПІЙ КИШЦІ ДОРΟΣЛИХ ДОМАШНІХ КРОЛІВ І ДИКИХ ЗАЙЦІВ

М. Мароунек^{1, 3}, доктор наук, професор

Д. Міста², PhD

З. Волєк¹, PhD

О.Г. Савка³, PhD

Л.Г. Калачнюк⁴, доктор біологічних наук

Г.І. Калачнюк⁴, доктор біологічних наук, професор

¹Інститут тваринництва, Чеська Республіка

²Вроцлавський університет наук про життя, Польща

³Інститут фізіології і генетики, Чеська академія наук,

Чеська Республіка

⁴Національний університет біоресурсів

і природокористування України, Україна

Встановлено, що кролі та зайці, незважаючи на їх морфологічну схожість і подібний тип травлення, вирізняються спектром кінцевих продуктів бродіння у сліпій кишці. Концентрації загального вмісту летких жирних кислот були вищими, а аміаку – нижчими у сліпій кишці кролів ніж у зайців ($98,9 \pm 18,1$ і $20,7 \pm 8,0$ ммоль/л проти $46,8 \pm 14,0$ і $33,4 \pm 12,5$ ммоль/л відповідно). У сліпій кишці кролів мікроорганізми продукують більше ацетату ($66,4 \pm 3,3$ ммоль/л) і бутирату ($19,5 \pm 3,1$ ммоль/л), ніж пропіонату ($10,1 \pm 2,9$ ммоль/л). Відповідні ж концентрації ацетату, бутирату і пропіонату у зайців були $28,4 \pm 1,8$, $5,5 \pm 1,9$ і $8,7 \pm 1,0$ ммоль/л. Ці результати підтверджувалися в експериментах *in vitro*. У сліпій кишці кроля культуральна ферментація супроводжувалася чималим викидом метану ($15,3 \pm 2,2$ ммоль/л), а у зайців виявлено тільки слідові кількості метану ($0,1$ ммоль/л). За розрахунками метаболічного відновлення водню можна припустити, що відновний ацетогенез існує у сліпій кишці обох видів тварин. Отже, у кролів цекальна ферментація *in vitro* супроводжується чималим вивільненням метану, в той час, як у зайців він продукується в дуже незначній кількості.

Кролик, заєць, сліпа кишка, ферментація, амоній, метан.

Кролі (*Oryctolagus cuniculus*) і зайці (*Lepus europaeus*) – середніх розмірів травоядні тварини зі схожими морфологічними характеристиками. Вони належать до ряду зайцеподібні (*Lagomorpha*). У природному середовищі раціони зайця і кроля є подібними. В обох видів сліпа кишка є основним місцем збереження перетравлення і мікробної ферментації.

Кролі і зайці практикують цекотрофагію, тобто вони виробляють два типи фекалій, м'які і жорсткі, і поїдають тільки м'які. Кролі – одомашнені тварини. Зайці живуть на волі, але подекуди їх селекціонують у Європі. Нині зовсім мало проведено порівняльних досліджень харчування кролів і зайців. Куйджпі і співавтори [8] вивчали відгодівлю кролів і зайців згідно з раціонами із діапазоном вмісту волокна. Засвоюваність сухої речовини не вирізнялася, але засвоюваність Нітрогену була нижчою у зайців, ніж у кролів, можливо, через те, що зайці продукують меншу кількість м'яких фекалій. Шлунок і сліпа кишка є вірогідно меншими у зайців (як частка від маси тіла) ніж у кролів, а саме: у зайця – $2,53 \pm 0,72$ % і $4,97 \pm 1,49$ % відповідно і у кроля – $5,09 \pm 1,38$ % і $6,79 \pm 1,87$ % відповідно [12]. Тварини обох видів помірно перетравлюють полісахариди клітинних стінок, хоча перетравність геміцелюлози була вірогідно вищою у кроля, тобто $29,7 \pm 4,5$ % в зайця і $39,3 \pm 12,5$ % у кроля.

Спектр цекальної ферментації у кролів є добре відомим. Мікроорганізми сліпої кишки кролів продукують леткі жирні кислоти (ЛЖК) у співвідношенні 60–80 моль ацетату, 8–20 моль бутирату і 3–10 моль пропіонату на 100 моль ЛЖК [5]. Ацетат утворюється завдяки: гліколізу і синтезу з CO_2 і H_2 . Продукція бутирату в кролів є вищою за утворення пропіонату. Кролі вирізняються майже від усіх травоядних тварин, включаючи і жуйних, в яких у рубці продукується більше пропіонату ніж бутирату.

Мета дослідження – розширення знань з фізіології травлення зайцеподібних. Визначалися як концентрація метаболітів сліпої кишки у кролів і зайців, так і продукція метаболітів у культурах їх цекального вмістимого. За експериментів неможливо було утримувати кролів на однакових раціонах через спорадичність їх розведення.

Матеріали і методи. Кролям давали вволю сухі корми, що містили муку люцерни, пшеничні висівки, соняшниковий шрот і овес як основні інгредієнти (табл. 1). Вісім кролів утримували індивідуально в клітках і вбивали о 9:00 ранку у віці 11 тижнів. Вмістиме сліпої кишки видавлювали і використовували для (1) аналізу метаболітів із сліпої кишки, і (2) для висіву культур *in vitro*. Вмістиме сліпої кишки відразу ж заморожували або ж розводили фосфатбікарбонатим буфером (1:4) [2]. Культури вмістимого сліпої кишки інкубували в колбах (320 мл) за 39°C протягом 8 годин. Через колби пропускали CO_2 і герметично закривали гумовими корками; рН, значення якого було близько 7 на початку інкубації, знижувалося на 0,7 за час інкубування. Зразки поверхневого газу відбирали у кінці експерименту тоді, коли колби відкривали, а ферментацію зупиняли додаванням HgCl_2 .

Вмістиме сліпої кишки зайців отримували в листопаді з восьми тварин (масою 3,3–4,5 кг), що жили у природному середовищі. Тварин відловлювали до полудня м'якою сіткою завдовжки 400 м та вбивали у другій половині дня. Зразки вмісту сліпої кишки відбирали для аналізу й інкубації *in vitro*, як описано вище.

1. Інгрєдїєнти і хїмїчний склад раціону кролів

Інгрєдїєнти	%	Хїмїчний склад	г/кг
Мука люцерни	28	Суха речовина	907
Соняшниковий шрот	19	Сирий протеїн	169
Пшеничні висївки	24	NDF	378
Жом цукрового буряка	4	ADF	224
Овес	13	ADL	56
Ячмїнь	7	Пектини	50
Рїпакова олія	2	Фруктани	7
Вїтамїнна добавка	1	Крохмаль	130
Дикальційфосфат	0,5	Жир	45
Вапняк	1	Енергія перетравлення (МДж/кг)	10,2
Сїль	0,5		

^aНа 1 кг добавки: вїтамїн А – 1 200 000 МО; вїтамїн D₃ – 200 000 МО; вїтамїн Е – 5 г; вїтамїн К₃ – 0,2 г; вїтамїн В₁ – 0,3 г; вїтамїн В₂ – 0,7 г; вїтамїн В₆ – 0,4 г; нїацинамїд – 5 г; Са - пантотеат – 2 г; фолїєва кислота – 0,17 г; бїотин – 20 мг; вїтамїн В₁₂ – 2 мг; холїн – 60 г; лїзїн – 25 г; DL–метїонїн – 100 г.

Вільний поверхневий газ аналізували на газовому хроматографї з детектором теплопровідності. Загальні ЛЖК визначали титруванням після перегонки з водяною парою (парової дистиляції). Їх молярний склад визначали на газовому хроматографї з використанням колонки з Chromosorb WAW з 15 % SP 1220/1 % Н₃РO₄ (Supelco). Амїак визначали колориметрично з реагентом Неслера в одиницях Конвей. Метаболїчний баланс водню розраховували вїдповїдно до Дїмейера [3]. Інші аналізи проводили, як описано ранїше [10]; *t*-тест використовували для визначення мїж кролями і зайцями вїдмїнностей за експериментальними даними, що були статистично вїрогідними.

Результати дослідження та їх аналіз. Концентрації ЛЖК (98,9 ммоль/л, в середньому) слїпої кишки кролів були вищими за середнє значення цього показника у здорових кролів [9] та наближеними до його бїльшого значення [4]. Експериментальні данї з дослідження зразків вмістимого слїпої кишки зайців свїдчили, що концентрація ЛЖК, молярні частки ацетату і бутирату нижчі та молярний вїдсоток пропїонату вищий за значення таких же показникїв у кролів ($P < 0,001$; рис. 1). Напротивагу одержаним результатам досліджень на кролях, цекальні мїкроорганїзми зайців продукували бїльше інших кислот (валерїату, капроату й їзокислот) та амонїю (рис. 1), що пїдтверджувалося експериментальними даними *in vitro* (рис. 3, 4). Висока концентрація амїаку і низька концентрація ЛЖК свїдчать про нестачу ферментованого субстрату у слїпїй кишцї зайців. Характерним винятком слїд вважати вїдсутність метану у зайців: тїльки 0,09–1,6 мл/л поверхневого газу. Продукція метану є важливим шляхом витрат водню у жуйних тварин і, меншою мїрою, також у дорослих кролів.

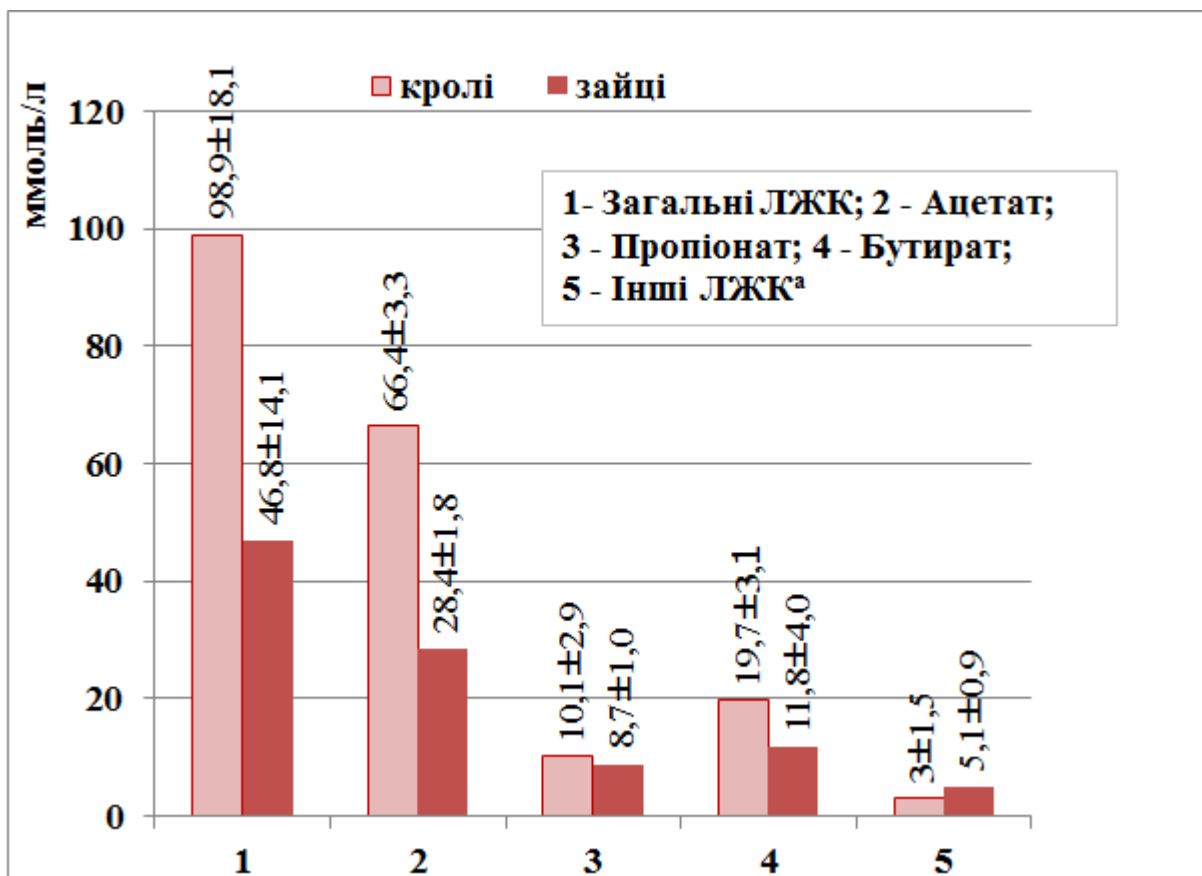


Рис. 1 Цекальні леткі жирні кислоти у восьми кролів і восьми зайців (середні значення ± SD; P < 0,001). ^аВалеріат, капроат і ізокислоти

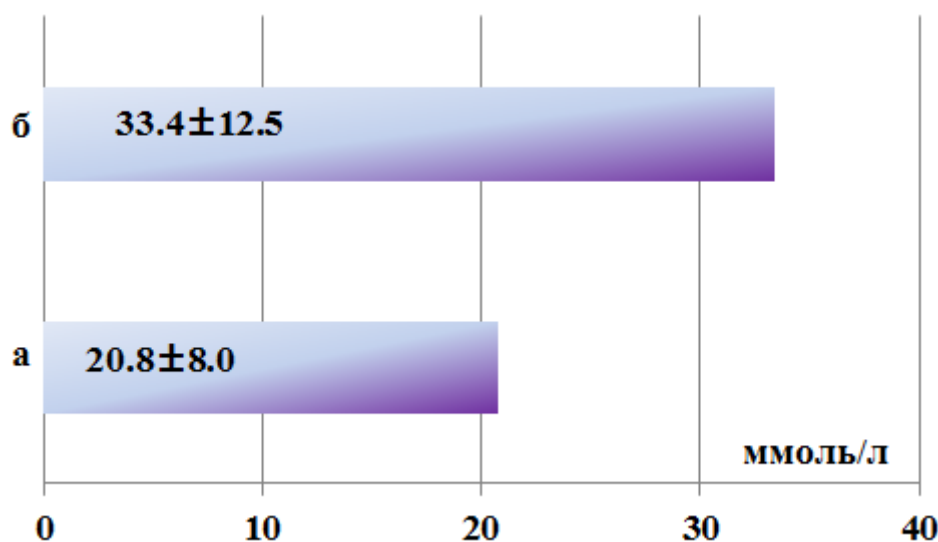


Рис. 2. Концентрація амонію (ммоль/л) у сліпій кишці кролів (а) і зайців (б) (середні значення ± SD; P=0,030)

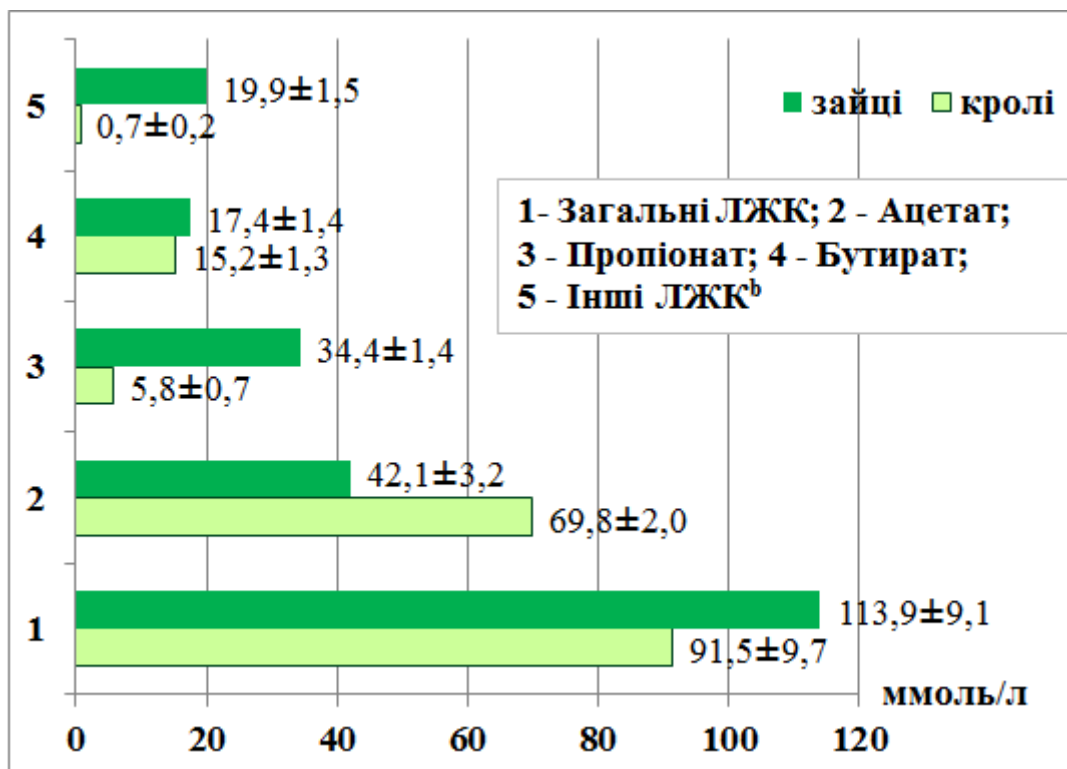


Рис. 3. Продукція летких жирних кислот у культурах^a цекального вмістимого кролів і зайців (середнє значення ± SD; для 1, 2, 3, 5 – P<0,001; для 4 – P=0,006). ^a8 год – інкубація; ^bвалеріат, капроат і ізокислот

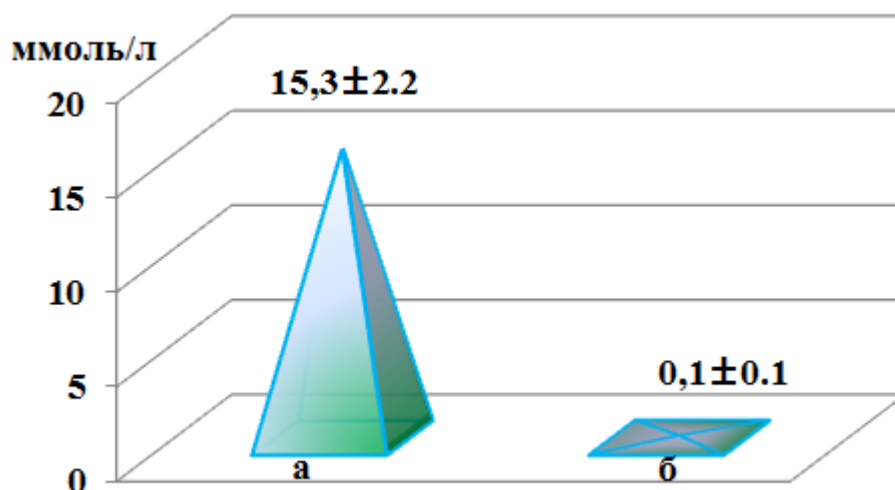


Рис. 4. Продукція метану (ммоль/л) мікроорганізмами сліпої кишки кролів (а) і зайців (б) протягом інкубації (8 год) *in vitro*. (середні величини ± SD; P< 0,001)

Альтернативними шляхами для витрат H₂ у травному тракті є відновний ацетогенез і відновлення сульфатів. Метаболічне відновлення водню в культурах сліпої кишки кроля й зайця становило 50 і 55 %, відповідно. Це свідчить про те, що відновний ацетогенез (синтез ацетату з

CO₂ і H₂) – інший шлях витрат водню у сліпій кишці обох видів тварин. Молекулярний H₂ не був виявлений на газовому хроматографі. Присутність метаногенних бактерій у бродильній частині травного тракту тварин, насамперед, залежить від анаеробіозу та наявності CO₂ і H₂ чи форміату. У жуйних тварин метаногенез є основним шляхом витрат водню, тоді як у тварин з однокамерним шлунком процеси метаногенезу та відновного ацетогенезу відбуваються разом. Чинники впливу на розподіл H₂ між метаногенезом і ацетогенезом є не цілком зрозумілими. Метаногени, можливо, є чутливими до жовчних кислот, які можуть бути присутніми у сліпій кишці, але не в рубці [7]. Беленгю і співавтори [1] свідчили, що утворення метану, визначеного *in vivo* за допомогою використання дихальної камери було нижчим за продукцію метану, яка спостерігалася *in vitro*, що, ймовірно, пов'язано з менш сприятливим рН середовища (5,85–6,17 проти 6,66–6,75). Крім того, тільки деякі кролі демонстрували добру продукцію метану. Рассел [11] свідчив, що продукція метану в рубці різко знижувалася при рН нижче 6,3. Гекстейн і ван Ален [6] зауважили, що у різних видів тварин наявність метаногенезу змінювалася і була непередбачуваною.

Висновки

Неповне метаболічне відновлення гідрогену наштовхує на думку, що відновний ацетогенез існує в сліпій кишці обох видів тварин. Однак за аналізом ферментації ці два види тварин були різними. Цекальні мікроорганізми кроля продукували більше бутирату, ніж пропіонату, тоді як у зайців було навпаки: продукувалося більше пропіонату ніж бутирату. У кролів цекальна ферментація *in vitro* супроводжувалася вірогідним вивільненням метану. У зайців утворювалися тільки слідові його кількості.

Ці дослідження були підтримані дослідницькими проектами інституту AVOZ 5045 0515 і MZe 0002701404. Попередні результати подано як стендова доповідь на Світовому конгресі з кролівництва у Шарм-ель-Шейксі (Єгипет) 3.9. – 6.9. 2012.

Список літератури

1. Methanogenesis in rabbit caecum as affected by the fermentation pattern: *in vitro* and *in vivo* measurements / [Belenguer A., Fondevila M., Balcells J., Abecia L., Lachica M., Carro M.D.] // World Rabbit Sci. – 2011. – Vol. 19. – P. 75–83.
2. Preliminary observations upon factors influencing cellulose digestion by rumen micro-organisms / W.N.Burroughs, A.Frank, P.Gerlaugh, R.M.Bethke // J. Nutr. – 1950. – Vol. 40. – P. 9–24.
3. Demeyer D.I. Quantitative aspects of microbial metabolism in the rumen and hindgut / D.I.Demeyer // In: Jouany J. –P. (Ed.). Rumen Microbial Metabolism and Ruminant Digestion. EditINRA. – Paris, 1991. – P. 217–237.
4. Identification of the main factors that influence caecal fermentation traits in growing rabbits / J.García, T.Gidenne, C.Falcao-e-Cunha, C.de Blas // Anim. Res. – 2002. – Vol. 51. – P.165–173.
5. Gidenne T. Nutritional and ontogenic factors affecting the rabbit caecocolic digestive physiology / T.Gidenne // In: Lebas F. (Ed.). Proceedings of the 6th

World Rabbit Congress, Vol. 1. Association Française de Cuniculture, Lempdes, 1996. – P.13–28.

6. Hackstein J.H.P. Fecal methanogens and vertebrate evolution / J.H.P.Hackstein, T.A. van Alen // Evolution. – 1996. – Vol. 50. – P.559–572.

7. Jezierny D. In vitro gas formation and fermentation parameters using different substrates and pig caecal inocula affected by bile extract / D.Jezierny, H.Steingass, W.Drochner // Livest. Sci. – 2007. – Vol. 109. – P.145–148.

8. Kuijper D.P.J. Digestive strategies in two sympatrically occurring lagomorphs / D.P.J.Kuijper, S.E. van Wieren, J.P.Bakker // J. Zool. – 2004. – Vol. 264. – P.171–178.

9. Nutrition and pathology / [Lebas F., Gidenne T., Perez J.M., Licois D.] // In: de Blas C., Wiseman J. (Ed). The Nutrition of the Rabbit. CABI Publishing, Wallingford, 1998. – P.197–213.

10. Digestive organs, caecal metabolites and fermentation pattern in coypus (*Myocastor coypus*) and rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) / M.Marounek, M.Skřivan, P.Březina, I.Hoza // Acta Vet.Brno. – 2005. – Vol. 74. – P.3–7.

11. Russell J.B. The importance of pH in the regulation of ruminal acetate to propionate ratio and methane production in vitro / J.B.Russell // J. Dairy Sci. – 1998. – Vol. 81. – P.3222–3230.

12. Stott P. Comparisons of digestive function between the European hare (*Lepus europaeus*) and the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*): Mastication, gut passage, and digestibility / P.Stott // Mammal. Biol. – 2008. – Vol. 73. – P.276–286.

Установлено, что кролики и зайцы, невзирая на их морфологическое сходство и подобный тип пищеварения, отличаются спектром конечных продуктов брожения в слепой кишке. Концентрации общего содержания летучих жирных кислот были выше, а аммиака – ниже в слепой кишке кроликов, чем у зайцев (98,9±18,1 и 20,7±8,0 ммоль/л против 46,8±14,0 и 33,4±12,5 ммоль/л соответственно). В слепой кишке кроликов микроорганизмы продуцируют больше ацетата (66,4±3,3 ммоль/л) и бутирата (19,5±3,1 ммоль/л), чем пропионата (10,1±2,9 ммоль/л). Соответственные же концентрации ацетата, бутирата и пропионата у зайцев были 28,4±1,8, 5,5±1,9 и 8,7±1,0 ммоль/л. Эти результаты подтвердились в экспериментах in vitro. В слепой кишке кролика культуральная ферментация сопровождалась значительным выбросом метана (15,3±2,2 ммоль/л), а у зайцев выявлены только следовые количества метана (0,1 ммоль/л). По подсчетам метаболического восстановления водорода можно предположить, что восстановительный ацетогенез существует в слепой кишке обоих видов животных. Следовательно, у кроликов цекальная ферментация in vitro сопровождается значительным освобождением метана, тогда как у зайцев он продуцируется в очень незначительных количествах.

Кролик, заяц, слепая кишка, ферментация, аммоний, метан.

Rabbits and hares, despite their morphological resemblance and similar type of digestion, differ in profile of caecal fermentation end-products. Caecal concentrations of total volatile fatty acids were higher and ammonia concentrations lower in rabbits than in hares (98,9±18.1 and 20,7±8.0 mmol/l vs 46,8±14,0 and 33,4±12,5 mmol/l, respectively). Caecal microorganisms of rabbits produced more acetate (66,4±3,3 mmol/l) and butyrate (19,5±3,1 mmol/l) than propionate (10,1± 2,9 mmol/l).

Corresponding acetate, butyrate and propionate concentrations in hares were $28,4 \pm 1,8$, $5,5 \pm 1,9$ and $8,7 \pm 1,0$ mmol/l, respectively. This finding was confirmed in in vitro experiment. In rabbit caecal cultures fermentation was accompanied with a significant methane release ($15,3 \pm 2,2$ mmol/l). In hares only traces of methane were produced ($0,1$ mmol/l). Calculations of metabolic hydrogen recovery suggest that reductive acetogenesis (an alternative electron sink) exists in caeca of both animal species. Thus, in rabbits cecal fermentation in vitro is accompanied by significant release of methane, while in hares it is produced in very small quantities.

Rabbit, hare, caecum, fermentation, ammonium, methane.