

*РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ НАУК*

ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ  
ФИЗИОЛОГИИ, БИОХИМИИ И ПИТАНИЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ  
ЖИВОТНЫХ

**ТРУДЫ**

**ВСЕРОССИЙСКОГО  
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ИНСТИТУТА  
ФИЗИОЛОГИИ, БИОХИМИИ И ПИТАНИЯ  
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ**

*Том XLVI*

Боровск, 2007

*РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ НАУК*

ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ  
ФИЗИОЛОГИИ, БИОХИМИИ И ПИТАНИЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ  
ЖИВОТНЫХ

**ТРУДЫ**

**ВСЕРОССИЙСКОГО  
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ИНСТИТУТА  
ФИЗИОЛОГИИ, БИОХИМИИ И ПИТАНИЯ  
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ**

*Том XLVI*

*ВНИИФБиП с.-х. животных*



Боровск, 2007

УДК 636.084:577.1:579.6 : 636.082.4  
ББК 45/46+28.9  
Т 78

**Труды Всероссийского научно-исследовательского института физиологии, биохимии и питания сельскохозяйственных животных.** Сборник экспериментальных статей. Боровск, 2007, т.46, 180 с.

**Редакционная коллегия:** Матвеев В.А., Тараканов Б.В., Черепанов Г.Г.

**Адрес:** 249013 Боровск, Калужской области, ВНИИФБиП  
Телефон: (095) 996-34-15  
Факс: (08438) 4-20-88

ISBN 978 5 001656-11-3

© Коллектив авторов  
© ВНИИФБиП с.-х. животных

## СОДЕРЖАНИЕ

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Б.В. Тараканов, В.В. Алёшин, Т.А. Николичева, Н.М. Комкова, Л.Л. Полякова, А.А. Яковлева</b><br>Антагонизм и микроиногения в природных популяциях бактерий родов <i>Escherichia</i> и <i>Salmonella</i> , биология продуцентов микроинов и их влияние на формирование микробиоты кишечного тракта сельскохозяйственных животных..... | 5   |
| <b>Б. В. Тараканов, В.В. Алёшин, Т. А. Николичева, Л. Л. Полякова, А.А. Яковлева, В.Н. Никулин, Т.Е. Палагина</b><br>Клонирование генов синтеза микроина типа В и исследование сукцессии микробиоиноза кишечного тракта животных при введении природных и рекомбинантных продуцентов микроинов и бактериоинов...                        | 26  |
| <b>В.А. Галочкин, В.П. Галочкина</b><br>Неспецифическая резистентность и продуктивность откармливаемых на мясо бычков в зоне с повышенным радиационным фоном.....                                                                                                                                                                       | 52  |
| <b>Е.В. Крапивина, В.Н. Шалегин, В.А. Галочкин</b><br>Влияние скармливания препарата IFO 6 ET на функциональную активность защитных механизмов организма цыплят-бройлеров.....                                                                                                                                                          | 65  |
| <b>С.В. Максименко</b><br>Влияние арабиногалактана на продуктивность и неспецифическую резистентность телят.....                                                                                                                                                                                                                        | 73  |
| <b>З.Н. Макар, Р.И. Корнеева, М.И. Сапунов</b><br>Особенности метаболизма и молокообразования у коз при обогащении рациона протеином и пропиленгликолем.....                                                                                                                                                                            | 80  |
| <b>В.А. Матвеев, В.В. Воловников, И.А. Баранова</b><br>Функциональная активность щитовидной железы откармливаемых бычков холмогорской породы при введении в рацион пропиленгликоля..                                                                                                                                                    | 89  |
| <b>В.П. Галочкина, С.В. Максименко, В.А. Галочкин.</b><br>Влияние пропиленгликоля на процесс глюконеогенеза и интенсивность роста бычков.....                                                                                                                                                                                           | 98  |
| <b>В.Ф. Сухих, С.В. Максименко</b><br>Неспецифическая резистентность организма интенсивно растущих бычков при стимулировании углеводного обмена.....                                                                                                                                                                                    | 107 |
| <b>В.И. Дудин, Т.Е. Рябых</b><br>Тестирование обеспеченности витаминами бычков при различных уровнях пропиленгликоля в рационе.....                                                                                                                                                                                                     | 113 |

|                                                                                                                                                                                                                                |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Е.В. Швакель</b><br>Участие бета-аминокислот в азотистом питании лактирующих коров...                                                                                                                                       | 121 |
| <b>Н.В. Штенцель</b><br>Обеспеченность молочных коров аргинином в разгар лактации.....                                                                                                                                         | 129 |
| <b>В.И. Дудин, Т.Е. Рябых</b><br>Обеспеченность организма свиней витаминами А,Е,В <sub>1</sub> и В <sub>2</sub> при скормливании им низкопротеиновых рационов, сбалансированных за счет добавок синтетических аминокислот..... | 135 |
| <b>А.А. Алиев, З.М. Алиева</b><br>Внешнесекреторные функции печени и поджелудочной железы и спермопродукция у быков-производителей при различных условиях кормления.....                                                       | 141 |
| <b>С.В. Грищук, В.И. Дудин</b><br>Определение активности каталазы цельной крови для доклинического тестирования здоровья свиней.....                                                                                           | 149 |
| <b>В.Б. Решетов</b><br>Закономерности изменения энергетического обмена у коров при повышении уровня питания и молочной продуктивности.....                                                                                     | 159 |
| <b>В.И. Агафонов, В.Б. Решетов, Р.А. Волобуева, В.В. Михайлов</b><br>Использование фонда субстратов в сбалансированных рационах для обеспечения энергетического обмена и синтеза компонентов молока у лактирующих коров.....   | 170 |

**АНТАГОНИЗМ И МИКРОЦИНОГЕНИЯ  
В ПРИРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ БАКТЕРИЙ РОДОВ  
ESCHERICHIA И SALMONELLA, БИОЛОГИЯ ПРОДУЦЕНТОВ  
МИКРОЦИНОВ И ИХ ВЛИЯНИЕ НА ФОРМИРОВАНИЕ  
МИКРОБИОТЫ КИШЕЧНОГО ТРАКТА  
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ**

*Тараканов Б.В., Алешин В.В., Николичева Т.А.,  
Комкова Н.М., Полякова Л.Л., Яковлева А.А.<sup>1</sup>*

ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии,  
биохимии и питания сельскохозяйственных животных РАСХН (г. Боровск)  
<sup>1</sup>НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ (г. Москва)

*У крупного рогатого скота, свиней и птицы в кишечных популяциях бактерий родов Escherichia и Salmonella до 7,8-33,3% и 6,8-16,7% соответственно проявляют антагонистическую активность, тогда как продуценты микроцинов сравнительно редки. Выделено три продуцента микроцинов и изучены их биологические свойства. Показано, что штаммы E.coli S 5/98 и S 6/98 образуют микроцины типа В, тогда как антибиотик штамма E.coli B 214/99 подавляет рост продуцентов микроцинов С и В типов и принадлежит к иному типу. Установлено, что микроциногенные штаммы E.coli B 214/99 и S 5/98 оказывают регулирующее влияние на кишечную микрофлору, ограничивают размножение в пищеварительном тракте эшерихий и сальмонелл и, следовательно, снижают риск заболеваний молодняка колибактериозом и сальмонеллезом. При этом кишечная популяция антагонистических эшерихий остается высокочувствительной к микроцинам, но в ней увеличивается доля штаммов, образующих антибиотические вещества, подавляющие рост продуцентов микроцинов. При обильном молочном кормлении задаваемые микроциногенные штаммы эшерихий персистируют в кишечнике телят до 3-месячного возраста не более 1 сут, тогда как у животных 9-месячного возраста они сохраняются до 15 сут.*

**Введение**

В 1976 году группой испанских исследователей было обнаружено, что клетки энтеробактерий, кроме бактериоцинов, могут синтезировать антибиотические вещества иной природы (Asensio et al., 1976). Эти антибиотики получили название микроцинов. Микроцины – гетерогенная по природе и структуре молекул группа низкомолекулярных антибиотиков, детерминированных плазмидами. Они выделяются в среду и подавляют рост различных видов грамотрицательных бактерий кишечной микрофлоры (*Escherichia*, *Salmonella*,

*Shigella*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Pseudomonas* и др.), которые нередко вызывают тяжелые заболевания животных.

В настоящее время выделено несколько типов микроцинов, изучена их структура и механизм действия, ведутся работы по генетическому контролю синтеза микроцинов и исследуется роль этих субстанций в экологии кишечных бактерий. Широкий спектр антагонистической активности микроцинов дает основание полагать о перспективности применения их продуцентов для профилактики и лечения кишечных инфекций у молодняка животных и птицы. Однако в настоящее время предложен пока только один пробиотик «Ромакол», разработанный на основе *E. coli* M17(p74) и продуцирующий микроцин C51 (Соколова и др., 1991; Хмель и др., 1993). В этой связи поиск новых штаммов, продуцирующих микроцины, представляется актуальным.

Исходя из вышеизложенного, целью первого этапа работы было выделение из пищеварительного тракта животных и птицы продуцентов микроцинов и исследование биологии у этих штаммов.

### Результаты и обсуждение

*Антагонизм и микроциногенность в природных популяциях бактерий родов Escherichia и Salmonella пищеварительного тракта животных и птицы.* Выделение эшерихий и сальмонелл проводили из фекалий крупного рогатого скота, свиней и кошек, а также из содержимого зоба и слепых отростков кишечника цыплят-бройлеров на селективных средах Эндо и висмутсульфит агаре общепринятыми методами. Всего было выделено и использовано в исследованиях 484 штамма эшерихий и 223 штамма сальмонелл.

Проверка выделенных культур на антагонизм показала, что среди кишечных популяций эшерихий и сальмонелл крупного рогатого скота, свиней и цыплят-бройлеров антагонистическую активность проявляли 7,8; 23,4; 33,3% и 11,9; 6,8 и 16,7% штаммов соответственно, тогда как образование микроцинов наблюдалось лишь у трех культур эшерихий и одного штамма сальмонелл (табл. 1). Из этих результатов очевидно, что в кишечных популяциях эшерихий и сальмонелл здоровых животных способность продуцировать микроцины встречается сравнительно редко. Эти наши данные в известной степени согласуются с результатами исследований Хмель с соавт. (1993), которые обнаружили изоляты, образующие микроцины, в среднем у одного из 20 исследованных людей, от каждого из которых обычно анализировали 150-200 изолятов кишечных бактерий, и противоречат данным Asensio с соавт. (1976), которые пришли к выводу, что продуценты микроцинов составляют до 10-15% всех изолятов энтеробактерий, выделенных из фекалий новорожденных детей.

**Таблица 1. Частота встречаемости антагонистических и микроциногенных штаммов в популяциях бактерий родов *Escherichia* и *Salmonella* кишечника животных и птицы**

| Показатель                          | <i>Escherichia</i> sp. |        |                  | <i>Salmonella</i> sp. |        |                  |
|-------------------------------------|------------------------|--------|------------------|-----------------------|--------|------------------|
|                                     | крупный рогатый скот   | свиньи | цыплята-бройлеры | крупный рогатый скот  | свиньи | цыплята-бройлеры |
| Исследовано штаммов, всего          | 242                    | 158    | 24               | 67                    | 132    | 24               |
| Выявлено штаммов: антагонистических |                        |        |                  |                       |        |                  |
| всего                               | 19                     | 37     | 8                | 8                     | 9      | 4                |

|                                    |     |      |      |      |     |      |
|------------------------------------|-----|------|------|------|-----|------|
| % от исследованных микроциногенных | 7,8 | 23,4 | 33,3 | 11,9 | 6,8 | 16,7 |
| всего                              | 1   | 2    | 0    | 0    | 0   | 1    |
| % от исследованных                 | 0,4 | 1,3  | 0    | 0    | 0   | 4,2  |
| % от антагонистических             | 5,3 | 5,4  | 0    | 0    | 0   | 25   |

По мнению Хмель и соавт. (Khmel et al., 1987), испанские авторы ошибочно принимали за микроцин валин (или его производное), который по данным отечественных исследователей выделяется в среду у 10-15% изолятов энтеробактерий в количестве, достаточном для подавления роста клеток индикаторного штамма *E.coli* K-12. На бактерии других штаммов *E.coli* и других видов семейства Enterobacteriaceae валин ингибирующего действия не оказывает.

Синтез микроцинов у всех выделенных нами продуцентов происходил на триптозном агаре (полном, половинном и четвертном), тогда как на среде Хмель с дрожжевым экстрактом образовывал микроцин только сальмонеллезный штамм SP-18. Микроцины, продуцируемые штаммами *E.coli* S 5/98, S 6/98, B 71/99, B 214/99 и *Salmonella* SP-18, проходили через целлофан и это показывает, что их молекулярная масса меньше 10 кДа.

Одной из важнейших характеристик является спектр антибактериальной активности микроцинов у выделенных нами штаммов-продуцентов. Исследования, проведенные с использованием в качестве референсного микроцина C51, продуцируемого штаммом *E.coli* M17(p74), который любезно был предоставлен нам профессором И.А. Хмель, показали, что 69-84% эшерихий и 42,6% сальмонелл дикого типа, выделенных от крупного рогатого скота, подавлялись микроцинами штаммов *E.coli* S 5/98 и S 6/98 (табл.2).

**Таблица 2. Чувствительность эшерихий и сальмонелл дикого типа, выделенных от разных видов животных, к микроцинам**

| Хозяева штаммов          | Род<br>тестируемых<br>бактерий | Количество<br>исследованных<br>штаммов | Процент штаммов,<br>чувствительных к микроцинам |          |          |
|--------------------------|--------------------------------|----------------------------------------|-------------------------------------------------|----------|----------|
|                          |                                |                                        | C 51                                            | EcS 5/98 | EcS 6/98 |
| Крупный рогатый<br>скот: |                                |                                        |                                                 |          |          |
| коровы                   | <i>Escherichia</i>             | 200                                    | н                                               | 84       | н        |
|                          | <i>Salmonella</i>              | 47                                     | н                                               | 42,6     | н        |
| бычки                    | <i>Escherichia</i>             | 84                                     | н                                               | 69       | 69       |
| Свиньи                   | <i>Escherichia</i>             | 50                                     | 52                                              | 90       | 90       |
|                          | <i>Salmonella</i>              | 30                                     | 50                                              | 80       | 80       |
| Цыплята-бройлеры         |                                |                                        |                                                 |          |          |
|                          | <i>Escherichia</i>             | 17                                     | 88,2                                            | 82,3     | 82,3     |
|                          | <i>Salmonella</i>              | 23                                     | 56,5                                            | 56,5     | 56,5     |
| Кошки                    | <i>Escherichia</i>             | 100                                    | 100                                             | 99       | 99       |

Примечание: н – не исследовали

Среди кишечных и паратифозных палочек, изолированных из фекалий свиней, чувствительными к микроцину C51 оказалось 52 и 50% штаммов, тогда как микроцины EcS 5/98 и EcS 6/98 подавляли 90% и 80% штаммов соответственно. Микроцин C51 ингибировал несколько больше штаммов эшерихий, полученных из кишечника цыплят, а кишечные палочки, изолированные из фекалий кошек, практически все подавлялись изученными микроцинами. Интересным представляется и тот факт, что выделенные нами продуценты

микроцинов ингибировали и использованные в качестве индикаторов колициногенные штаммы эшерихий (табл.3), а также разные виды сальмонелл и один штамм клебсиелл. Представители родов *Proteus*, *Providencia* и *Staphylococcus* оказались устойчивыми к изучаемым микроцинам (табл. 4).

**Таблица 3. Чувствительность колициногенных штаммов эшерихий дикого типа к микроцинам**

| Колициногенные штаммы эшерихий | Диаметр (мм) зоны подавления роста микроцином |          |          |            |
|--------------------------------|-----------------------------------------------|----------|----------|------------|
|                                | С 51                                          | EcS 5/98 | EcS 6/98 | EcB 214/99 |
| EcS 12/98                      | 24                                            | 14       | 15       | 13         |
| EcS 21/98                      | 22                                            | 15       | 17       | 15         |
| EcS 80/98                      | 17                                            | 26       | 23       | 21         |
| EcS 106/98                     | -                                             | 9        | 1,5      | 1,5        |
| EcS 107/98                     | -                                             | 1,5      | 1,5      | 9          |
| EcS 113/98                     | 29                                            | 20       | 22       | 20         |
| EcS 116/98                     | 23                                            | 19       | 19       | 18         |
| EcS 118/98                     | 15                                            | 23       | 16       | 22         |
| EcB 71/99                      | 14                                            | 16       | 12       | 19         |
| EcB 208/99                     | 30                                            | 34       | 25       | 28         |
| EcB 219/99                     | 22                                            | 20       | 21       | 20         |
| EcB 273/99                     | 21                                            | 16       | 15       | 15         |
| EcB 274/99                     | -                                             | 20       | -        | 22         |
| EcB 298/99                     | 32                                            | 15       | 19       | 14         |
| EcB 303/99                     | 17                                            | 19       | 13       | 17         |
| EcB 305/99                     | 35                                            | 17       | 20       | 15         |
| EcB 307/99                     | 30                                            | 17       | 15       | 15         |
| EcB 309/99                     | 30                                            | 18       | 15       | 16         |
| EcB 316/99                     | 24                                            | 17       | 15       | 13         |
| EcB 317/99                     | 15                                            | 18       | 12       | 16         |
| EcB 319/99                     | 28                                            | 14       | 16       | 15         |
| EcP-19                         | -                                             | 17       | 17       | 15         |
| EcP-21                         | 14                                            | 17       | 17       | 18         |
| EcP-23                         | 16                                            | 15       | 13       | 15         |
| EcP-24                         | 22                                            | 17       | 17       | 15         |

Примечание: – зона подавления роста индикаторного штамма микроцином отсутствовала

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что изолированные нами штаммы кишечной палочки *E.coli* S 5/98, S 6/98 и B 214/99 продуцируют микроцины с широким спектром антибактериальной активности и не уступают или превосходят таковой у известного микроцина С51. При этом микроцины оказывают одинаково сильное действие как на штаммы дикого типа, так и на частично охарактеризованные продуценты колицинов, которые были выделены нами при скрининге эшерихий на микроцины. Эти данные дают основание предполагать, что продуцирующие микроцины штаммы *E.coli* S 5/98, S 6/98 и B 214/99 послужат надежной основой в расшифровке сложных взаимодействий между различными родами кишечных бактерий и при создании пробиотиков нового поколения.

**Таблица 4. Антибактериальная активность штаммов-продуцентов микроцинов**

| Тест-культуры*                              | Диаметр (мм) зоны подавления роста штаммом |                |                |                |
|---------------------------------------------|--------------------------------------------|----------------|----------------|----------------|
|                                             | <i>E. coli</i>                             | <i>E. coli</i> | <i>E. coli</i> | <i>E. coli</i> |
|                                             | M17 (p74)                                  | S 5/98         | S 6/98         | B 214/99       |
| <i>Salmonella heidelberg</i> 287            | + 16                                       | -              | -              | -              |
| <i>Sal. stanley</i> 5716                    | +22                                        | -              | -              | -              |
| <i>Sal. kirkee</i>                          | +21                                        | -              | -              | -              |
| <i>Sal. give</i>                            | +30                                        | +12            | +10            | +10            |
| <i>Sal. bovis morbipicans</i> 988           | +29                                        | +8             | +8             | +8             |
| <i>Sal. dublin</i> 42                       | +28                                        | +              | -              | -              |
| <i>Sal. london</i> 1446                     | +36                                        | +17            | +17            | +16            |
| <i>Sal. gaminare</i>                        | +30                                        | +11            | +13            | +11            |
| <i>Sal. utrecht</i>                         | +22                                        | -              | -              | -              |
| <i>Sal. derby</i>                           | +21                                        | +7             | +9             | +8             |
| <i>Sal. amager</i> 2399                     | +18                                        | +8             | +8             | +10            |
| <i>Sal. sendai</i>                          | -                                          | -              | -              | -              |
| <i>Sal. rostock</i>                         | -                                          | +12            | +12            | +10            |
| <i>Sal. readiry</i>                         | +33                                        | +20            | +18            | +21            |
| <i>Sal. typhimurium</i> с колицинами E1 и J | +15                                        | -              | -              | -              |
| <i>Sal. enteritidis</i> 41997               | +18                                        | +11            | +10            | +10            |
| <i>Klebsiella sp.</i> 4140 (K-7)            | -                                          | +16            | +12            | +12            |
| <i>Escherichia coli</i> 113-3               | +28                                        | +22            | +18            | +20            |
| <i>Proteus sp.</i> 14                       | -                                          | -              | -              | -              |
| <i>Proteus sp.</i> 2091                     | -                                          | -              | -              | -              |
| <i>Providencia stuartii</i>                 | -                                          | -              | -              | -              |
| <i>Providencia alcalifaciens</i>            | -                                          | -              | -              | -              |
| <i>Staphylococcus aureus</i>                | -                                          | -              | -              | -              |
| <i>Staphylococcus saprophiticus</i>         | -                                          | -              | -              | -              |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i>           | -                                          | -              | -              | -              |

Примечание: Знаком «+» показана чувствительность тест-культур к исследуемому микроцину, знаком «-» – устойчивость; цифра указывает диаметр зоны подавления роста в мм. \*Тест-культуры получены от проф. И.А. Хмель.

*Биология энтеробактерий, продуцирующих микроцины.* Исследования показали, что изученные микроциногенные штаммы *E.coli* S 5/98, S 6/98, B 214/99, а также известный продуцент микроцина С 51 *E. coli* M17 (p74) являются палочками с закругленными концами, отрицательно окрашивающимися по Граму. На селективной среде Эндо они образуют темно-красные колонии с характерным металлическим блеском. Все культуры растут при температуре 15 и 45 °С и погибают после 30-минутной экспозиции при 60 °С. Эти штаммы толерантны к фенолу (0,6%), этанолу (2%), хорошо растут в среде с 20% желчи, а культура *E.coli* B 214/99 и в среде с 40% желчи. Они не образуют H<sub>2</sub>S, продуцируют газ из глюкозы, дают положительную реакцию с метиловым красным, но не используют ацетат и малонат в качестве источника энергии, не гидролизуют фенилаланин и мочевины и имеют отрицательную реакцию Фогеса-Проскауера. На цитратном агаре Симмонса растут только штаммы *E.coli* S 5/98 и B 214/99.

Исследование ферментативных свойств показало, что все изученные штаммы сбраживали с образованием кислоты лактозу, мальтозу, маннит, глюкозу, ксилозу, трегалозу, сорбит и не ферментировали инозит, дульцит и салицин. Арабинозу сбраживали штаммы *E. coli* M17 (p74), S 5/98, S 6/98 и не использовал штамм *E.coli* B 214/99, а сахарозу не ферментировали культуры *E.coli* S 5/98 и S 6/98.

*E. coli* M17 (p74) давала положительную реакцию с сахарозой, тогда как продукция кислоты из сахарозы у штамма *E.coli* B 214/99 была вариабельной. Таким образом, полученные данные по совокупности признаков позволяют отнести изученные штаммы к виду *Escherichia coli*.

В процессе исследований нас интересовало в какой мере отражаются условия культивирования на продукции микроцинов. С этой целью были использованы триптозный агар (ТА), LB-агар, ГРМ-агар и агаризованная минимальная среда Хмель (Khmel et al., 1981). Высев микроциногенных штаммов на эти среды показал, что на полном ТА зоны задержки роста давали только штаммы *E. coli* M17 (p74) и B 214/99. Обоedнение среды увеличивало у этих штаммов диаметры зон задержки роста с 20 до 30 мм и с 12 до 16 мм соответственно. При этом отчетливо проявились зоны задержки роста и у штаммов *E.coli* S 5/98 и S 6/98, которые при их выращивании на богатой среде отсутствовали (табл. 5).

На полном LB агаре вокруг колоний микроциногенных эшерихий зон подавления роста индикаторного штамма не наблюдалось, тогда как на четвертном LB они были отчетливо видны. На полном ГРМ-агаре микроцины продуцировали штаммы *E.coli* S 5/98 и B 214/99, а на четвертном ГРМ проявилось образование микроцинов и у штамма *E.coli* S 6/98 и увеличилась зона подавления роста индикатора у штамма *E.coli* S 5/98.

**Таблица 5. Влияние условий культивирования на продукцию микроцинов**

| Испытуемые<br>штаммы    | Среды выращивания |     |             |     |             |     | Хмель<br>с соавт. |
|-------------------------|-------------------|-----|-------------|-----|-------------|-----|-------------------|
|                         | ТА                |     | LB          |     | ГРМ         |     |                   |
|                         | пол-<br>ный       | 1/4 | пол-<br>ный | 1/4 | пол-<br>ный | 1/4 |                   |
| <i>E. coli</i> M17(p74) | +20               | +30 | -           | +25 | н           | н   | +22               |
| <i>E. coli</i> S 5/98   | -                 | +19 | -           | +14 | +15         | +17 | -                 |
| <i>E. coli</i> S 6/98   | -                 | +17 | -           | +15 | -           | +17 | -                 |
| <i>E. coli</i> B 214/99 | +12               | +16 | -           | +18 | +15         | +15 | +15               |

Примечание: + микроцины продуцируются; - микроцин не продуцируется; цифра указывает диаметр зоны задержки роста индикаторного штамма в мм; н – не исследовали

На минимальной среде Хмель (Khmel et al., 1981) с дрожжевым экстрактом и глюкозой микроцины продуцировали только штаммы *E. coli* M17(p74) и B 214/99. Полученные данные подтверждают ранее сделанные наблюдения, что обеднение среды выращивания эшерихий стимулирует у них микроцинопродукцию. Однако отсутствие продукции микроцина на минимальной среде Хмель у штаммов *E.coli* S 5/98 и S 6/98 дает основание предположить, что существуют и другие еще не идентифицированные факторы, влияющие на синтез микроцинов. Продуцируемые изученными штаммами микроцины проходили через целлофан и это показывает, что их молекулярная масса составляет ниже 10 кДа.

При изучении антибиотикорезистентности у микроциногенных эшерихий определяли устойчивость к следующим антибиотикам (мкг/диск): оксациллин-10, левомицетин-30, стрептомицин-30, гентамицин-120, рифампицин-5, неомицин-30, эритромицин-15, тетрациклин-30, канамицин-30, ванкомицин-30, клиндамицин-2, кларитромицин-15, амикацин-30. Испытывали также налидиксовую кислоту (20 мкг/мл) и фузидин (150 мкг/мл). Тестирование прове-

дено на плотной питательной среде. Антибиотические диски были отечественного производства. Исследования показали, что все они чувствительны к использованному в опытах антибиотикам. Исключение представляет штамм *E.coli* B 214/99, который проявляет устойчивость к фузидину (150 мкг/мл). Это контрастирует со множественной резистентностью к антибиотикам, свойственной многим природным неантагонистическим штаммам эшерихий. Низкое содержание детерминант устойчивости к антибиотикам в геномах штаммов-продуцентов микроцинов мы склонны связывать с компенсаторным действием микроцинов, обеспечивающих их обладателям выживание в природных микробных сообществах за счет подавления конкурентных микроорганизмов — продуцентов антибиотиков.

Чтобы получить данные о природе микроцинов, продуцируемых выделенными штаммами бактерий, было изучено действие различных протеолитических ферментов на ингибиторную активность микроцинов. При этом испытывали следующие энзимы: термоллизин – нейтральная протеаза *Bacillus thermoproteolyticus* (Serva); трипсин бычий (Serva); субтилизин Е – сериновая протеаза *Bacillus subtilis*, выделенная в лаборатории химии белка ГосНИИ генетика; металлопротеиназа *Bacillus mesentericus* (Морозова и др., 1993); протолихетрем – коммерческий препарат культуральной жидкости *Bacillus licheniformis*, содержащий щелочную протеазу типа «субтилизин Карлсберга», неохарактеризованную металлопротеиназу и глутамилэндонептидазу; проназу из *Streptomyces griseus* (Fluka). Протеолитические препараты использовали в водном растворе с концентрацией ферментов 2 мг/мл непосредственно на поверхности питательной среды. Протеолитические ферменты инактивировали микроцины, но имелись отличия в действии ферментов на микроцины разных штаммов. Так, изученные нами микроцины инактивировались проназой, протолихетремом и металлопротеиназой из *B. mesentericus*, но не инактивировались термоллизином (табл. 6). На микроцин штамма *E.coli* S 6/98 не действовал субтилизин Е и трипсин, который не инактивировал микроцины штаммов *E.coli* S 5/98 и B 214/99. Однако, делать на основании этих данных выводы о различиях микроцинов еще рано, поскольку опыты проводились не с чистыми препаратами микроцинов. Тем не менее, приведенные выше результаты показывают, что микроцины из выделенных нами штаммов являются пептидами или содержат пептиды в составе своих молекул.

В настоящее время выделено несколько типов микроцинов (Baguero, Moreno, 1984; Lavina et al., 1990; Salmon, Farias, 1992; Хмель, 1999; Хмель и др., 1999). Микроцины классифицируют прежде всего по критерию перекрестного иммунитета, т.е. устойчивости штаммов-продуцентов к действию микроцинов того же типа и чувствительности к микроцинам другого типа. Кроме того, они различаются по свойствам и структуре антибиотиков, механизмам действия и спектрам антибиотической активности (Baguero, Moreno, 1984).

**Таблица 6. Чувствительность микроцинов к протеолитическим ферментам**

| Ферменты                                    | Микроцины, продуцируемые штаммами |                      |                      |                       |
|---------------------------------------------|-----------------------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|
|                                             | <i>E.coli</i> M17 (p74)           | <i>E.coli</i> S 5/98 | <i>E.coli</i> S 6/98 | <i>E.coli</i> B214/99 |
| Термоллизин                                 | -                                 | -                    | -                    | -                     |
| Трипсин                                     | +                                 | -                    | -                    | -                     |
| Субтилизин Е                                | +                                 | +                    | -                    | +                     |
| Металлопротеиназа<br><i>B. mesentericus</i> | +                                 | +                    | +                    | +                     |

|               |   |   |   |   |
|---------------|---|---|---|---|
| Протолихетрем | + | + | + | + |
| Проназа       | + | + | + | + |

Примечание: + микроцин разрушается; - не разрушается.

Эксперименты, проведенные по изучению перекрестного иммунитета у выделенных нами продуцентов микроцинов, показали, что штаммы *E.coli* S 5/98, S 6/98 и B 214/99 продуцировали микроцины, ингибирующие штамм *E. coli* M17 (p74), который синтезирует микроцин C51, и сами оказались чувствительными к последнему, т. е. синтезируемые ими микроцины не принадлежат к типу С (табл. 7). Штаммы *E.coli* S 5/98 и S 6/98 не подавляли роста продуцента микроцина B17 *E. coli* BZB 2283, что позволило выдвинуть предположение о том, что они продуцируют микроцины типа В. Что касается микроцина штамма *E.coli* B 214/99, то он подавляет штаммы эшерихий, синтезирующие

**Таблица 7. Чувствительность штаммов-продуцентов к микроцинам, синтезируемым различными культурами**

| Индикаторные штаммы     | Штаммы-продуценты микроцинов |                      |                      |                        |                         |
|-------------------------|------------------------------|----------------------|----------------------|------------------------|-------------------------|
|                         | <i>E.coli</i> M17 (p74)      | <i>E.coli</i> S 5/98 | <i>E.coli</i> S 6/98 | <i>E.coli</i> B 214/99 | <i>E. coli</i> BZB 2283 |
| <i>E.coli</i> M17 (p74) | -                            | +25                  | +23                  | +26                    | +10                     |
| <i>E.coli</i> S 5/98    | +17                          | -                    | -                    | +8                     | -                       |
| <i>E.coli</i> S 6/98    | +20                          | -                    | -                    | +7                     | -                       |
| <i>E.coli</i> B 214/99  | +11                          | -                    | -                    | -                      | -                       |
| <i>E. coli</i> BZB 2283 | +40                          | -                    | -                    | +9                     | -                       |

Примечание: + культура чувствительна к микроцину; - культура устойчива к микроцину; цифра – диаметр зоны подавления роста.

микроцины С и В типов и, следовательно, принадлежат к какому-то иному типу, который в связи с отсутствием референсных штаммов идентифицировать пока не представляется возможным.

Для исследования генетических детерминант, связанных с продукцией микроцина, они были клонированы с использованием техники получения библиотеки генов *in vivo* (Groisman, Casadaban, 1986). Для этого штамм *E.coli* S 5/98 лизогенизировали бактериофагом Mu cts и фазмидой Mud5005 (Groisman, Casadaban, 1986), а полученная после термоиндукции двойного лизогена фаговая библиотека была скринирована трансдукцией в штамм *E. coli* HB101::Mu cts с последующей селекцией на чашках, содержащих микроцин штамма *E.coli* S 5/98. Трансдуктанты выращивали при перmissive температуре 30 °С. Селективные чашки с агаризованной средой (четвертным ТА) готовили следующим образом: засеивали газонем штамма *E.coli* S 5/98, а по истечении суток обрабатывали хлороформом для лизиса оставшихся бактерий и подсушивали. Высушенные чашки заливали тонким слоем агаризованной среды. Приготовленные таким образом чашки проявляли селективные свойства против лабораторного штамма кишечных палочек HB101 в течение 3-4 сут. Полученные устойчивые к микроцину трансдуктанты проверяли на соответствие генетическим маркерам штамма *E. coli* HB101 (Маниатис и др., 1984), а также на способность подавлять реципиент *E. coli* HB101::Mu cts в опытах по отсроченному антагонизму. Локализацию изучаемых генетических детерминант на фазмидах подтверждали передачей соответствующих фенотипических признаков при трансформации фазмидной ДНК лизогенных по Mu cts штаммов при селекции по векторному маркеру фазмиды – устойчивости к канамицину.

Плазмидную и фазмидную ДНК выделяли методом щелочного лизиса (Birnbom, Doly, 1979) и анализировали с помощью эндонуклеаз рестрикции. Для секвенирования ДНК применяли дополнительную очистку, добавляя к осветленному лизату равный объем 8 М раствора ацетата аммония. Субклонирование фрагментов фазмид проводили в вектор pUC19 (Yanisch-Perron et al., 1985) по общеизвестным методикам (Маниатис и др., 1984). Секвенирование плазмидной ДНК осуществляли с помощью набора *fmol* DNA Sequencing System (Promega). Сравнение определенных последовательностей с документами в электронной базе данных GenBank проводили с помощью программы BLAST (Altschul et al., 1997).

Для проверки предположения о принадлежности микроцина, продуцируемого штаммом *E.coli* S 5/98, к типу В, были клонированы генетические детерминанты, определяющие продукцию микроцина и иммунитет к нему. Частичное определение клонированных последовательностей обнаружило их гомологию с генами *mcbB* и *mcbC*, вовлеченными в продукцию микроцина В17 (рис. 1) (Genilloud et al., 1989).

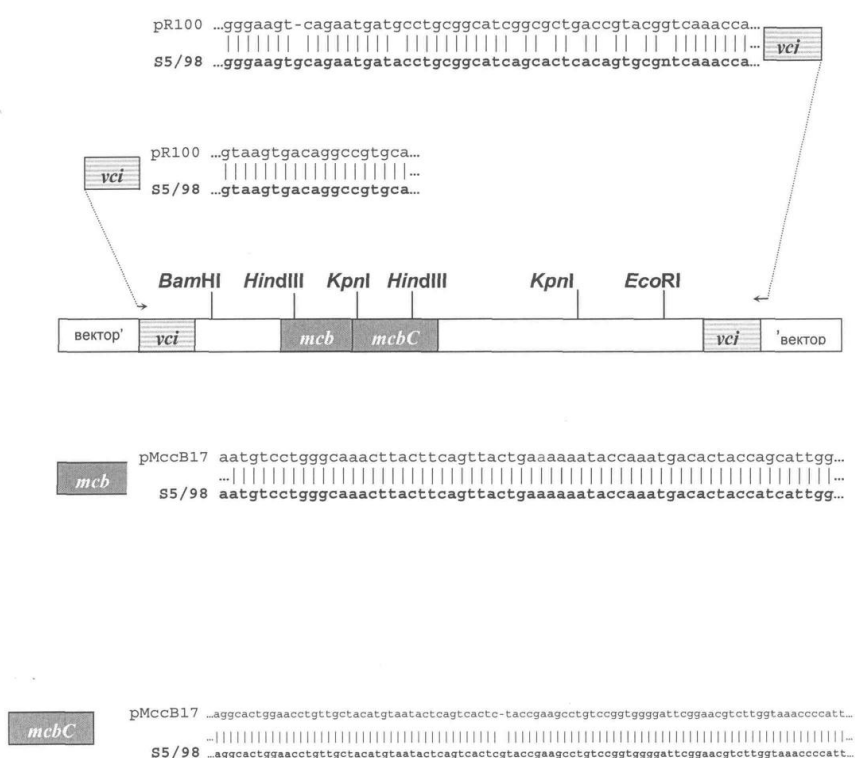


Рис. 1. Организация фрагмента ДНК из штамма *EcS* 5/98 в составе векторной фазмиды *Mud5005*, обеспечивающего продукцию микроцина типа В. Секвенированные фрагменты сопоставлены с гомологичными участками плазмид *R100* и *pMccB17*

Последовательности, примыкающие к соответствующим детерминантам, при поиске с помощью программы BLAST обнаружили сходство с генами плазмид из группы IncFII, которое было наибольшим с открытыми рамками с неидентифицированной функцией *uscB* и *uscA* плазмиды R100 (номер в GenBank AP000342), в которой указанные рамки соседствуют. В случае штамма *E.coli* S 5/98 гомологичные последовательности разделены инсерцией, содержащей гены продукции микроцина и иммунности к нему. Интересно, что при щелочном лизисе клеток штамма *E.coli* S 5/98 плазмиды не обнаруживаются (данные не представлены). Это может быть связано либо с большим размером резидентной плазмиды, либо с ее интеграцией в хромосомную ДНК штамма *E.coli* S 5/98. Следует отметить также, что штамм *E.coli* S 5/98 не проявлял устойчивости к антибиотикам, кодируемой плазмидой R100.

*Влияние продуцентов микроцинов на микрофлору кишечника телят-молочников.* Изучение воздействия микроциногенных штаммов *E.coli* B 214/99 и S 5/98 на кишечные бактерии и определение длительности их персистенции в пищеварительном тракте проведено в трех опытах на телятах-молочниках разного возраста.

Первый опыт выполнен на 3 головах телят-сосунов, которые ежедневно получали по 6 л молока равными порциями в три дачи. С 2-4 -суточного возраста через 1-1,5 ч после утреннего кормления телятам индивидуально задавали жидкую культуру штамма *E. coli* B 214/99 в течение пяти последовательных дней по следующей схеме: 1 день – 20 мл, 2-3 дни – 50 мл, 4 день – 70 мл и 5 день – 100 мл. Использовалась культура с титром  $2 \times 10^8$  к.о.е./мл. Перед началом опыта (фоновое исследование) и спустя 1, 5, 8 и 12 сут после прекращения дачи препарата брали фекалии для проведения микробиологических исследований.

Второй опыт поставлен на 3 головах телят-молочников, возраст которых варьировал от 42 до 68 дней. Как и в первом опыте, животные получали по 6 л молока и в течение пяти последовательных дней им выпаивали жидкую культуру штамма *E. coli* B 214/99 с титром  $3 \times 10^6$  к.о.е./мл по следующей схеме: 1-2 дни – 100 мл, 3-4 дни – 150 мл, 5 день – 200 мл. Пробы фекалий для микробиологических исследований брали в те же сроки, что и в 1 опыте.

Исследования показали (1-й опыт), что выпаивание 2-4 – дневным телятам в течение 5 сут увеличивающихся доз штамма *E.coli* B 214/99 оказало четко выраженное воздействие на становление микрофлоры в пищеварительном тракте телят. Спустя 1 сут после прекращения дачи препарата количество бифидобактерий и лактобацилл в фекалиях телят увеличивалось (табл.8).

**Таблица 8. Количество бактерий разных групп в фекалиях телят при применении микроциногенного штамма *E.coli* B 214/99**

| Группа микроорганизмов                                    | Время исследования |                                        |                        |                       |                        |
|-----------------------------------------------------------|--------------------|----------------------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|
|                                                           | фоновое            | сутки после прекращения дачи препарата |                        |                       |                        |
|                                                           |                    | 1                                      | 5                      | 8                     | 12                     |
| Возраст животных при постановке в опыт 2-4 – дня (1 опыт) |                    |                                        |                        |                       |                        |
| Бифидобактерии, x10 <sup>8</sup>                          | 33,6±1,74          | 43,2±3,1 <sup>a</sup>                  | 8,66±0,97 <sup>г</sup> | 10,7±1,7 <sup>г</sup> | 5,18±1,16 <sup>г</sup> |
| Лактобациллы, x10 <sup>8</sup>                            | 0,23±0,04          | 0,38±0,15                              | 6,27±2,6               | 1,09±0,1 <sup>б</sup> | 3,6±0,55 <sup>б</sup>  |

|                                                              |                 |                              |                              |                              |                              |
|--------------------------------------------------------------|-----------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Энтерококки, $\times 10^6$                                   | 16,6 $\pm$ 0,09 | 17,9 $\pm$ 0,36              | 8,96 $\pm$ 1,67 <sup>б</sup> | 10,1 $\pm$ 1,89 <sup>а</sup> | 2,7 $\pm$ 0,97 <sup>г</sup>  |
| Эшерихии, $\times 10^8$                                      | 8,9 $\pm$ 1,65  | 1,4 $\pm$ 0,09 <sup>б</sup>  | 14,8 $\pm$ 0,31 <sup>а</sup> | 6,6 $\pm$ 3,7                | 2,58 $\pm$ 0,51 <sup>б</sup> |
| Сальмонеллы, $\times 10^3$                                   | 251 $\pm$ 26    | 4,74 $\pm$ 1,6               | 3,16 $\pm$ 3,16              | 11,4 $\pm$ 4,0               | 7,97 $\pm$ 2,4               |
| Возраст животных при постановке в опыт 42-68 – дней (2 опыт) |                 |                              |                              |                              |                              |
| Бифидобактерии, $\times 10^7$                                | 29,8 $\pm$ 0,6  | 2,76 $\pm$ 1,0 <sup>г</sup>  | 2,96 $\pm$ 1,0 <sup>г</sup>  | 1,14 $\pm$ 0,07 <sup>г</sup> | 4,67 $\pm$ 0,7 <sup>г</sup>  |
| Лактобациллы, $10^6$                                         | 61,8 $\pm$ 4,4  | 3,0 $\pm$ 0,89 <sup>г</sup>  | 3,36 $\pm$ 0,89 <sup>г</sup> | 6,7 $\pm$ 2,9 <sup>г</sup>   | 13,2 $\pm$ 5,8 <sup>б</sup>  |
| Энтерококки, $\times 10^5$                                   | 6,4 $\pm$ 0,77  | 2,46 $\pm$ 0,75 <sup>б</sup> | 14,1 $\pm$ 5,8               | 6,5 $\pm$ 0,65               | 34 $\pm$ 18,0                |
| Эшерихии, $\times 10^6$                                      | 4,45 $\pm$ 1,4  | 4,46 $\pm$ 2,0               | 0,97 $\pm$ 0,2               | 1,7 $\pm$ 0,07               | 2,2 $\pm$ 0,19               |
| Сальмонеллы, $\times 10^3$                                   | 1,6 $\pm$ 0,17  | 0,7 $\pm$ 0,0 <sup>б</sup>   | 0,8 $\pm$ 0,0 <sup>б</sup>   | 0,75 $\pm$ 0,04 <sup>б</sup> | 1,41 $\pm$ 0,21              |

Примечание: Здесь и далее достоверность разницы показана в сравнении с фоновым исследованием: а –  $P < 0,05$ ; б –  $P < 0,02$ ; в –  $P < 0,01$ ; г –  $P < 0,001$ .

Однако в последующем на 5-12 сут численность бифидобактерий уменьшалась в 3,1-6,5 раза ( $P < 0,001$ ), а лактобациллы продолжали интенсивно размножаться и на 8 и 12 сут превосходили исходную концентрацию этих бактерий в 4,7 и 15,6 раз соответственно ( $P < 0,02$ ). Популяция энтерококков через 1 сут после прекращения выпойки культуры существенных количественных изменений не претерпевала, но при дальнейших наблюдениях их концентрация достоверно ( $P < 0,05-0,001$ ) снижалась. Что касается условно-патогенных и патогенных бактерий, то через 1 сут после исключения дачи микроциногенного штамма *E.coli* В 214/99 численность кишечной палочки, по сравнению с фоном, снижалась в 6,3 раза ( $P < 0,02$ ), затем на 5 сут она возрастала и снова падала на 8 и 12 сут. Количество сальмонелл в течение 12 сут наблюдений после прекращения дачи препарата было на 1-2 порядка ниже их уровня в начале опыта, что свидетельствует о сильном ингибирующем действии штамма *E.coli* В 214/99 на эту группу патогенов.

При выпаивании культуры телятам в возрасте 42-68 дней (2 опыт) ее подавляющее действие проявлялось как на эшерихиях, так и на сальмонеллах ( $P < 0,02$ ), однако к 12 сут наблюдений численность бактерий родов *Escherichia* и *Salmonella* начинала возрастать. Количество бифидобактерий и лактобацилл было стабильно сниженным ( $P < 0,02-0,001$ ), тогда как концентрация энтерококков по срокам наблюдений заметно варьировала (табл. 8).

Таким образом, полученные данные позволяют констатировать, что выпаивание телятам-молочникам в первые 2,5 мес жизни культуры микроциногенного штамма *E.coli* В 214/99 ограничивает размножение в их пищеварительном тракте потенциальных патогенов – бактерий родов *Escherichia* и *Salmonella* и, следовательно, снижает риск заболевания животных эшерихиозом (колибактериозом) и сальмонеллезом.

Более детальное изучение эшерихий, проведенное с целью определения продолжительности персистенции микроциногенного штамма *E.coli* В 214/99 в пищеварительном тракте телят-молочников первого месяца жизни, показало, что спустя 1 сут после прекращения выпойки культуры доля антагонистических эшерихий, от числа исследованных, варьировала от 0 до 75%, через 5 сут антагонисты обнаруживались у всех животных и в среднем составляли 43,7% популяции кишечной палочки. На 8 сут продуценты антибиотических веществ при случайном выборе не выявлены у одной телочки, а через 12

и у другой, тогда как у бычка №3 они выделялись в течение всего периода наблюдений (табл. 9).

Перекрестное тестирование антагонизма и иммунности у изолированных штаммов к продуцентам микроцинов показало, что они в подавляющем большинстве проявляли антибиотическое действие против штаммов *E.coli* B 214/99 и S 5/98 и практически все оказались чувствительными к синтезируемому ими микроцинам (табл. 9). Что же касается персистенции в пищеварительном тракте задаваемого телятам микроиногенного штамма *E.coli* B 214/99, то антагонисты с его фенотипом обнаружены в первые сутки после прекращения выпойки культуры только у телки №2, тогда как у других животных они не выявлялись. Таким образом, наблюдается не совсем ясная ситуация. С одной стороны, применение штамма *E.coli* B 214/99 обеспечивает ингибирование эшерихий и сальмонелл в кишечнике телят, но, с другой стороны, сколько-нибудь заметного увеличения численности задаваемого микроиногенного штамма не происходит. Чем объясняется это противоречие пока однозначно ответить не представляется возможным, но по меньшей мере можно предположить два вероятных варианта. Во-первых, возможно, что метод

**Таблица 9. Антагонизм и чувствительность к микроцинам эшерихий кишечника телят-молочников, получавших штамм *E.coli* B 214/99**

| Показатель                                                             | Номера животных | Сутки                            |      |      |      |
|------------------------------------------------------------------------|-----------------|----------------------------------|------|------|------|
|                                                                        |                 | после прекращения дачи препарата |      |      |      |
|                                                                        |                 | 1                                | 5    | 8    | 12   |
| Исследовано штаммов на антагонизм:                                     |                 |                                  |      |      |      |
| всего                                                                  | 1               | 12                               | 16   | 12   | 16   |
|                                                                        | 2               | 14                               | 16   | 16   | 16   |
|                                                                        | 3               | 16                               | 16   | 16   | 16   |
| в т.ч. выявлено положительных                                          | 1               | –                                | 6    | 11   | –    |
|                                                                        | 2               | 6                                | 8    | –    | –    |
|                                                                        | 3               | 12                               | 7    | 3    | 14   |
| % от изученных                                                         | 1               | –                                | 37,5 | 91,7 | –    |
|                                                                        | 2               | 42,8                             | 50,0 | –    | –    |
|                                                                        | 3               | 75,0                             | 43,7 | 18,7 | 87,5 |
| Процент антагонистических штаммов, подавляющих продуцентов микроцинов: |                 |                                  |      |      |      |
| Продуцент микроцина EcS 5/98                                           | 1               | –                                | –    | 63,6 | –    |
|                                                                        | 2               | 50                               | 100  | –    | –    |
|                                                                        | 3               | 100                              | 100  | –    | 100  |
| Продуцент микроцина EcB 214/99                                         | 1               | –                                | 16,7 | 100  | –    |
|                                                                        | 2               | 50                               | 100  | –    | –    |
|                                                                        | 3               | 100                              | 100  | 33,3 | 100  |
| Процент антагонистических эшерихий, чувствительных к микроцинам:       |                 |                                  |      |      |      |
| EcS 5/98                                                               | 1               | –                                | 100  | 91,7 | –    |
|                                                                        | 2               | 50                               | 100  | –    | –    |
|                                                                        | 3               | 100                              | 100  | 100  | 100  |
| EcB 214/99                                                             | 1               | –                                | 100  | 100  | –    |
|                                                                        | 2               | 50                               | 100  | –    | –    |
|                                                                        | 3               | 100                              | 100  | 100  | 100  |

случайного выбора штаммов для оценки их идентичности задаваемому микроорганизму не вполне адекватен при определении его персистенции и, во-вторых, не исключается генетическая модификация применяемого штамма в результате широко распространенного в роде *Escherichia* переноса генетической информации путем конъюгации. Так или иначе, но для оценки идентичности изолируемых из фекалий животных штаммов применяемой культуре бактерий необходима разработка методики с использованием генетических маркеров.

Оценка действия штамма *E.coli* S 5/98 на кишечную микрофлору проведена в 3-ем опыте, выполненном на 6 телятах, разделенных на две группы по 3 головы в каждой. Возраст животных в 1-й и 2-й группах варьировал в пределах 14-39 и 72-86 дней соответственно. Кормление животных обеих групп было идентично таковому в предыдущих опытах, но в течение пяти последовательных дней они индивидуально получали жидкую культуру штамма *E. coli* S 5/98 с титром  $0,95 \times 10^9$  к.о.е./мл по следующей схеме: 1 день – 50 мл, 2 день – 75 мл, 3 день – 100 мл, 4-5 дни – 150 мл. Схема отбора проб для микробиологических исследований была идентична использованной в 1 и 2 опытах.

Результаты эксперимента показали, что основные изменения в микрофлоре кишечника были сходными с таковыми, наблюдавшимися при применении штамма *E.coli* B 214/99. Однако отмечены и некоторые особенности. Так, количество бифидобактерий у телят обоего возраста, увеличивающееся спустя сутки после прекращения дачи пробиотика, оставалось повышенным в течение всего срока наблюдений ( $P < 0,05-0,001$ ), тогда как концентрация лактобацилл у молодняка 14-39 – дневного возраста возрастала с 5 по 12 сут после исключения препарата ( $P < 0,05-0,02$ ), а у животных третьего месяца жизни после прекращения дачи испытуемого штамма она стабильно снижалась (табл.10). Численность популяции энтерококков у молодняка обоих возрастов была переменной, в то время как количество эшерихий у телят 14-39 – дневного возраста в первые 9 сут наблюдений возрастало, а у 72-86 – дневных, наоборот, оно снижалось ( $P < 0,01-0,001$ ).

Что касается сальмонелл, то у животных обоих возрастов их число, в сравнении с фоновым исследованием, оставалось пониженным только в первые 5 сут после прекращения выпойки препарата, а затем начинало возрастать. Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что штамм *E.coli* S 5/98 обладает несколько меньшим ингибирующим потенциалом против сальмонелл, чем штамм *E.coli* B 214/99.

Изучение популяции эшерихий на антагонизм показало, что в фоновом исследовании антибиотикообразователи обнаружались только у телят 14-39 – дневного возраста и составляли 74,3% от общего числа тестированных культур. После прекращения выпойки препарата во все сроки наблюдений было выделено лишь 5 антибиотических штаммов и какой-либо связи с возрастом животных не наблюдалось. Полученные данные позволяют констатировать, что применение штамма *E.coli* S 5/98 снижает в популяции эшерихий пищеварительного тракта долю продуцентов антибиотических веществ.

**Таблица 10. Количество бактерий разных групп в фекалиях телят при применении микроциногенного штамма *E.coli* S 5/98**

| Группа | Время исследования |
|--------|--------------------|
|--------|--------------------|

| микроорганизмов                                     | фоно-<br>вое   | сутки после прекращения дачи препарата |                              |                              |                              |
|-----------------------------------------------------|----------------|----------------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
|                                                     |                | 1                                      | 5                            | 9                            | 12                           |
| Возраст животных при постановке в опыт 14-39 – дней |                |                                        |                              |                              |                              |
| Бифидобактерии, $\times 10^8$                       | 0,96 $\pm$ 0,3 | 9,4 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>             | 1,67 $\pm$ 0,5               | 5,25 $\pm$ 2,4               | 9,5 $\pm$ 2,2 <sup>a</sup>   |
| Лактобациллы, $\times 10^7$                         | 3,85 $\pm$ 1,3 | 2,0 $\pm$ 0,7                          | 16,9 $\pm$ 1,2 <sup>b</sup>  | 17,6 $\pm$ 2,1 <sup>b</sup>  | 28,7 $\pm$ 6,3 <sup>a</sup>  |
| Энтерококки, $\times 10^7$                          | 7,75 $\pm$ 0,9 | 14,3 $\pm$ 7,2                         | 1,53 $\pm$ 0,6 <sup>b</sup>  | 1,48 $\pm$ 0,24 <sup>b</sup> | 1,0 $\pm$ 0,2 <sup>b</sup>   |
| Эшерихии, $\times 10^7$                             | 6,0 $\pm$ 1,9  | 10,6 $\pm$ 5,1                         | 34,0 $\pm$ 0,8 <sup>r</sup>  | 14,6 $\pm$ 4,8               | 5,2 $\pm$ 2,1                |
| Сальмонеллы, $\times 10^2$                          | 3,4 $\pm$ 3,4  | 1,0 $\pm$ 0,0                          | нет                          | 13,5 $\pm$ 5,0               | 30,5 $\pm$ 1,2 <sup>b</sup>  |
| Возраст животных при постановке в опыт 72-86 – дней |                |                                        |                              |                              |                              |
| Бифидобактерии, $\times 10^8$                       | 0,18 $\pm$ 0,0 | 4,7 $\pm$ 0,5 <sup>r</sup>             | 3,9 $\pm$ 0,04 <sup>r</sup>  | 4,8 $\pm$ 0,8 <sup>b</sup>   | 8,69 $\pm$ 2,9 <sup>a</sup>  |
| Лактобациллы, $\times 10^7$                         | 37,3 $\pm$ 9,7 | 12,9 $\pm$ 3,6                         | 5,3 $\pm$ 1,1 <sup>a</sup>   | 5,7 $\pm$ 0,9 <sup>a</sup>   | 3,28 $\pm$ 0,8 <sup>a</sup>  |
| Энтерококки, $\times 10^6$                          | 2,7 $\pm$ 0,0  | 0,43 $\pm$ 0,9                         | 0,75 $\pm$ 0,02 <sup>r</sup> | 5,18 $\pm$ 0,3 <sup>b</sup>  | 0,33 $\pm$ 0,04 <sup>r</sup> |
| Эшерихии, $\times 10^6$                             | 24,0 $\pm$ 0,1 | 0,82 $\pm$ 0,1 <sup>r</sup>            | 0,76 $\pm$ 0,3 <sup>r</sup>  | 1,4 $\pm$ 0,3 <sup>r</sup>   | 10,0 $\pm$ 2,9 <sup>b</sup>  |
| Сальмонеллы, $\times 10^2$                          | 1,5 $\pm$ 0,24 | нет                                    | нет                          | 1,0 $\pm$ 0,0                | 3,0 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>   |

Исследование взаимоотношений у выделенных из фекалий 26 антагонистических эшерихий (фоновое исследование) с продуцентами микроцинов типов В и С показало, что все они оказались чувствительными к микроцинам EcS 5/98 и C51. Что же касается их антибиотического действия, то 15 штаммов (57,7%) не подавляли роста *E. coli* В 214/99 и *E. coli* S 5/98, тогда как оставшиеся 11 культур (42,3%) ингибировали их рост. Продуцент микроцина C51 был устойчив ко всем этим антагонистам. Один штамм, выделенный спустя 5 сут после прекращения выпойки препарата, как и 11 других культур фонового исследования, подавлял рост штаммов, образующих микроцины EcS 5/98 и EcB 214/99, а у 4 штаммов, изолированных на 9 сут после исключения дачи препарата, выявлена антагонистическая активность против штамма *E. coli* M17(p74), синтезирующего микроцин C51. Таким образом, из этих данных следует, что дача телятам штамма *E. coli* S 5/98 способствовала селекции эшерихий с антагонистической активностью к продуценту микроцина C51.

*Воздействие продуцентов микроцинов на микрофлору кишечника бычков с установившимся рубцовым пищеварением.* В опыт были взяты десять 9-месячных бычков черно-пестрой породы. По принципу парных аналогов они были разделены на две группы по 5 голов в каждой. Средняя живая масса бычков в 1-й и 2-й группах составила 142,2 и 143 кг соответственно. Животные обеих групп получали идентичные кормовые рационы, состоящие из сена, силоса и концентратов, на фоне которых в течение 3 дней подряд бычкам 1-й и 2-й групп выпаивали культуры микроиногенных штаммов *E. coli* В 214/99 (титр  $9,63 \times 10^8$  к.о.е./мл) и *E. coli* S 5/98 (титр  $8,63 \times 10^8$  к.о.е./мл) в дозе 150 мл соответственно. Образцы фекалий для микробиологических исследований отбирали перед применением препаратов и на 1, 4, 6, 8, 15 и 35 сут после прекращения их дачи.

Исследования показали, что выпаивание бычкам культур продуцентов микроцинов сопровождалось четким ингибирующим действием на микрофлору, которое сохранялось в течение 35 сут наблюдений (табл.11). После прекращения дачи животным изучаемых штаммов на 1, 4, 6, 8 и 15 сут доля антагонистов от числа исследованных культур в 1-й и 2-й группах варьировала в пределах 56, 54, 50, 52 и 32% и 30, 28, 10, 28 и 16% соответственно.

**Таблица 11. Количество бактерий разных групп в фекалиях бычков, получавших продуценты микроцинов**

| Время исследования                                        | Группа микроорганизмов     |                                       |                            |
|-----------------------------------------------------------|----------------------------|---------------------------------------|----------------------------|
|                                                           | Эшерихии, $\times 10^6$    | Сальмонеллы                           | Энтерококки, $\times 10^5$ |
| <i>Животные получали штамм E.coli B 214/99 (1 группа)</i> |                            |                                       |                            |
| Фоновое                                                   | <u>3,0 – 19,5</u><br>10,5  | –                                     | <u>4,0 – 87,7</u><br>34,8  |
| Сутки после прекращения дачи препарата                    |                            |                                       |                            |
| 1                                                         | <u>0,5 – 6,35</u><br>2,68  | $<1 \times 10^2 - 2 \times 10^3$      | <u>0,53 – 35,0</u><br>8,4  |
| 4                                                         | <u>0,48 – 1,63</u><br>1,05 | $<1 \times 10^2$                      | <u>0,2 – 19,6</u><br>9,5   |
| 6                                                         | <u>0,25 – 3,64</u><br>1,44 | $<1 \times 10^1 - 3,0 \times 10^3$    | <u>9,1 – 21,0</u><br>13,2  |
| 8                                                         | <u>0,18 – 3,8</u><br>2,15  | $<1 \times 10^1 - 0,9 \times 10^3$    | <u>4,6 – 19,0</u><br>10,5  |
| 15                                                        | 1,73                       | $<1 \times 10^1 - 1 \times 10^3$      | <u>3,4 – 7,1</u><br>5,05   |
| 35                                                        | <u>0,2 – 12,45</u><br>6,62 | $<1 \times 10^1 - 2,9 \times 10^3$    | <u>4,2 – 21,5</u><br>9,18  |
| <i>Животные получали штамм E.coli S 5/98 (2 группа)</i>   |                            |                                       |                            |
| Фоновое                                                   | <u>1,0 – 90,6</u><br>30,52 | $3,4 \times 10^3^*$                   | <u>2,0 – 88</u><br>38,5    |
| Продолжение таблицы 11                                    |                            |                                       |                            |
| Сутки после прекращения дачи препарата                    |                            |                                       |                            |
| 1                                                         | <u>0,7 – 3,55</u><br>2,12  | $<1 \times 10^2 - 31,2 \times 10^4$   | <u>0,1 – 4,85</u><br>1,66  |
| 4                                                         | <u>0,19 – 1,13</u><br>0,42 | $<1 \times 10^2$                      | <u>0,12 – 6,4</u><br>2,2   |
| 6                                                         | <u>0,07 – 1,61</u><br>0,83 | $0,1 - 8,8 \times 10^3$               | <u>4,0 – 31,0</u><br>10,5  |
| 8                                                         | <u>0,14 – 2,7</u><br>1,1   | $<0,1 \times 10^1 - 1,71 \times 10^4$ | <u>0,16 – 15,6</u><br>9,0  |
| 15                                                        | <u>0,13 – 3,0</u><br>1,70  | $0,1 - 1,5 \times 10^3$               | <u>4,75 – 35,0</u><br>27,8 |
| 35                                                        | <u>0,9 – 12</u><br>5,7     | $<0,1 \times 10^1 - 1,92 \times 10^4$ | <u>3,8 – 34,5</u><br>20,9  |

Примечание: Числитель – пределы колебаний; знаменатель – среднее значение; – бактерии не обнаружены; \* найдены только у одного бычка.

При этом на 8-е и 15-е сут антагонисты с фенотипом задаваемых штаммов составляли 58,9% и 63,6% от общего числа антибиотических эшерихий соответственно, т.е. они в высоких концентрациях персистировали в кишечнике бычков в течение полумесяца после прекращения выпаивания испытуемых штаммов. Почти все другие антагонисты проявляли фенотип чувствительности к микроцинам типов В и С, тогда как продуцируемые ими антибиотические вещества не были губительными для микроциногенных штаммов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Соколова Н.А., Хмель И.А., Шегидевич Э.А., Евглевская Н.И., Горская Е.М., Курепина Н.Е. Профилактика колибактериоза телят штаммом-продуцентом микроцина. Ветеринария. 1991, 1: 24-25.
2. Морозова И.П., Юсупова М.П., Гололобов М.Ю., Королькова Н.К., Ходова О.М., Степанов В.М. Металлопротеиназа *Bacillus mesentericus*, штамм В-313. Биохимия. 1993, 58, 9: 1420-1429.
3. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. М.: "Мир". 1984: 394 с.
4. Хмель И.А., Манохина И.М., Басюк Е.И., Метлицкая А.З., Липасова В.А., Романова Ю.М., Бондаренко В.М. Характеристика энтеробактерий, продуцирующих антибиотики широкого спектра действия микроцины // Генетика. 1993, 29, 5: 768-775.
5. Хмель И.А. Микроцины - пептидные антибиотики энтеробактерий: генетический контроль синтеза, структура и механизм действия. Генетика. 1999, 31, 1: 5-16.
6. Хмель И.А., Метлицкая А.З., Фоменко Д.Е., Катруха Г.С., Басюк Е.И., Курепина Н.Е., Липасова В.А., Безруков В.М. Микроцины – новые пептидные антибиотики из энтеробактерий и генетический контроль их синтеза. Молекулярная биология. 1999, 33, 1: 113-119.
7. Asensio C., Perez-Diaz V.C., Martinez M.C., Baquero F. A new family of low molecular weight antibiotics from Enterobacteria. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1976, 69: 7-14.
8. Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 1997, 25, 17: 3389-3402.
9. Baquero F., Moreno F. The microcins. FEMS Microbiol. Lett. 1984, 23: 117-124.
10. Birnboim H.C., Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. 1979, 7, 6: 1513.
11. Genilloud O., Moreno F., Kolter R. DNA sequence, products, and transcriptional pattern of the genes involved in production of the DNA replication inhibitor microcin B17. J. Bacteriol. 1989, 171, 2: 1126-1135.
12. Groisman E.A., Casadaban M.J. Mini-mu bacteriophage with plasmid replicons for *in vivo* cloning and *lac* gene fusing. J. Bacteriol. 1986, 168, 1: 357-364.
13. Khmel I.A., Lipasova V.A., Kurepina N.E., Reakesh A.N., Kolot M.N. The nature of typhimuricin, the antibiotic substance produced by *S. typhimurium* LT2. Microbios Lett. 1987, 36, 141: 33-38.
14. Khmel I.A., Kopylov V.M., Vorobjeva I.P., Polyanin V.P. The influence of colicinogenic plasmids Col Jb-P9, ColJa-CA53 and ColV-K30 on the repair mutagenesis and induction of colicin E1 synthesis. Mol. Gen. Genet. 1981, 181, 1: 101-106.
15. Lavina M., Gaggero C., Moreno F. Microcin H47, a chromosome – encoded microcin antibiotic of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 1990, 172, 11: 6585-6588.
16. Salmon R.A., Farias R.N. Microcin 25, a novel antimicrobial peptide produced by *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 1992, 174, 22: 7428-7435.

17. Yanisch-Perron C., Vieira J., Messing J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*. 1985, 33, 1: 103-119.

**КЛОНИРОВАНИЕ ГЕНОВ СИНТЕЗА МИКРОЦИНА ТИПА В  
И ИССЛЕДОВАНИЕ СУКЦЕССИИ МИКРОБИОЦИНОЗА  
КИШЕЧНОГО ТРАКТА ЖИВОТНЫХ ПРИ ВВЕДЕНИИ ПРИРОДНЫХ  
И РЕКОМБИНАНТНЫХ ПРОДУЦЕНТОВ МИКРОЦИНОВ  
И БАКТЕРИОЦИНОВ**

Б. В. Тараканов<sup>1</sup>, В.В. Алёшин<sup>1,2</sup>, Т. А. Николичева<sup>1</sup>,  
Л. Л. Полякова<sup>1</sup>, А.А. Яковлева<sup>2</sup>, В.Н. Никулин<sup>3</sup>, Т.Е. Палагина<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии, биохимии и питания сельскохозяйственных животных РАСХН (г. Боровск);

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт физико-химической биологии  
им. А. Н. Белозерского МГУ (г. Москва)

<sup>3</sup>Оренбургский государственный аграрный университет

*На основе непатогенного штамма E. coli M17 и природного продуцента микроцина типа В E. coli S5/98 с использованием векторов pColap и pPAL3 созданы рекомбинантный штамм E. coli M17(pPAL4), продуцирующий микроцин типа В и колицин E1, и штамм E. coli M17(pPAL5), синтезирующий микроцин, но устойчивый к колицину E1. Показано, что в штаммах – продуцентах двух антибиотических факторов, экспрессия колицина не влияет на продукцию микроцина. Установлено, что динамика популяций штаммов производных E. coli M17 в смешанных культурах на богатых и бедных средах – различается. Длительное культивирование без пересева приводит к формированию равновесного состояния продуцента колицина E1 E. coli M17(pPAL4) и устойчивого к нему штамма E. coli M17(pPAL5). Полного подавления одного штамма другим не происходит. В опытах на телятах-молочниках установлено, что после прекращения дачи животным микроциногенного штамма E. coli M17(pPAL5) он персистирует в пищеварительном тракте по меньшей мере до пяти суток и составляет от долей процента до 60% от всех выделенных эшерихий. Испытание нового пробиотика микроцикола (E. coli S5/98) при выращивании цыплят-бройлеров показало, что препарат является эффективным средством регуляции кишечной микрофлоры, повышения неспецифической резистентности, сохранности и продуктивности птицы, а также улучшения качества мяса.*

**Введение**

Микроцины – низкомолекулярные антибиотикоподобные вещества, продуцируемые бактериями кишечной группы (Asensio, Perez-Diaz, 1976; Хмель, 1999; Хмель и соавт., 1999). Они помогают бактериям в борьбе против конкурентов, способствуют приживаемости штамма-продуцента в микробном

сообществе. Известно, что микроцин-продуцирующие штаммы проявляют наибольшую антимикробную активность на средах, бедных органическими веществами. Продуценты другого класса антимикробных веществ – колицинов, проявляют обратные свойства, то есть более активны на богатых средах. Соответственно, бактериальные штаммы – продуценты микроцинов получают преимущество в кишечном тракте взрослых жвачных с установившимся типом рубцового пищеварения, в то время как в кишечнике телят-молочников получают преимущество продуценты колицинов, как было показано нашими предыдущими исследованиями.

Исходя из вышеизложенного, на первых этапах реализации проекта наши усилия были сконцентрированы на получении рекомбинантных штаммов эшерихий с детерминантами продукции и устойчивости к микроцину типа В и колицину Е1.

### Результаты и обсуждение

Клонирование генов, обеспечивающих синтез микроцина типа В, и выживаемость несущих их *Escherichia coli* в смешанных культурах и пищеварительном тракте опытных животных.

Постоянные обитатели кишечного тракта здоровых животных и человека – кишечные палочки *Escherichia coli* синтезируют различные вещества, подавляющие рост других микроорганизмов, в том числе патогенных. Часть этих веществ представляют собой продукты основного метаболизма, например, органические кислоты, накапливающиеся при сбраживании углеводов. Другие вещества, антибиотики, синтезируются специальными системами. Некоторые из этих веществ обладают очень высокой антагонистической активностью: достаточно одной их молекулы (например, колицина Е1), чтобы вызвать гибель чувствительной клетки. Считается, что способность к синтезу антибиотических веществ приобретена бактериями в борьбе с конкурентами и способствует выживаемости штамма-продуцента в микробном сообществе, хотя прямых опытов по количественной оценке роли антибиотиков в конкуренции в смешанных культурах очень мало. Тем не менее ожидается, что штаммы – продуценты антагонистических веществ окажутся полезными для практических целей. Их можно использовать как действующий компонент пробиотиков – медицинских или ветеринарных препаратов, содержащих живые культуры бактерий, эффективно подавляющие патогенную микрофлору кишечника и оказывающие лечебное и профилактическое действие.

Среди выделенных нами от здоровых животных кишечных палочек – кандидатов на роль пробиотических, мы отобрали непатогенный штамм *Escherichia coli* S 5/98, который обладал широким спектром антагонистического действия против патогенных и условно-патогенных бактерий. По результатам исследования перекрестной иммунности относительно известных штаммов, а также определения частичных нуклеотидных последовательностей клонированных генов нами было показано, что антагонистические свойства штамма *E. coli* S 5/98 обусловлены продукцией микроцина типа В (Тараканов и др., 2004).

*Клонирование генов синтеза микроцина типа В и иммунности к нему.* Для клонирования генов синтеза микроцина и иммунности к нему из штамма

*Escherichia coli* S 5/98 была применена методика получения банка генов с помощью бактериофага мини-Mu (Mud5005), соединенного с плазмидным репликоном и проявляющего, в зависимости от условий, свойства фага или плазмиды. Переключение типа репликации Mud5005 с плазмидного на фаговый осуществляется фагом-помощником Mucts, несущим ген термочувствительного C1 репрессора, так что индукция профага осуществляется повышением температуры (Groisman, Casadaban, 1986). Штамм *E. coli* S 5/98 последовательно лизогенизировали фагом-помощником Mucts и фазмидой Mud5005 при перmissive температуре (30°C) и индуцировали литический цикл термоиндукцией экспоненциальной культуры. Фаголизатом заражали лизогенный штамм *E. coli* HB101::Mucts, чувствительный к микроцину типа В; трансдуктантов отбирали при перmissive температуре (30°C) на агаризованной среде, содержащей в качестве селективного агента микроцин типа В и канамицин (маркер вектора Mud5005). Селективные чашки получали, выращивая на них газон *E. coli* S 5/98, после чего стерилизовали их парами хлороформа и заливали тонким верхним слоем 1,3% агара, содержащего канамицин в нужной концентрации. Зависимость фенотипа устойчивости к микроцину типа В полученных клонов от клонированных генов, а не хромосомных мутаций, проверяли трансформацией выделенной фазмидной ДНК реципиентного штамма *E. coli* HB101::Mucts (при перmissive температуре). В случае локализации их детерминант на фазмиде, фенотип устойчивости к микроцину котрансформировался с устойчивостью к канамицину, по которой осуществлялась селекция трансформантов. Среди отобранных клонов один проявлял не только обусловленный фазмидой фенотип устойчивости к микроцину, но и в опытах по отсроченному антагонизму образовывал зоны задержки роста реципиентного штамма *E. coli* HB101::Mucts. Мы предположили, что подавление реципиента обусловлено присутствием на фазмиде, получившей лабораторный номер Mud5005-13, одновременно с генами иммунитета также и генов продукции микроцина типа В. Эта фазмида была использована для последующего клонирования интересующих нас генов в составе сегрегационно и структурно более стабильных векторов.

*Клонирование генов синтеза микроцина типа В в составе производных ColE1.* Рестриктивный анализ фазмиды Mud5005-13 показал, что размер клонированного в ее составе фрагмента ДНК превышает 30 тысяч пар нуклеотидов (т. п. н.). Для дальнейшего субклонирования было отобрано несколько эндонуклеаз рестрикции, гидролиз с помощью которых Mud5005-13 приводил к образованию крупных фрагментов ДНК. В результате по сайту EcoRI в вектор pBluescript SK+ был клонирован фрагмент фазмиды размером около 8 т. п. н., который придавал рекомбинантным бактериям способность продуцировать микроцин типа В, что было показано в чашечных опытах по отсроченному антагонизму в отношении чувствительной тест-культуры. Плазмида получила название pPAL1. Более подробное исследование несущего ее клона показало, что он отличается по характеру роста на агаризованных средах от штамма, содержащего фазмиду Mud5005-13. Бактерии с плазмидой pPAL1, при пересеве при перmissive температуре образовывали более короткий штрих с редкими колониями по сравнению со штаммом с фазмидой, а также отличались плохой сохранностью жизнеспособности клеток при хранении. Частичное определение первичной структуры pPAL1, проведенное с универсальных плазмидных праймеров, обнаружило, что, с одной стороны, клонированная после-

довательность гомологична генам ряда плазмид большого размера, выделенных из энтеробактерий, именно – гену, отвечающему за копияемость плазмид. С другой стороны, фрагмент обнаружил большое сходство с природной плазмидой pMccB17 (документом в GenBank номер X07875), именно с генами иммунности mcbF и mcbG последовательности pMccB17, причем ген mcbG в pPAL1 оказывается не полным. Это согласуется с ранее опубликованным выводом о том, что белок McbG необходим для стойкого иммунитета к микроцину типа В, хотя и в его отсутствие наблюдается некоторый уровень устойчивости (Garrido et al., 1988).

Другой особенностью pPAL1 по сравнению с последовательностью X07875 является наличие одного дополнительного нуклеотида в кодирующей рамке mcbF. Этот нуклеотид обеспечивает предсказываемый сдвиг рамки относительно секвенированного ранее гена mcbF в области, близкой к 3' концу гена, за границей консервативного домена ABC-транспортёров, к которым принадлежит белок McbF. В результате 18 С-концевых остатков белка McbF, предсказанного из последовательности X07875, расходятся с предсказанными из определенной нами последовательности. Тогда как в последовательности X07875 гены mcbF и mcbG перекрываются, в pPAL1 рамка mcbF короче на четыре триплета и гены не перекрываются (рис. 1).

|                |                                                               |
|----------------|---------------------------------------------------------------|
| McbF           | <b>INRYSDMSDFIQSNNETTQKRHLLKKLWEQETDTWI*</b>                  |
|                | +++++                                                         |
| pPAL1, Frame 2 | <b>INRYSDMSDFIQSNNETTPEKAFIKEVMGTGD*HMDIIEKRITKRHLSSES...</b> |
|                | +++++                                                         |
| McbG           | <b>MDIIEKRITKRHLSSES...</b>                                   |

Рис. 1. Транслированный в одной из рамок фрагмент pPAL1, в сравнении с предсказанными аминокислотными последовательностями McbF (С-конец) и McbG (N-конец). \* – стоп-кодон

Возможно, это отличие связано с предполагаемой по теоретическим соображениям более быстрой эволюцией генов иммунности, лидирующих в эволюционном дрейфе специфичности антибиотиков (Tan, Riley, 1996), или же, учитывая высокое сходство сравниваемых последовательностей, можно допускать ошибку в документе X07875.

На втором этапе мы восполнили нехватку гена mcbG. Основываясь на обнаруженном нами высоком сходстве нуклеотидных последовательностей микроциновых генов *E. coli* S 5/98 с опубликованными ранее, мы сконструировали пару праймеров и амплифицировали с помощью ПЦР недостающий фрагмент с матрицы Mud5005-13. Схема конструирования с его помощью целевой плазмиды pPAL2 показана на рис. 2. Бактерии, содержащие плазмиду pPAL2, не отличались по характеру роста при перmissive температуре от бактерий, содержащих Mud5005-13.

На следующем этапе блок генов *mcbABCDEFG*, отвечающих за синтез микроцина типа В и иммунитет к нему, был клонирован на векторах pColap (Лившиц и др., 2000) и pPAL3 (сконструированном в этой работе), маркированных детерминантами устойчивости к ампициллину либо ампициллину и канамицину соответственно. Эти векторы являются немобилизуемыми производными плазмиды ColE1, причем pColap обеспечивает несущим ее клеткам

способность производить колицин E1 и иммунность к нему, тогда как pPAL3 обеспечивает только иммунность к колицину E1. Сконструированные плазмиды названы pPAL4 и pPAL5 (рис. 3).

*Поведение исходного штамма E. coli M17 и его рекомбинантных изогенных производных in vitro.* Для получения пары изогенных штаммов, плазмиды pPAL4 и pPAL5, а также векторы pColap и pPAL3 были трансформированы в *E. coli* M17 – безвредный непатогенный штамм, входящий в состав коммерческих пробиотиков «Колибактерин» и «Бификол». Этот штамм – производный *E. coli* Nissle 1917, утративший, однако, некоторые генетические маркеры родительского штамма и снизивший антагонистическую активность в отношении бактерий кишечной группы (Шемчук, 1983). Предварительно была проверена перекрестная устойчивость полученных штаммов на разных средах культивирования и сегрегационная стабильность плазмид.

Из полученных данных (табл. 1) следует, что все рекомбинантные штаммы на основе *E. coli* M17 ингибируют рост своего бесплазмидного реципиента. Они также угнетают рост индикаторной культуры *E. coli* DH5 $\alpha$ . По результатам опыта можно сказать, что в штаммах – продуцентах двух антибиотических факторов, экспрессия колицина не влияет на продукцию микроцина. Кроме того, совмещение продукции микроцина и колицина в одном штамме позволяет получать стабильно микроциновые зоны подавления роста индикаторных культур на богатой среде (ТА).

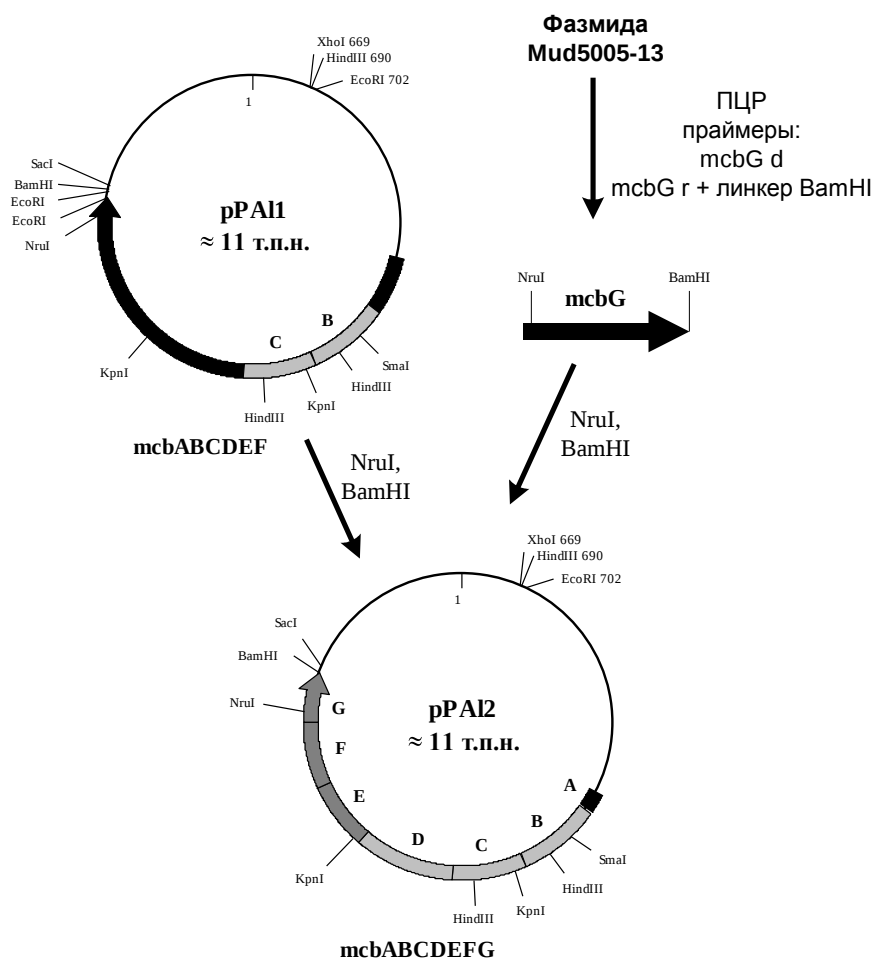


Рис. 2. Конструирование плазмиды pPAL2

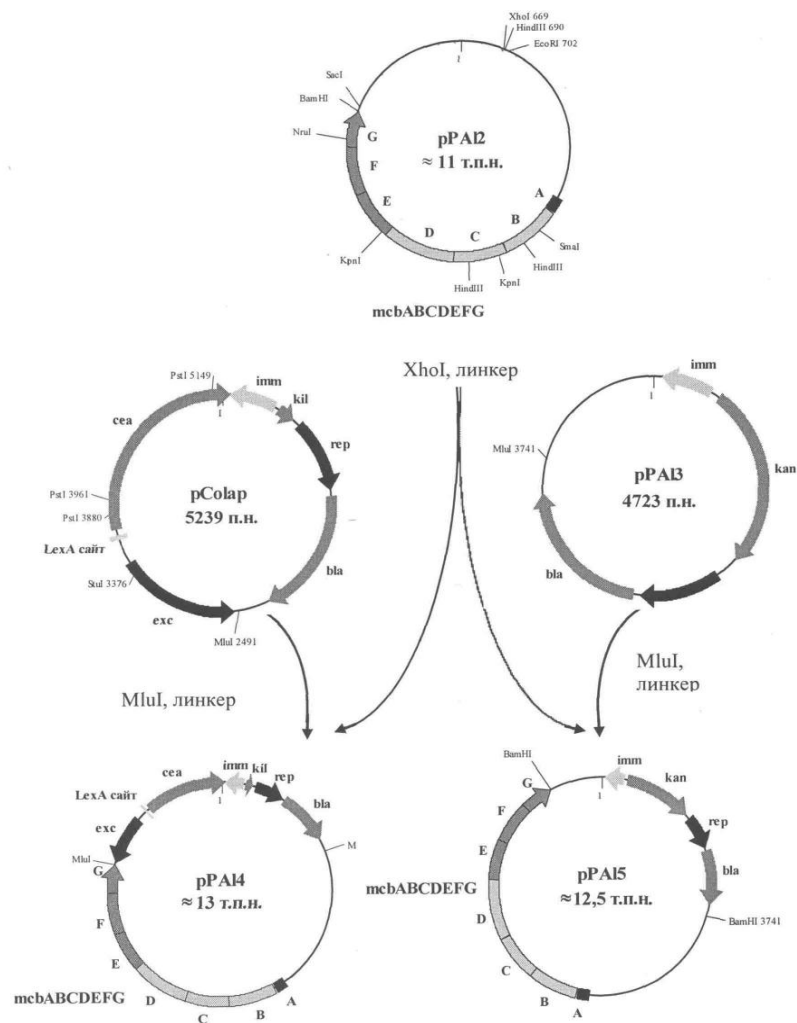


Рис.3. Конструирование плазмид pPAL4 и pPAL5

Таблица 1. Перекрестная устойчивость штаммов *E. coli* M17 и его рекомбинантных производных с антагонистической активностью

| Индикаторные штаммы       | Тестируемые штаммы             |                           |                    |                                      |
|---------------------------|--------------------------------|---------------------------|--------------------|--------------------------------------|
|                           | <i>E. coli</i> M17(pPAL4)      | <i>E. coli</i> M17(pPAL5) | <i>E. coli</i> M17 | <i>E. coli</i> M17(pColap)           |
| <i>E. coli</i> DH5α       | (1/4 TA) +16 мм<br>(TA) +12 мм | (1/4 TA) +16 мм           | —                  | <b>(1/4 TA)</b> —<br>—<br>(TA) +3 мм |
| <i>E. coli</i> M17(pPAL4) | (1/4 TA) —<br>(TA) —           | (1/4 TA) —<br>(TA) —      | —                  | (TA) —                               |

|                               |                    |                    |   |                          |
|-------------------------------|--------------------|--------------------|---|--------------------------|
| <i>E. coli</i><br>M17(pPAL5)  | (¼ TA) —<br>(TA) — | (¼ TA) —<br>(TA) — | — | (TA) —                   |
| <i>E. coli</i> M17            | (¼ TA) +11 мм      | (¼ TA) +11 мм      | — | (1/4 TA) —<br>(TA) +2 мм |
| <i>E. coli</i><br>M17(pColap) | (¼ TA) +11 мм      | (¼ TA) +11 мм      | — | (TA) —                   |

Примечание: В скобках указана среда, на которой появляется указанная зона подавления роста; « + » – подавление роста; « — » – отсутствие подавления роста.

Стабильность плазмид в штамме *E. coli* M17 оценивали путем пересева клеток этого штамма в неселективных условиях в течение 7 сут на богатой (2YT) и бедной (M9) жидких средах. Пересев клеток в свежие среды проводили на 2 и 4 сут культивирования. На первые, вторые, четвертые и седьмые сутки культуры рассевали на агаризованную среду без антибиотика. Стабильность рекомбинантных плазмид проверяли путем пересева колоний, выросших на среде без антибиотика, на селективные среды, содержащие ампициллин. Обнаружено, что плазмиды pColap; pPAL3; pPAL4; pPAL5, по меньшей мере, в течение двух суток сохраняют 100% стабильность. На седьмые сут pColap сохраняется в 100% клеток, остальные плазмиды – в 90% клеток. Высокая стабильность обеспечивается репликацией, а также антибиотической селекцией против клеток, утративших плазмиду с генами иммунности.

Для исследования динамики популяций штаммов производных *E. coli* M17 в смешанных культурах были получены ночные культуры штаммов *E. coli* M17; *E. coli* M17 (pPAL4); *E. coli* M17 (pPAL5) в среде YT. Дальнейший эксперимент проводили на богатой (2YT) и минимальной (M9) средах.

В смешанные культуры было взято одинаковое количество клеток исследуемых штаммов. В каждый опытный вариант на 5 мл среды брали по 20 мкл ночных культур. Состав смешанных культур и на богатой, и на бедной средах определяли через 4 ч и 1, 2, 3, 6, 10 сут от начала культивирования. Пересев культур в свежие среды проводился один раз на 3-и сут после начала опыта. При этом в пробирку с 5 мл свежей среды 2YT или M9 вносили по 40 мкл смешанных культур. Количество клеток каждого штамма определяли путем пересева колоний, выросших на среде без антибиотика на селективную среду, содержащую маркерный антибиотик ампициллин. При этом клетки *E. coli*, не выросшие на селективной среде, считались исходным безплазмидным штаммом *E. coli* M17. Результаты опыта представлены на рис. 4 и 5.

На рисунках видно, что исходный штамм *E. coli* M17 не обнаруживается в смешанной культуре уже через сутки культивирования. Низкая жизнеспособность *E. coli* M17 обусловлена его чувствительностью к колицину E1 штамма *E. coli* M17 (pPAL4) и микроцину типа В штаммов *E. coli* M17 (pPAL4) и *E. coli* M17 (pPAL5). Штамм *E. coli* M17 (pPAL5) не производит колицин, но обладает устойчивостью к нему. Этим, по-видимому, объясняется равное соотношение штаммов, содержащих рекомбинантные плазмиды в первые сутки культивирования.

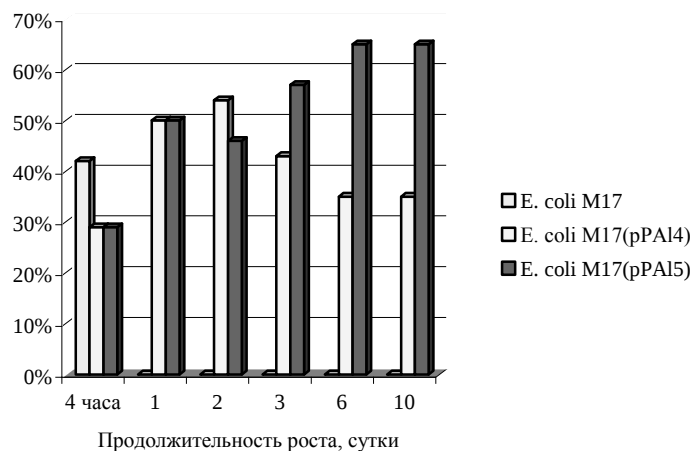


Рис. 4. Выживаемость и соотношение клеток штаммов *E. coli* M17, M17 (pPAL4) и M17 (pPAL5) в смешанной культуре на богатой среде (2YT)

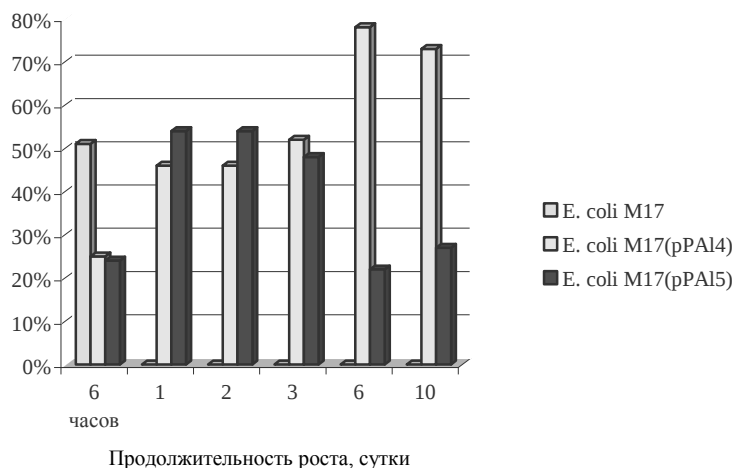


Рис. 5. Выживаемость и соотношение клеток штаммов *E. coli* M17, M17 (pPAL4) и M17 (pPAL5) в смешанной культуре на минимальной среде (M9)

Затем это соотношение изменяется в сторону доминирования штамма *E. coli* M17 (pPAL5) над *E. coli* M17 (pPAL4). Известно, что синтез колицина сопряжен с лизисом клеток продуцентов. Таким образом, в культуре постоянно происходит гибель некоторого количества клеток *E. coli* M17 (pPAL4), связанная с продукцией колицина; аналогичной убыли клеток *E. coli* M17 (pPAL5) не предполагается.

Количество колицина, образующегося в популяции продуцента, определяется количеством этого бактериоцина, которое необходимо для подавления роста или исчезновения штаммов конкурентов. Кроме того, в штамме *E.*

*coli* M17 (pPAL4) микроцин типа В помимо своей высокой бактерицидной активности, запуская SOS ответ клетки (Herrero, Moreno, 1986), выступает в роли индуктора синтеза колицина E1. Известно, что синтез колицина E1 индуцируется условиями или факторами, запускающими SOS ответ клетки, который, в свою очередь, инактивирует репрессор колицинового оперона – белок LexA. В штамме *E. coli* M17 (pPAL5) отсутствует продукция колицина, запускающего механизм преждевременной гибели клеток. Устойчивость к колицину штамма *E. coli* M17 (pPAL5) и богатая среда обеспечивают активный синтез колицина в штамме *E. coli* M17 (pPAL4), усиливая лизис клеток последнего. Ранее пониженная выживаемость штамма, продуцирующего одновременно колицин E1 и микроцин типа В, была замечена для *E. coli* S 5/98 (pColap) (Тараканов и др., 2005).

На бедной среде, также как и на богатой, происходит полное исчезновение реципиентного штамма *E. coli* M17 в смешанной культуре в течение первых 24 часов культивирования. Однако соотношение двух других штаммов *E. coli* M17 (pPAL5) и *E. coli* M17 (pPAL4) со временем изменяется в пользу колициногенного. Причины этого не ясны. Обычно иммунный белок к колицину E1 в клетке синтезируется конститутивно и его количества достаточно для защиты клеток от эндогенного и экзогенного колицина. Однако имеются сообщения, что экспрессия оперона *cea – kil* регулируется уровнем транскрипции гена *imm*, рамка которого перекрывается с генами *cea – kil*, но транскрипция происходит в противоположном направлении (Bishop et al., 1985; Zhang et al., 1988). Возможно, имеет место обратный эффект. В отсутствии оперона *cea – kil* на плазидах, трансляция *imm* мРНК частично подавлена контртранскриптом, образующимся с промотора генов *cea-kil*, сохранившегося в составе pPAL5. Однако, как известно, бедная культуральная среда неблагоприятна для синтеза колицина, и, может быть, обнаруженному исходу конкуренции надо искать другое объяснение.

По результатам экспериментов *in vitro* можно сказать, что антагонистическая активность изучаемых штаммов начинает проявляться с наступлением стационарной фазы роста смешанных культур. Во время экспоненциального роста в смешанных культурах преобладает реципиентный штамм *E. coli* M17, чувствительный к микроцину типа В, и к колицину E1. Отсутствие синтеза бактериоцинов в первые часы культивирования смешанных культур и дополнительные расходы штаммов-продуцентов, связанные с репликацией плазмид, позволяют чувствительному штамму *E. coli* M17 доминировать в популяции. Замедление роста смешанной культуры индуцирует синтез микроцина типа В и колицина E1. В условиях жидкой хорошо перемешиваемой среды количества колицина E1 недостаточно для бактерицидного действия, и необходимы время для достижения его рабочей концентрации и дополнительные затраты, связанные с его синтезом. Учитывая различающиеся стратегии синтеза этих двух бактериоцинов можно ожидать, что подавление чувствительной культуры на богатой среде в первую очередь обусловлено бактерицидным действием колицина E1, а на бедной – микроцином В. В 24-х часовой смешанной культуре на богатой среде, способствующей синтезу колицина E1, продуцент колицина штамм *E. coli* M17 (pPAL4) и устойчивый к колицину штамм *E. coli* M17 (pPAL5) присутствуют в равных соотношениях. Это косвенно указывает на то, что инструментом антагонистической активности в данном случае был микроцин типа В, синтез которого не сопряжен с лизисом клеток проду-

центов. Кроме того, результаты эксперимента по перекрестной устойчивости изогенных рекомбинантных штаммов *E. coli* M17 (табл. 1) показали, что совмещение продукции микроцина типа В и колицина Е1 в штамме *E. coli* M17 (pPAL4) позволило получить стабильные микроциновые зоны подавления роста индикаторных культур на богатой среде (ТА).

При ежедневном пересеве смешанных культур в свежие среды поддерживается равное соотношение клеток *E. coli* M17 (pPAL5) и *E. coli* M17 (pPAL4). При этом состав среды не играет роли. Длительное культивирование смешанных культур без пересева приводит к формированию равновесного состояния, при котором поддерживается определенное соотношение штаммов: продуцента колицина Е1 *E. coli* M17 (pPAL4) и устойчивого к этому колицину *E. coli* M17 (pPAL5). Полного подавления одного штамма другим не происходит. Все эффекты, связанные с конкуренцией штаммов *E. coli* M17 (pPAL5) и *E. coli* M17 (pPAL4), были отмечены в глубокой стационарной фазе роста культур.

*Выживаемость рекомбинантных продуценов микроцина типа В в пищеварительном тракте.* Ранее нами была показана низкая выживаемость штамма – продуцента колицина и микроцина *E. coli* S5/98 (pColap) в пищеварительном тракте телят, находящихся на молочном вскармливании (Тараканов и соавт., 2005). Это предположительно объясняется высоким уровнем продукции колицина Е1 и гибелью клеток в этих условиях. Напротив, в пищеварительном тракте животных с устоявшимся пищеварением была отмечена высокая выживаемость и продолжительная персистенция микроциногенного штамма *E. coli* S5/98 (Тараканов и соавт., 2003). Исходя из результатов предыдущих опытов на животных, для настоящего эксперимента был выбран микроциногенный штамм *E. coli* M17 (pPAL5), устойчивый к колицину Е1.

Было проведено два опыта по одной и той же схеме, в каждом из которых участвовало по три теленка. Количество клеток *E. coli* в кишечном содержимом определяли перед применением препарата (фоновое содержание), в последний день приема (4-х суточный прием) и на 1, 3 и 5 дни отмены препарата. Учет проводили высевом на селективную для кишечных палочек среду Эндо без антибиотиков, а также среду Эндо с ампициллином (50 мкг/мл) и канамицином (50 мкг/мл) для обогащения штаммом *E. coli* M17 (pPAL5). Колонии *E. coli* M17 (pPAL5) диагностировали ПЦР с помощью праймеров, синтезированных к структурной части микроциновых генов. Результаты опыта представлены в таблице 2.

**Таблица 2. Количества и соотношения эшерихий в кишечнике телят при применении рекомбинантного штамма *E. coli* M17(pPAL5)**

| Исследование | Номера телят | Показатель         |                                                                       |                                                        |
|--------------|--------------|--------------------|-----------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
|              |              | общее количество   | количество клеток с фенотипом устойчивости к ампициллину и канамицину | относительное содержание <i>E. coli</i> M17 (pPAL5), % |
| Фоновое      | 1            | $3,55 \times 10^7$ | $1,35 \times 10^5$                                                    | -                                                      |
|              | 2            | $4,77 \times 10^7$ | $2,0 \times 10^4$                                                     | -                                                      |

|                                        |   |                    |                    |      |
|----------------------------------------|---|--------------------|--------------------|------|
| После 4-суточного применения препарата | 3 | $1,48 \times 10^8$ | $5,4 \times 10^7$  | -    |
|                                        | 1 | $1,3 \times 10^7$  | $6,53 \times 10^5$ | 5,0  |
|                                        | 2 | $7,73 \times 10^7$ | $1,31 \times 10^7$ | 16,9 |
|                                        | 3 | $2,24 \times 10^8$ | $1,25 \times 10^8$ | 55,8 |
| Сутки после отмены препарата:          |   |                    |                    |      |
| 1-е                                    | 1 | $5,0 \times 10^6$  | $1,3 \times 10^5$  | 2,6  |
|                                        | 2 | $4,6 \times 10^7$  | $1,55 \times 10^5$ | 0,3  |
|                                        | 3 | $4,05 \times 10^7$ | $2,65 \times 10^7$ | 65,4 |
| 3-и                                    | 1 | $6,2 \times 10^7$  | $2,25 \times 10^5$ | 0,36 |
|                                        | 2 | $1,22 \times 10^8$ | $5,05 \times 10^5$ | 0,4  |
|                                        | 3 | $2,0 \times 10^6$  | $6,55 \times 10^5$ | 32,7 |
| 5-е                                    | 1 | $1,0 \times 10^6$  | $6,0 \times 10^4$  | 6,0  |
|                                        | 2 | $1,8 \times 10^7$  | $3,0 \times 10^4$  | 0,17 |
|                                        | 3 | $<1,0 \times 10^5$ | $6,0 \times 10^4$  | 60,0 |

Из представленных данных видно, что задаваемый микроциногенный штамм *E. coli* M17 (pPAL5) сохраняется по меньшей мере до пяти суток в пищеварительном тракте телят. При этом наблюдается очень большая дисперсия в его содержании: от долей процента до 60% от всех выделенных эшерихий. У разных животных также отличается динамика изменения численности задаваемого штамма: она либо поддерживается на стационарном (высоком или низком) уровне, либо происходит резкое снижение титра сразу после отмены препарата. Можно предполагать, что эти различия связаны с особенностями резидентной микрофлоры каждого животного, которая, таким образом, оказывается значительной.

Для практических целей применения живых культур микроорганизмов можно рекомендовать разработку двух стратегий. По одной из них необходимо направленное формирование микрофлоры с первых часов жизни, которое уменьшит гетерогенность животных по этому показателю и сделает более предсказуемой динамику численности пробиотических штаммов в пищеварительном тракте. Наряду с преимуществами (предсказуемой динамикой), эта стратегия имеет недостаток, именно, при появлении патогена, способного преодолеть защитные свойства искусственно сформированной микрофлоры, он может распространиться сразу среди многих животных, вызвав массовое заболевание. Альтернативная стратегия может быть основана на признании начальной гетерогенности конкурентных условий в пищеварительном тракте отдельных животных и, соответственно, слабой предсказуемости результатов приживаемости того или иного задаваемого штамма. В этом случае выход может состоять в даче комбинированного пробиотического препарата, сочетающего несколько штаммов с различными свойствами, в том числе антагонистическими, с тем, чтобы наиболее конкурентоспособный в данных условиях штамм колонизировал кишечный тракт.

### ***Эффективность применения микроцикола при выращивании цыплят-бройлеров***

Предлагаемый нами пробиотик «Микроцикол» изготавливается на основе выделенного нами штамма *Escherichia coli* S5/98, природного продуцента

микроцина В5/98 (Тараканов, 2006). Поскольку микроцикол в птицеводстве не испытывался мы поставили целью изучить его влияние на микрофлору кишечника и зоотехнические параметры при откорме цыплят-бройлеров.

Проведено два опыта. Первый выполнен в комплексе с сотрудниками ВНИТИП (Егоров и др., 2004) в виварии ОНО «Загорское» ЭПХ ВНИТИП на 4-х группах бройлеров кросса Кобб-500 с суточного до 40-дневного возраста. Молодняк содержался в клеточных батареях Р-15 по 35 голов в группе без разделения по полу. Условия содержания (плотность посадки, фронт кормления и поения, температура, влажность, освещенность) были в пределах норм, рекомендуемых ВНИТИП. Кормление молодняка осуществлялось полноценными рассыпными комбикормами вволю. Птица контрольной группы получала только основной рацион (ОР), а молодняку 2, 3 и 4-й опытных групп ежедневно задавали по  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$  и  $5 \times 10^8$  колониеобразующих единиц (КОЕ)/голову штамма *E. coli* S 5/98 соответственно. В первые пять дней жизни цыплят пробиотик задавался в жидкой форме, а с 6 по 40 дни сухой препарат смешивали с комбикормом.

С целью оценки воздействия микроцикола на организм цыплят-бройлеров в 14- и 42-дневном возрасте из каждой группы убивали по три цыпленка и отбирали пробы содержимого кишечника и крови для микробиологических и гематологических исследований.

Микробиологические исследования, высеив и подсчет микроорганизмов проведены на селективных средах. Количество бифидобактерий определяли на среде Блаурока, лактобацилл – на модифицированной селективной среде Рогозы, кишечной палочки – на среде Эндо, сальмонелл – на висмут-сульфит агаре, энтерококков – на энтерококк агаре, дрожжей рода *Candida* – на кандида агаре, а бактерий рода *Proteus* на селективной среде для выделения протей. Все среды были отечественного производства, за исключением среды Рогозы, которую готовили в лаборатории.

В крови определяли количество эритроцитов, лейкоцитов и лейкоцитарную формулу (Карпуть, 1986); фагоцитоз по Кост и Стенко; СОЭ по методу Панченкова; гемоглобин в гемометре Сали (Клинич. диагн..., 1985); бактерицидную и лизоцимную активности крови по Смирновой и Кузьминой (1986) и Емельяненко (1980) соответственно.

При проведении опытов учитывали основные зоотехнические показатели, переваримость и доступность ряда питательных веществ комбикормов для бройлеров, а также химический состав мяса и печени цыплят общепринятыми методами.

Второй эксперимент проведен на птицефабрике «Спутник» Оренбургской области. В опыте было четыре группы цыплят по 20 голов в каждой. С суточного по четвертый день цыплята получали комбикорм-стартер, с 5 по 30 день – комбикорм ПК-5-00-38, а с 31 по 49 день скормливался комбикорм следующего состава (%): ячмень – 5; пшеница – 61,3; шрот соевый – 5; шрот подсолнечный – 10; мясо-костная мука – 2; рыбная мука – 3; масло растительное – 2; белково-минерально-витаминная добавка – 11; известняк – 0,6 и соль – 0,1. Птица 1-й контрольной группы получала только ОР, а цыплятам 2, 3 и 4-й опытных групп дополнительно задавали пробиотик «Микроцикол» из расчета 0,2; 0,3 и 0,4 г на 1 л питьевой воды соответственно. Во время опыта соблюдали рекомендуемые специалистами птицефабрики зоотехнические параметры. Птица имела постоянный доступ к корму и воде. Проводились также плановые

ветеринарные мероприятия. Опыт продолжался 49 дней. Для объективной оценки состояния бройлеров в возрасте 28 и 49 дней отбирали пробы крови для морфологических и биохимических исследований, еженедельно птицу взвешивали, а при убое провели определение химического состава мяса и субпродуктов.

*Влияние микроцикола на микрофлору кишечника.* Исследования показали, что в микрофлоре кишечника наблюдались значительные колебания между отдельными бройлерами в пределах групп, но, тем не менее, просматривались некоторые особенности. Так, после 14-дневного применения микроцикола существенных различий в численности бифидобактерий и лактобацилл не наблюдалось, но у птицы, получавшей максимальную дозу микроцикола, на 49% уменьшалось количество бифидобактерий и в 5,5 раза повышалась концентрация лактобацилл (табл. 3). Плотность популяций энтерококков в 3 и 4-й группах несколько снижалась, тогда как эшерихий возрастала в 2-2,9 раза. В этих же группах увеличивалось содержание сальмонелл и бактерий рода *Proteus*, а дрожжи рода *Candida* не обнаруживались.

После 40-дневного применения пробиотика количественные соотношения бактерий разных систематических групп несколько изменялись. Концентрация бифидобактерий у контрольной и опытной птицы была практически одинаковой, в то время как у бройлеров 3-й и 4-й групп заметно уменьшались уровни лактобацилл. Количества энтерококков и эшерихий в разных группах варьировали в пределах одного порядка, а численность сальмонелл у бройлеров 2, 3 и 4-й групп снижалась в 9,9; 4,6 и 1,6 раза соответственно. При этом дрожжи рода *Candida* не выявлялись, а уровни бактерий рода *Proteus* снижались в 3-6 раз.

**Таблица 3. Количество бактерий разных групп в химусе кишечника цыплят-бройлеров при даче микроцикола**

| Группа микроорганизмов                       | Возраст (дней) и группа цыплят-бройлеров |       |      |       |      |       |      |      |
|----------------------------------------------|------------------------------------------|-------|------|-------|------|-------|------|------|
|                                              | 14                                       |       |      |       | 42   |       |      |      |
|                                              | 1                                        | 2     | 3    | 4     | 1    | 2     | 3    | 4    |
| Бифидобактерии, $\times 10^9$                | 7,42                                     | 6,1   | 5,95 | 3,8   | 52,5 | 54,2  | 70,0 | 58,2 |
| Лактобациллы, $\times 10^9$                  | 1,62                                     | 3,12  | 2,61 | 8,93  | 14,3 | 26,4  | 0,28 | 1,5  |
| Энтерококки, $\times 10^6$                   | 6,4                                      | 10,2  | 3,6  | 2,6   | 3,57 | 1,48  | 1,15 | 6,9  |
| Эшерихии, $\times 10^8$                      | 14,0                                     | 40,4  | 38,1 | 28,6  | 0,87 | 0,47  | 0,1  | 0,95 |
| Сальмонеллы, $\times 10^4$                   | 5,87                                     | 19,55 | 88,1 | 151,9 | 2,97 | 0-0,3 | 0,65 | 1,85 |
| Бактерии рода <i>Proteus</i> , $\times 10^3$ | 8,0                                      | 10,5  | 36,3 | 36,0  | 6,1  | 1,0   | 2,0  | 1,0  |
| Дрожжи рода <i>Candida</i> , $\times 10^3$   | 1,7                                      | 2,6   | -    | -     | 1,4  | -     | -    | -    |

Примечание: – не обнаружены

Изучение фенотипических особенностей у эшерихий, выделенных из кишечного содержимого 2-недельных и 42-дневных цыплят, показало, что среди антагонистических штаммов, полученных от птицы опытных групп, фенотипические аналоги задаваемому штамму (продукция микроцина и устойчивость к нему) не обнаружены. Эти данные свидетельствуют о том, что персистенция задаваемого микроциногенного штамма *E. coli* S 5/98 в пищеварительном тракте цыплят ограничена.

Каковы же причины подобного феномена? Изучение антагонистической активности у выделенных из кишечника эшерихий против микроциногенного штамма *E. coli* S 5/98 показало, что практически все антагонисты подавляли (метод отсроченного антагонизма *in vitro*) задаваемый птице пробиотический штамм – продуцент микроцина В 5/98, т.е. устанавливающаяся в кишечнике цыплят популяция эшерихий обладает высоким потенциалом защиты к экзогенному введению продуцента микроцина. При этом после 40-дневного скормливания возрастающих доз микроцикола доля антагонистов в популяции эшерихий кишечника возрастала с 16% в контроле до 27,8 и 58,3% в 3 и 4-й группах соответственно и все они были способны подавлять задаваемый микроциногенный штамм *E. coli* S 5/98. Таким образом, результаты исследований позволяют заключить, что продуцент микроцина В 5/98 при скормливании цыплятам-бройлерам индуцирует селекцию в кишечнике птицы эшерихий-антагонистов, продуцирующих губительные для него антибиотические вещества. По своей природе эти субстанции скорее всего являются бактериоцинами, поскольку при постановке опытов отсроченного антагонизма на обедненной питательной среде (четвертной триптозный агар) ингибирования роста *E. coli* S 5/98 не происходило.

Что касается чувствительности популяций эшерихий к микроцину, продуцируемому штаммом *E. coli* S 5/98, то в возрасте 14- и 42 дней 80-100% и 91,7-98,3% от числа изученных культур и все антагонисты подавлялись микроцином В 5/98 и дача цыплятам возрастающих доз микроцикола увеличением в кишечнике доли устойчивых к нему эшерихий не сопровождалась.

*Влияние микроцикола на кроветворение и неспецифическую резистентность.* Исследования показали (1-й опыт), что включение в рацион цыплят-бройлеров возрастающих доз микроцикола сопровождалось повышением концентрации гемоглобина в крови (табл. 4). При этом количество лейкоцитов существенно не изменялось, но в лейкоцитарной формуле отмечалось изменение соотношений эозинофилов и псевдоэозинофилов. Так, доля эозинофилов с 7% (норма 6-10%) в контроле возрастала у птицы 3-й и 4-й групп до 17 и 14%, тогда как процент псевдоэозинофилов с 30 уменьшался до 18 и 19 (норма 24-30%) соответственно. Однозначное объяснение наблюдавшемуся факту дать довольно сложно, но можно предположить, что уменьшение доли псевдоэозинофилов было обусловлено некоторым снижением нейтрофилотворения в костном мозге, а увеличение процента эозинофилов в крови цыплят 3-й и 4-й групп было связано с аутоиммунным ответом организма птицы на скормливание высоких ( $1-5 \times 10^8$  КОЕ/голову) доз микроцикола.

Что касается неспецифической резистентности цыплят, то фагоцитарная, бактерицидная и лизоцимная активности сыворотки крови возрастали вместе с увеличением дозы препарата, т.е. четко проявился дозозависимый эффект.

Во втором опыте цыплята 2, 3 и 4-й групп получали микроцикол с водой, которая содержала 2, 3 и 4 млн. микробных клеток *E. coli* S5/98 в 1 мл. Как и в первом опыте, выпаивание препарата сопровождалось повышением в крови количества эритроцитов и концентрации гемоглобина ( $P < 0,05-0,02$ ), тогда как уровень лейкоцитов снижался, но оставался в пределах нормы (табл. 4).

**Таблица 4. Показатели крови цыплят-бройлеров, получавших пробиотик «Микроцикол»**

| Показатель                                  | Группа цыплят |                         |                         |                         |
|---------------------------------------------|---------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
|                                             | 1             | 2                       | 3                       | 4                       |
| <b>ПЕРВЫЙ ОПЫТ</b>                          |               |                         |                         |                         |
| Гемоглобин, г/л                             | 88,0±3,0      | 90,0±2,8                | 105,0±1,6 <sup>б</sup>  | 93,0±1,6                |
| Количество эритроцитов, 10 <sup>12</sup> /л | 3,1±0,01      | 3,2±0,03                | 3,4±0,27                | 3,0±0,01                |
| СОЭ, мм/ч                                   | 2,0±0,0       | 2,0±0,0                 | 2,0±0,0                 | 2,6±0,06                |
| Лейкоциты, 10 <sup>9</sup> /л               | 25,9±1,90     | 25,8±0,48               | 27,8±0,64               | 28,0±0,66               |
| Лейкоцитарная формула, %:                   |               |                         |                         |                         |
| базофилы                                    | 2             | 2                       | 2                       | 3                       |
| эозинофилы                                  | 7             | 10                      | 17                      | 14                      |
| псевдоэозинофилы                            | 30            | 25                      | 18                      | 19                      |
| лимфоциты                                   | 58            | 59                      | 54                      | 60                      |
| моноциты                                    | 3             | 4                       | 9                       | 4                       |
| Показатели неспецифической резистентности:  |               |                         |                         |                         |
| фагоцитарный индекс                         | 2,86±0,13     | 3,26±0,16               | 3,42±0,16 <sup>а</sup>  | 4,44±0,04 <sup>г</sup>  |
| фагоцитарная активность, %                  | 26,6±0,8      | 30,0±0,8 <sup>а</sup>   | 33,3±1,1 <sup>а</sup>   | 31,0±1,8                |
| бактерицидная активность, %                 | 20,9±1,7      | 25,1±2,5                | 46,9±2,7 <sup>г</sup>   | 47,9±2,0 <sup>г</sup>   |
| лизосимная активность, МКГ/мл               | 28,6±1,2      | 33,0±1,2 <sup>а</sup>   | 56,0±0,96 <sup>г</sup>  | 58,0±0,64 <sup>г</sup>  |
| Продолжение таблицы 4                       |               |                         |                         |                         |
| <b>ВТОРОЙ ОПЫТ</b>                          |               |                         |                         |                         |
| <i>Возраст 28 дней</i>                      |               |                         |                         |                         |
| Гемоглобин, г/л                             | 92,0±2,24     | 98,4±1,52 <sup>а</sup>  | 100,4±1,16 <sup>б</sup> | 98,8±0,81 <sup>а</sup>  |
| Эритроциты, 10 <sup>12</sup> /л             | 3,10±0,06     | 3,10±0,23               | 3,41±0,15               | 3,20±0,07               |
| Лейкоциты, 10 <sup>9</sup> /л               | 35,6±1,83     | 29,4±0,47 <sup>б</sup>  | 28,3±0,50 <sup>б</sup>  | 28,0±0,38 <sup>б</sup>  |
| Са, ммоль/л                                 | 2,07±0,04     | 2,13±0,02               | 2,11±0,03               | 2,10±0,01               |
| Р, ммоль/л                                  | 1,90±0,05     | 1,91±0,04               | 1,96±0,03               | 1,92±0,06               |
| Кислотная емкость, ммоль/л                  | 101,0±2,46    | 101,0±0,89              | 101,4±1,92              | 101,6±1,07              |
| Общий белок, ммоль/л                        | 37,76±0,75    | 37,74±0,72              | 38,02±0,81              | 37,60±0,50              |
| <i>Возраст 49 дней</i>                      |               |                         |                         |                         |
| Гемоглобин, г/л                             | 93,8±2,10     | 94,8±2,33               | 99,6±0,25 <sup>а</sup>  | 99,4±0,98 <sup>а</sup>  |
| Эритроциты, 10 <sup>12</sup> /л             | 3,08±0,07     | 3,20±0,16               | 3,29±0,11               | 3,19±0,06               |
| Лейкоциты, 10 <sup>9</sup> /л               | 41,38±2,31    | 30,31±0,97 <sup>а</sup> | 28,75±0,26 <sup>г</sup> | 29,82±0,50 <sup>б</sup> |
| Са, ммоль/л                                 | 2,06±0,03     | 2,11±0,03               | 2,20±0,03 <sup>б</sup>  | 2,13±0,03               |
| Р, ммоль/л                                  | 1,89±0,05     | 1,98±0,03               | 2,03±0,03 <sup>а</sup>  | 2,02±0,04               |
| Кислотная емкость, ммоль/л                  | 104,8±2,82    | 100,0±1,12              | 105,0±2,24              | 103,0±2,01              |
| Общий белок, ммоль/л                        | 36,67±0,56    | 36,82±0,61              | 38,90±0,62              | 38,76±0,60              |

Примечание: Здесь и далее достоверность разницы показана в сравнении с контролем: а – P<0,05; б – P<0,02; в – P<0,01; г – P<0,001.

Содержание общего белка в сыворотке и кислотная емкость крови существенно не изменялись, а уровни кальция и фосфора несколько повышались. Таким образом, установлено, что микроцикол увеличивает концентрацию гемоглобина в крови цыплят-бройлеров и их неспецифическую резистентность.

*Влияние микроцикола на зоотехнические параметры цыплят-бройлеров.* Применение микроцикола во всех испытанных в первом опыте дозах обеспечивало 100%-ную сохранность птицы, против 97,1% в контроле.

При этом разные дозы оказывали неодинаковое влияние на рост молодняка. При даче пробиотика из расчета  $1 \times 10^7$  КОЕ/ голову/день живая масса 28-дневных цыплят 2-й группы превосходила контроль на 1,6%. Увеличение дозы до  $1 \times 10^8$  КОЕ/голову в день повышало живую массу на 3,2%, тогда как при дальнейшем 5-кратном возрастании дозы пробиотика (4-я группа) ростстимулирующий эффект утрачивался и живая масса цыплят была на 1,5% ниже контроля.

Среднесуточные приросты живой массы молодняка за периоды 1-28, 29-40 и 1-40 дней варьировали в пределах 40,5-42,5 г; 70,7-76,5 г и 49,6-52,2 г соответственно и были максимальными у бройлеров 2-ой и 3-ей опытных групп, получавших пробиотик в интервале доз  $1 \times 10^7$ - $10^8$  КОЕ/голову в сутки (табл. 5).

*Таблица 5. Эффективность использования питательных веществ и прирост живой массы при включении в рацион микроцикола (Егоров и соавт., 2004)*

| Показатель                            | Группа    |           |                        |           |
|---------------------------------------|-----------|-----------|------------------------|-----------|
|                                       | 1         | 2         | 3                      | 4         |
| Сохранность, %                        | 97,1      | 100,0     | 100,0                  | 100,0     |
| Живая масса, г                        |           |           |                        |           |
| сутки                                 | 42        | 42        | 42                     | 42        |
| 28 дней                               | 1193±18,2 | 1212±23,7 | 1231±19,0              | 1176±15,6 |
| % к контролю                          | 100,0     | 101,6     | 103,2                  | 98,5      |
| 40 дней                               | 2041±35,3 | 2130±35,0 | 2131±33,0 <sup>a</sup> | 2024±26,8 |
| % к контролю                          | 100,0     | 104,4     | 104,4                  | 99,2      |
| Среднесуточный прирост живой массы, г |           |           |                        |           |
| 1-28 дней                             | 41,1      | 41,8      | 42,5                   | 40,5      |
| % к контролю                          | 100,0     | 101,7     | 103,4                  | 98,5      |
| 29-40 дней                            | 70,7      | 76,5      | 75,0                   | 71,5      |
| % к контролю                          | 100,0     | 108,2     | 106,1                  | 101,1     |
| 1-40 дней                             | 50,0      | 52,2      | 52,2                   | 49,6      |
| % к контролю                          | 100,0     | 104,4     | 104,4                  | 99,2      |
| Потребление корма                     |           |           |                        |           |
| 1 гол. за опыт, кг                    | 3,898     | 3,863     | 3,823                  | 3,786     |
| Затраты кормов на                     |           |           |                        |           |
| 1 кг прироста живой массы, кг         | 1,95      | 1,85      | 1,83                   | 1,91      |
| % к контролю                          | 100,0     | 94,9      | 93,9                   | 97,9      |
| Переваримость:                        |           |           |                        |           |
| протеина                              | 88,9      | 89,5      | 90,7                   | 89,2      |
| жира                                  | 79,1      | 80,1      | 80,4                   | 78,8      |
| Использование азота                   | 46,2      | 46,9      | 47,5                   | 46,3      |
| Доступность:                          |           |           |                        |           |
| лизина                                | 84,2      | 85,0      | 85,7                   | 84,4      |
| метионина                             | 87,1      | 87,4      | 87,9                   | 87,2      |

Продолжение таблицы 5

|                |      |      |      |      |
|----------------|------|------|------|------|
| Использование: |      |      |      |      |
| кальция        | 40,1 | 40,0 | 40,2 | 40,0 |
| фосфора        | 32,0 | 32,4 | 32,7 | 32,1 |

Что касается потребления корма, то у молодняка 2-й и 3-й опытных групп за период опыта оно было на уровне контроля или на 2,8% ниже в 4-й группе. Однако во всех опытных группах показатели конверсии корма были выше. Так, затраты кормов на 1 кг прироста живой массы за 40-дневный опытный период во 2, 3 и 4-й группах были ниже, чем в контроле, на 5,1; 6,1 и 2,1% или на 100, 120 и 40 г соответственно.

Из представленных данных можно сделать заключение, что использование микроцикола при откорме цыплят в течение 40 дней способствует повышению их сохранности, а также улучшению переваримости, доступности и конверсии основных питательных веществ кормов во всех группах. Привесы же и живая масса бройлеров повышались во 2-й и 3-й группах, получавших в рацион пробиотик в дозах  $1 \times 10^7$  и  $1 \times 10^8$  КОЕ/голову в день соответственно.

Результаты второго опыта показали, что микроцикол не оказал какого-либо отрицательного влияния на общее физиологическое состояние птицы. Цыплята опытных групп были активны и хорошо поедали корм. Сохранность птицы составила 90% в контроле, 94, 98 и 98% во 2, 3 и 4-й опытных группах соответственно.

Выпаивание пробиотика положительно отразилось на трансформации питательных веществ корма. Так, переваримость протеина, БЭВ и клетчатки с 77,8; 85,2 и 9,5% в контрольной группе возрастала до 84,2; 88,3 и 11,4% – во второй, до 88,1; 88,3 и 13,1% – в третьей и до 86,6; 90,0 и 13,2% – в четвертой группах соответственно. При этом коэффициенты использования азота, кальция и фосфора увеличивались с 57,8; 35,6 и 38,6% в первой группе, до 59,8; 40,0 и 46,7% – во второй, до 61,3; 47,6 и 46,9% – в третьей и до 61,7; 47,1 и 46,3% – в четвертой группах соответственно.

Дача пробиотика оказала стимулирующее влияние на продуктивность птицы. При убое бройлеров в 49-дневном возрасте их средняя живая масса в контрольной группе составила 1969 г, а во 2, 3 и 4-й группах она достигала 2365, 2526 и 2438 г и превосходила контроль на 20,1; 28,3 и 23,8% соответственно. Таким образом установлено, что по продуктивному действию выпаивание пробиотика существенно превосходит его дачу в составе комбикорма.

*Влияние микроцикола на химический состав и качество получаемой продукции.* Определение химического состава печени и грудных мышц 40-дневных цыплят-бройлеров показало, что у молодняка опытных групп наблюдалась тенденция к увеличению содержания в них сырого протеина (табл. 6). Эти данные свидетельствуют о том, что микроцикол способствует улучшению белкового обмена в организме цыплят-бройлеров и повышению качества мяса.

**Таблица 6. Химический состав печени и грудных мышц 40-дневных цыплят-бройлеров, % на воздушно-сухое вещество (1-й опыт)**

| Показатель    | Группа |   |   |   |
|---------------|--------|---|---|---|
|               | 1      | 2 | 3 | 4 |
| <i>Печень</i> |        |   |   |   |

|                                               |      |      |      |      |
|-----------------------------------------------|------|------|------|------|
| Сырой протеин                                 | 67,7 | 71,6 | 68,1 | 70,3 |
| Сырой жир                                     | 11,2 | 12,5 | 11,1 | 10,8 |
| Сырая зола                                    | 5,0  | 4,9  | 4,7  | 4,8  |
| <i>Грудные мышцы</i>                          |      |      |      |      |
| Сырой протеин                                 | 83,3 | 86,6 | 83,7 | 84,6 |
| Сырой жир                                     | 2,3  | 2,9  | 2,4  | 2,3  |
| Сырая зола                                    | 4,7  | 4,6  | 4,8  | 4,6  |
| Сырой протеин на естественную влажность (72%) | 23,3 | 24,2 | 23,4 | 23,7 |

Положительное влияние микроцикла на качество продукции нашло подтверждение и во втором опыте. В мясе бройлеров, получавших пробиотик, на 8,8-10,5% увеличивалось содержание протеина и на 7,5-8,4% уменьшался уровень жира. Белково-качественный показатель мяса с 9,7 в контроле возрастал до 10,1-10,3 в опытных группах (табл. 7).

Что касается субпродуктов (сердце, печень), то в них существенно ( $P<0,01-0,001$ ) снижалось содержание влаги и жира, тогда как уровень протеина во 2, 3 и 4-й опытных группах повышался на 38,1; 41,6 и 36% соответственно. В мышечном желудке увеличивалась концентрация жира ( $P<0,01$ ) и особенно сильно на 67,1; 84,9 и 57,2% возрастало его отложение в тканях кишечника бройлеров 2, 3 и 4-й групп соответственно. Производственная проверка эффективности применения препарата, проведенная на 12420 цыплятах, показала, что при использовании пробиотика падеж уменьшился на 6,9%, средняя живая масса одного бройлера увеличилась на 0,44 кг, а экономический эффект составил 98,7 тыс. рублей.

*Таблица 7. Химический состав мяса, субпродуктов, мышечных желудков и фарша кишечника 49-дневных цыплят-бройлеров, %*

| Показатель                          | Группа цыплят |                         |                         |                         |
|-------------------------------------|---------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
|                                     | 1             | 2                       | 3                       | 4                       |
| <i>Мясо (средняя проба)</i>         |               |                         |                         |                         |
| Влага                               | 68,73±0,38    | 68,65±0,3               | 68,40±0,14              | 68,41±0,14              |
| Протеин                             | 14,57±0,7     | 16,09±0,2               | 15,86±0,14              | 16,10±0,37              |
| Жир                                 | 16,02±0,3     | 14,79±0,08 <sup>а</sup> | 14,82±0,16 <sup>б</sup> | 14,68±0,21 <sup>б</sup> |
| Зола                                | 0,86±0,03     | 0,83±0,02               | 0,85±0,01               | 0,84±0,01               |
| Триптофан, мг/100г                  | 400,49±4,0    | 410,5±2,58              | 415,4±2,64 <sup>б</sup> | 412,2±1,70 <sup>а</sup> |
| Оксипролин, мг/100г                 | 41,26±0,3     | 40,7±0,26               | 40,5±0,45               | 40,4±0,35               |
| Белково-качественный показатель     | 9,7           | 10,1                    | 10,3                    | 10,2                    |
| <i>Субпродукты (сердце, печень)</i> |               |                         |                         |                         |
| Влага                               | 76,99±0,34    | 74,49±0,46 <sup>а</sup> | 74,0±0,19 <sup>г</sup>  | 74,62±0,19 <sup>г</sup> |
| Сухое вещество                      | 23,01±0,34    | 25,51±0,46 <sup>а</sup> | 25,99±0,19 <sup>г</sup> | 25,38±0,19 <sup>г</sup> |
| Протеин                             | 10,83±0,56    | 14,96±0,82 <sup>а</sup> | 15,33±0,22 <sup>г</sup> | 14,73±0,13 <sup>г</sup> |
| Жир                                 | 11,25±0,22    | 9,65±0,46 <sup>б</sup>  | 9,77±0,41 <sup>б</sup>  | 9,75±0,16 <sup>г</sup>  |
| Зола                                | 0,93±0,02     | 0,89±0,01               | 0,90±0,01               | 0,89±0,01               |
| <i>Мышечный желудок</i>             |               |                         |                         |                         |
| Влага                               | 70,28±0,15    | 70,07±0,24              | 69,92±0,21              | 70,16±0,17              |

|                       |            |                         |                         |                         |
|-----------------------|------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Сухое вещество        | 29,72±0,10 | 29,93±0,13              | 30,08±0,21              | 29,84±0,17              |
| Протеин               | 16,21±0,23 | 15,73±0,22              | 15,16±0,49              | 15,15±0,15              |
| Жир                   | 12,60±0,17 | 13,34±0,13 <sup>В</sup> | 14,02±0,31 <sup>В</sup> | 13,84±0,23 <sup>В</sup> |
| Зола                  | 0,90±0,01  | 0,86±0,006              | 0,84±0,006              | 0,85±0,007              |
| <i>Фарш кишечника</i> |            |                         |                         |                         |
| Влага                 | 73,75±0,32 | 67,34±0,54 <sup>Г</sup> | 67,49±0,50 <sup>Г</sup> | 65,97±0,34 <sup>Г</sup> |
| Сухое вещество        | 26,25±0,32 | 32,66±0,48 <sup>Г</sup> | 32,51±0,50 <sup>Г</sup> | 34,03±0,34 <sup>Г</sup> |
| Протеин               | 12,89±0,42 | 11,04±0,72              | 8,64±0,39 <sup>Г</sup>  | 13,64±1,24              |
| Жир                   | 12,47±0,13 | 20,84±0,58 <sup>Г</sup> | 23,06±0,34 <sup>Г</sup> | 19,60±0,68 <sup>Г</sup> |
| Зола                  | 0,88±0,01  | 0,78±0,01 <sup>Г</sup>  | 0,80±0,02 <sup>В</sup>  | 0,79±0,02 <sup>В</sup>  |

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что новый пробиотик «Микроцикол» является эффективным средством повышения продуктивности и улучшения качества мяса при выращивании цыплят-бройлеров. Максимальное продуктивное действие препарата достигается при его введении в питьевую воду из расчета 0,3 г на 1 л воды. Разработка защищена патентом Российской Федерации (Тараканов и соавт., 2005).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Хмель И. А. Микроцины – пептидные антибиотики энтеробактерий: генетический контроль синтеза, структура и механизм действия. Генетика. 1999, 31, 1: 5-16.
2. Хмель И. А., Метлицкая А. З., Фоменко Д. Е., Катруха Г. С., Басюк Е. И., Курепина Н. Е., Липасова В. А., Безруков В. М. Микроцины – новые пептидные антибиотики из энтеробактерий и генетический контроль их синтеза. Молекулярная биология. 1999, 33, 1: 113-119.
3. Asensio, C. and Perez-Diaz, J. C. A new family of low molecular weight antibiotics from enterobacteria. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1976, 69, 1: 7-14.
4. Тараканов Б. В., Яковлева А. А., Алёшин В. В. Характеристика энтеробактерий, продуцирующих микроцины – низкомолекулярные антибиотики. Микробиология, 2004, 73, 2: 188-194.
5. Groisman E.A., Casadaban M.J. Mini-mu bacteriophage with plasmid replicons for in vivo cloning and lac gene fusing. J. Bacteriol., 1986, 168, 1: 357-364.
6. Garrido M. C., Herrero M., Kolter R., Moreno F. The export of the DNA replication inhibitor microcin B17 provides immunity for the host cell. EMBO J. 1988, 7, 6: 1853-1862.
7. Tan Y., Riley M.A. Rapid invasion by colicinogenic Escherichia coli with novel immunity functions. Microbiology. 1996, 142, 8: 2175-2180.
8. Лившиц В.А., Чеснокова В.Л., Алёшин В.В., Сокуренок Е.В., Далин М.В., Кравцов Э.Г., Быков В.А. Штамм бактерий Escherichia coli M17/pColar для получения пробиотического препарата. Патент РФ №2144954. С12N1/21, А61К35/74. Заявл. 15.04.1998. Оpubл. 27.01.2000. БИПМ №3.
9. Шемчук Л.Ф. Стандартизация колибактерина. Автореферат дисс... к.б.н. М. 1983: 16с.
10. Herrero M., Moreno F. Microcin B17 blocks DNA replication and induces the SOS system in Escherichia coli. J. Gen. Microbiol. 1986, 132, 2: 393-402.

11. Тараканов Б.В., Алёшин В.В., Николичева Т.А. Полякова Л.Л. Конструирование рекомбинантного штамма *Escherichia coli* с колициномикроциновой активностью и исследование его воздействия на микрофлору кишечника телят. Труды регионального конкурса научных проектов в области естественных наук. Калуга: Полиграф-Информ, 2005, 8: 348-352.
12. Bishop L. J., Bjes E. S., Davidson V. L., Cramer W. A. Localization of the immunity protein-reactive domain in unmodified and chemically modified COOH-terminal peptides of colicin E1. J. Bacteriol., 1985, 164: 237-244.
13. Zhang S. P., Yan L. F., Zubay G. Regulation of gene expression in plasmid ColE1: delayed expression of the *kil* gene. J. Bacteriol. 1988, 170, 12: 5460-5467.
14. Тараканов Б. В., Алёшин В. В., Николичева Т. А., Комкова Н. М., Полякова Л. Л. Воздействие микроциногенного штамма *Escherichia coli* S 5/98 на микрофлору кишечника и здоровье телят. Труды регионального конкурса научных проектов в области естественных наук. Калуга: Эйдос, 2003, 4: 224-227.
15. Тараканов Б. В. Штамм бактерий *Escherichia coli*, используемый для производства пробиотика микроцикола В5/98. Патент на изобретение №2268297, С12N1/20, А61К35/74, С12R1/19. Заявл. 29.12.03., опубл. 20.01.2006. Бюл. №2.
16. Егоров И. А., Паньков П. Н., Разанов Б. Л., Егоров Т. В., Юхачева Н. А., Волкова Н. И. Отчет по теме: "Испытание пробиотика микроцикола в комбикормах цыплят-бройлеров". Сергиев Посад, 2004: 12с.
17. Карпуть И. М. Гематологический атлас сельскохозяйственных животных. Мн.: Ураджай. 1986: 108-111.
18. Клиническая и лабораторная диагностика в ветеринарии: Справочное издание. (И. П. Кондрахин, Н. В. Курилов, А. Г. Малахов и др.). М.: Агропромиздат., 1985: 57-68.
19. Смирнова О. В., Кузьмина Т. А. Определение бактерицидной активности сыворотки крови методом фотонейфелометрии. ЖМЭИ. 1966, 4: 8-11.
20. Емельяненко П. А. Методические указания по тестированию естественной резистентности телят. М.: 1980: 29с.
21. Тараканов Б. В., Никулин В. Н., Палагина Т. Е. Способ кормления цыплят-бройлеров. Патент на изобретение №2264126, А23К1/16. Заявл. 26.02.2004, опубл. 20.11.2005. Бюл. №32.

## НЕСПЕЦИФИЧЕСКАЯ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ И ПРОДУКТИВНОСТЬ ОТКАРМЛИВАЕМЫХ НА МЯСО БЫЧКОВ В ЗОНЕ С ПОВЫШЕННЫМ РАДИАЦИОННЫМ ФОНОМ

В.А. Галочкин, В.П. Галочкина

*Показано достижение более высокой продуктивности животных, резистентности и более высокой скорости выведения радиоактивного цезия из организма откармливаемых бычков при использовании нового отечественного антигипоксанта эпофена.*

### Введение

По состоянию на начало 2006 г. Россия по экологическому благополучию стоит на 72 месте в мире, далеко отстав от всех промышленно развитых стран. Около 70% населения нашей страны живет в экологически неблагоприятных зонах – земля, вода и воздух загрязнены продуктами промышленной, сельскохозяйственной и бытовой химии, продуктами утилизации отходов, сгорания топлива в автотранспорте, в угле-, нефте-, газо- и атомных электростанциях. Букет загрязнителей как минеральной (тяжелые металлы, включая радионуклиды), так и органической природы (от галогенов, нитратов, нитритов, пероксинитритов, никотина и алкоголя до широкого перечня лекарственных препаратов, гербицидов, пестицидов и многих других ксенобиотиков) исключительно богат и, естественно, отличается по отдельным регионам страны.

Санитарно-эпидемиологическими службами страны констатируются уже по очень большому перечню многократные превышения предельно допустимых концентраций (ПДК) токсических веществ во всех сферах окружающей среды и продуктах питания растительного и животного происхождения. Специфический драматизм нашей ситуации заключается в том, что это отмечается как раз в то время, когда у нас в стране произошел двукратный спад промышленного и сельскохозяйственного производства. Сейчас перед страной стоит задача удвоить темпы роста ВВП. Дело идет к тому, что в России грядет очередной крупный шаг на пути к глобальной экологической катастрофе, несмотря на то, что проблема экологической безопасности, казалось бы, сейчас находится под пристальным вниманием общественности, законодательной и исполнительной властей.

Системные макроэкологические проблемы формируют отягченные микроэкологические проблемы как у животных, так и у человека. У современных животных стали все чаще выявляться такие нежелательные качества как общее ослабление здоровья, пониженная устойчивость к заразным и незаразным заболеваниям, пониженная стресс-резистентность, неадекватная реакция даже на незначительно изменяющиеся условия и неблагоприятные воздействия внешней среды.

Генетический арсенал адаптационных возможностей организмов каждого вида строго детерминирован. Однако у высокопродуктивных животных направленная селекция существенно деформировала его. В ущерб ряду других жизненно важных функций оказался односторонне гипертрофированным процесс биосинтеза компонентов нужных человеку видов продукции. В связи с этим уменьшились функциональные приспособительные возможности таких животных к изменяю-

щимся условиям экологической системы и ослабили механизмы защиты от самых различных неблагоприятных воздействий. Как следствие, отрасль животноводства несет значительные потери и убытки от заболеваний и падежа животных, а население недополучает на свой стол высококачественные продукты питания (Бузлама и др., 1997).

В соответствии с санитарно-гигиеническими требованиями к качеству продовольственного сырья и пищевых продуктов (СанПин 2.3.2.1078-01) основную опасность в питании человека представляет содержание в продуктах питания загрязнителей химической и биологической природы. В настоящее время во внешней среде зарегистрировано более четырех миллионов токсических веществ и ежегодно их количество возрастает примерно на шесть тысяч. Решение глобальных макроэкологических проблем – не наша задача. Наша сфера приложения деятельности существенно более ограничена, но несколько не менее значима. Мы призваны помочь не планете вообще. Нам надлежит целенаправленно, адресно помочь конкретным животным, живущим в конкретной экологической обстановке нашей страны.

Тяжелые металлы – очень значимые факторы токсических индустриальных загрязняющих веществ окружающей среды, поражающие целый ряд органов. Наиболее уязвимы печень, почки, легкие, слизистая ЖКТ. Единым механизмом их действия общепризнана вызываемая ими перекисидация липидов, изменение антиоксидантного статуса клеток. Возрастает перекисное окисление липидов в печени, почках, сердце, уменьшается активность супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионтрансферазы, глутатионпероксидазы (и ряд других показателей ферментативной и неферментативной систем антиокислительной защиты организма), характеризующих пораженные ткани, что вызывает в них окислительный стресс. Введение в организм антиоксидантов-антигипоксантов до интоксикации металлами уменьшает перекисное окисление липидов и повышает сопротивляемость организма человека и животных.

Проблему улучшения здоровья животных, получения экологически чистой животноводческой продукции в экологически загрязненных и продолжающих форсированно загрязняться регионах, а иных в России, да и на всей планете, очень скоро уже практически не останется, мы считаем актуальной и заслуживающей серьезного внимания. Она действительно приобретает сегодня и будет приобретать в будущем все большую, поистине жизненную значимость для человека. Если человечество хочет выжить, то оно просто обязано уже сейчас научиться хотя бы несколько минимизировать пагубные последствия своей деятельности. Достигнуть этого, разумеется на определенном уровне загрязненности, возможно умением нейтрализовать и выводить из организма постоянно поступающую в него широчайшую гамму вредных веществ.

В стране и в мире в настоящее время повсеместно применяются способы борьбы с радионуклидами, основанные на использовании многочисленных энтеросорбентов – от натуральных полимеров (хитозаны) до синтетических (самой различной химической природы комплексообразующие соли, неспецифически связывающие тяжелые металлы, в том числе и радионуклиды). К ним относятся препараты, преимущественно связывающие цезий – ферроцин, бифеж, а также природные сорбенты: цеолиты, вермикулит, опоки, диатомиты, различные глины и т.д. На сегодняшний день АРСР, или аммоний-ферро-ферро-цианид, продолжает считаться одним из самым эффективных сорбентов. После Чернобыля этот препарат снова привлек к себе внимание. В

Германии он разрешен как кормовая добавка. В Норвегии в качестве цезийсвязывающих сорбентов в животноводстве используют бентонит и гексацианоферрат аммония в виде солевых лизунцов (Стрекозова, 2004).

Ферроцин - темносиний, мелкодисперсный порошок, который прочно связывает радиоактивные изотопы цезия, предупреждая их всасывание в кишечнике. Ферроцин малотоксичен, не всасывается и не изменяется в желудочно-кишечном тракте человека и жвачных животных. Эффективность ферроцианидных препаратов зависит от уровня загрязнения рациона радионуклидами цезия. Чем больше радионуклидность рациона, тем выше кратность снижения нуклида в молоке и мясе сельскохозяйственных животных, тем больше его выделяется с экскрементами. Еще более высокими адсорбционными свойствами обладает соль Нигровича (коллоидная форма берлинской лазури).

Создание специальных новых и совершенствование старых технологий, направленных на минимизацию поступления химических токсикантов в продукцию животноводства, позволит во многом решить проблему получения экологически чистой продукции в регионах с высоким уровнем содержания тяжелых металлов и радионуклидов. Поиск веществ, способных избирательно сорбировать различного рода экотоксиканты и быть одновременно экологически безопасными как для организма, так и для окружающей среды, является не только весьма актуальным, но и насущно необходимым. Если упомянутые комплексные соли железа, цеолиты и хитозан в настоящее время узаконены как адсорбенты радиоцезия, то примеров использования антигипоксанта эпофена с целью элиминации тяжелых металлов, радиоцезия и радиостронция в литературе не встречается. Мы считаем, что применение любых, даже самых эффективных энтеросорбентов, в принципе не способно радикально решить проблему загрязнения окружающей среды. Это глобальная проблема, решается она на уровне различных звеньев экологической цепи: земля – растения – животные – человек. Применяя даже самые специфические, высокоэффективные энтеросорбенты, которые, кстати, еще надлежит создать, человечество решает проблему только паллиативно. То есть, выводя радионуклиды из организма человека и животных, с помощью такого подхода невозможно элиминировать загрязнитель из экологической цепи, поскольку он, пройдя желудочно-кишечный тракт транзитом, снова возвращается на землю, оттуда вновь попадает в продукты растениеводства для человека и животных, и опять с кормами в продукты животноводства и нам на стол.

Теоретически более правильный подход к решению проблемы мы видим на иных путях. Во-первых, необходимо связать радионуклиды в организме животного в метаболически инертные комплексы, которые будут неспособны для ассимиляции ни растениями, ни микроорганизмами, ни животными. Тем самым мы исключаем рециклинг загрязнителя. Во-вторых, нужно активизировать эндогенные системы организма для борьбы с пагубными последствиями загрязнителя. Иными словами, успех может быть достигнут только при комплексном подходе к решению проблемы.

На первом этапе мы сочли оправданным и правомочным испытать для этих целей новый отечественный препарат, обладающий антигипоксантами активностью. Антигипоксантами это вещества, призванные помочь организму в условиях кислородной недостаточности - гипоксии. Гипоксия возникает далеко не только высоко в горах или глубоко в морях. Современная биологическая наука насчитывает 7 типов различных гипоксий. Это и любые откло-

нения работы сердечно-сосудистой и дыхательной систем, и физические перегрузки, это жизнь и при очень высоких, и при очень низких температурах. С биохимических позиций это любое отклонение от нормы тканевого дыхания (производство АТФ и транспорт электронов по цитохромной цепи). Это любые нарушения соотношений процессов анаэробного (гликолиза), аэробного (цикла трикарбоновых кислот) и прямого (пентозофосфатного пути) превращения углеводов. Как видим, все важнейшие анаболические и катаболические пути и циклы организма и сходятся, и начинаются на этой центральной метаболической оси. На рибосомальной цитохромной цепи гепатоцитов также сконцентрированы и основные ферменты элиминации из организмов всех ксенобиотиков, включая радионуклиды – это монооксигеназная система с ее центральным компонентом – цитохромом Р – 450 (Кургалюк, 2001, 2002; Лукьянова, 1997, 2000).

В 2003 году в России официально зарегистрирована медицинская биологически активная добавка в питании людей – «Эпофен» (фирма «Иглессия». Препарат чрезвычайно интересен и не вполне расшифрован по физиолого-биохимическому механизму действия в организме. На сельскохозяйственных животных не испытан.

Для решения поставленной задачи мы и избрали эпофен – синтетический препарат, представляющий собой соединение, близкое по химической структуре к убихинону (коэнзим Q<sub>10</sub>). Полифенольная природа и наличие специфических тиоловых, гидроксильных и окси групп на фенольном скелете обеспечивают его отличную антиоксидантную активность, которая всего на 20 % ниже таковой супероксиддисмутазы. Препарат обладает высокой антигипоксантной активностью, вследствие его способности челночного курсирования и транспорта протонов от основных продуцентов восстановленных эквивалентов на цитохромную цепь. Эпофен оказывает шунтирующее действие на стадии образования молочной кислоты из пировиноградной кислоты, образуя ацетил КоА, который затем вовлекается в цикл трикарбоновых кислот. Ее действие на мышцы знакомо всем, особенно после длительных физических нагрузок. Эпофен на молекулярном уровне облегчает тканевое дыхание в условиях гипоксии за счет способности непосредственно переносить восстановленные эквиваленты к ферментным системам, использующим в качестве переносчика убихинон. Эпофен многократно компенсирует недостаток убихинона в условиях гипоксии, т.к. содержит большое количество функционально активных центров. Таким образом, препарат восстанавливает деятельность митохондриальной дыхательной цепи при наличии повреждений на ее участках. Проявление на тканевом уровне описанных выше молекулярных механизмов действия эпофена на клетки заключается в снижении потребления тканями кислорода, его более экономном расходовании в условиях гипоксии.

Гипоксия определяется сложной динамикой, вовлеченностью широкого спектра функционально-метаболических систем, множественностью лимитирующих этот процесс участков. Однако, независимо от вида гипоксии, в основе характерных для всех видов гипоксических нарушений лежит невозможность основной энергопродуцирующей системы - процессов митохондриального окислительного фосфорилирования к продукции АТФ. Как следствие, дефицит энергии активирует свободнорадикальное окисление в клетке. Происходит это по двум причинам. Во-первых, уже сам дефицит энергии активирует свободнорадикальное окисление, а свободные радикалы, в свою очередь, при их избытке, вызывают метаболи-

ческий стресс. И во-вторых, при дефиците энергии происходит отклонение от физиологически нормального соотношения оксидантного и оксигенантного путей окисления кислорода. В организме основной продуцент сверхреакционноспособных радикалов кислорода это одноэлектронный оксигенантный путь. В норме по этому пути идет не более 5 % окисляемого кислорода. А при малейшем увеличении этого процента отмечается свободнорадикальный взрыв и, как следствие, метаболический стресс (Лукиянова и др., 1982; Скулачев, 1994; Кондрашова и др., 1997; Малышев, Манухина, 1998).

Эпофен в настоящее время является практически единственным в мире синтетическим препаратом антигипоксического действия, непосредственно влияющим на оптимизацию работы митохондрий и повышающим эффективность тканевого дыхания. Этот отечественный антигипоксикант относится к классу редокс-полимеров. Полимеризированный фенольный комплекс проявляет высокую антирадикальную активность, препятствует развитию реакций свободно-радикального окисления и образованию перекисей липидов. Тиосульфатная группировка обладает выраженным антиоксидантным действием, стимулирует разрушение продуктов перекисного окисления липидов путем акцепции и детоксикации свободных радикалов, разрушения или инактивации органических и неорганических перекисей. Препарат обладает высокой электрон-объемной емкостью, связанной с полимеризацией фенольных ядер в орто-положении. Его антигипоксический эффект связан, в первую очередь, с наличием в его структуре полифенольного хинонового компонента, участвующего в дыхательной цепи переноса электронов. Эпофен непосредственно в митохондриях взаимодействует с ферментами дыхательной цепи, поддерживая высокий уровень тканевого дыхания и эффективность аэробных процессов в условиях гипоксии. Антигипоксическое действие эпофена осуществляется в результате шунтирования транспорта электронов в дыхательной цепи митохондрий. На сегодняшний день в медицинской практике используются как наиболее эффективные и у нас в стране, и за рубежом всего два отечественных и западных антигипоксиканта: цитохром С и убихинон (коэнзим Qq). Эффективность их ограничена трудностями преодоления клеточных мембран. Для успешного лечения необходимо вводить значительные дозы препаратов, что очень дорого и нередко сопровождается аллергическими реакциями. С помощью эпофена предотвращается деструкция липидного слоя клеточных мембран, восстанавливается их проницаемость и трансмембранный транспорт ионов, повышается активность цикла Кребса. Препарат непосредственно на митохондриальной мембране взаимодействует с ферментами дыхательной цепи, поддерживая высокий уровень тканевого дыхания и эффективность аэробных процессов в условиях гипоксии. С другой стороны, на рибосомальной цитохромной цепи гепатоцитов также сконцентрированы и основные ферменты элиминации из организмов всех ксенобиотиков, включая радионуклиды. Подготовка к их элиминированию из организма осуществляется в микросомальной фракции гепатоцитов, в полиферментной монооксигеназной системе железосодержащего цитохрома Р-450. Там осуществляется дезалкилирование боковой цепи, если таковая имеется, и конъюгирование с сульфатами или глюкуроновой кислотой. После конъюгации жирорастворимые соединения становятся водорастворимыми, покидают внутриклеточное пространство и выводятся из организма с мочой (Agani et al., 2000).

Наша рабочая гипотеза ускорения процесса выведения радионуклидов из организма перед сдачей откормленных бычков на мясокомбинат основывается не на способности эпофена участвовать в реакциях непосредственного комплексообразования с радионуклидами (в нашем конкретном случае это цезий-137), в результате которого образуются нетоксичные, метаболически инертные комплексы, выводимые из организма почками. Нельзя отнести его и к самым типичным препаратам, используемым в настоящее время во всем мире в качестве сорбирующих средств и способствующих транзитному прохождению радионуклидов по желудочно-кишечному тракту. Все препараты антиоксидантно-антигипоксанта действия, содержащие фенольные остатки в своей молекуле, не обладают подобным свойством. Однако, все они являются активными компонентами в составе ферментативных и неферментативных механизмов антиоксидантно-антирадикальных систем защиты организма, стимулирующих экономию и аккумуляцию восстановленного внутриклеточного глутатиона в печени. Все препараты этой химической природы, в той или иной степени причастны к активации микросомальной цитохромоксидазной системы элиминации из организма ксенобиотиков любой химической природы – и органической, и минеральной.

Эпофен, являясь адаптогенным препаратом, по нашей стартовой рабочей гипотезе способен выполнять одновременно четыре функции: 1) самостоятельной нейтрализации продуктов перекисного окисления липидов и свободных радикалов; 2) ингибирования образования свободных сверхреакционных радикалов кислорода путем активации транспорта электронов по митохондриальной цепи переноса электронов и производства АТФ; 3) активации антиоксидантно-антирадикальной системы защиты организма, что позволит организму самому активнее мобилизовывать свои эндогенные ресурсы на борьбу и на смягчение вызываемых радионуклидами пагубных последствий в виде инициации процессов перекисидации липидов и продукции свободных радикалов; 4) активации микросомальной монооксигеназной системы, во главе с цитохромом Р – 450, ответственной за элиминацию и самого радионуклида, и продуктов, вызываемых его действием.

### **Материал и методы**

В 2006 году поиск способов выведения радионуклидов из организма и, следовательно, снижения их концентрации в мясе, заключался в использовании нового отечественного препарата антиоксидантно-антигипоксанта направленного действия – эпофена. Эксперимент проведен на двух группах откармливаемых на мясо бычков, по 12 клинически здоровых животных в группе, в СХПК им. Ленина Новозыбковского района Брянской области с высоким фоном радиоактивности. Продолжительность эксперимента три месяца, плотность радиоактивного загрязнения на территории этого хозяйства в настоящее время еще продолжает составлять  $20 - 40 \text{ Си} / \text{км}^2$ , что по современной классификации относится к зоне с высоким радиационным фоном. Контрольная группа находилась на хозяйственном рационе, сбалансированном по основным питательным веществам в соответствии с общепринятыми зоотехническими нормами, опытная группа получала с первого дня постановки на откорм до его завершения тот же самый основной рацион, но обогащенный эпофеном,

из расчета ежесуточного потребления каждым животным 1 г данного препарата.

Объективная оценка адаптационных резервов организма на молекулярном уровне, состояние антиоксидантной защиты, механизмы неспецифических реакций на неблагоприятные воздействия внешней среды могут быть весьма успешно оценены характеристикой тиол-дисульфидной системы. Тиол-дисульфидное соотношение (ТДС), т.е. отношение суммы сульфгидрильных групп к дисульфидным в сыворотке крови служит важным регуляторным параметром и, одновременно, мобильным диагностическим тестом оценки неспецифической резистентности и, следовательно, стрессустойчивости организма. Оно может наиболее информативно характеризовать «буферную емкость» антиоксидантно-антигипоксанта системы как в норме, так и при патологии. Наше повышенное внимание к этому соотношению и отнесение его к числу важнейших регуляторных параметров организма человека и животных обусловлено тем обстоятельством, что тиоловые соединения (как низко-, так и высокомолекулярные), благодаря своей способности быстро, но обратимо окисляться, оказываются наиболее чувствительными к неблагоприятным воздействиям самой различной природы и интенсивности. При большинстве патологий инфекционной и неинфекционной природы, в том числе и аллергических состояниях, и радиационном поражении и т.д., однозначно отмечается снижение содержания SH-групп и повышение концентрации SS-групп. Тяжесть заболевания, периоды его обострения, воздействие неблагоприятных факторов внешней среды, стрессовые ситуации у здоровых людей и животных коррелируют со степенью снижения тиол-дисульфидного отношения. Динамика и величина изменений тиол-дисульфидного отношения являются отражением развития адаптивной реакции и позволяют непосредственно оценить уровень неспецифической резистентности организма и его способность противостоять комплексу стрессогенных факторов.

В связи с тем, что первая ответная реакция организма на избыточное попадание в него радионуклидов – выброс свободных радикалов, а первым лимитирующим фактором в процессе их нейтрализации является глутатион, мы уделили пристальное внимание показателям, характеризующим состояние антиоксидантно-антирадикальной системы и соотношению окисленных и восстановленных форм сульфгидрильных групп (тиол-дисульфидное соотношение). В крови подопытных животных определяли: внеклеточную концентрацию восстановленного и окисленного глутатиона (Lawtence, Burk, 1976; Thannhauser et al., 1984); концентрацию малонового диальдегида (Bindoli, 2005); концентрацию гемоглобина (цианметгемоглобиновым методом с реагентом Драбкина); ТДС – тиол-дисульфидное соотношение (SH / SS).

Продолжительность эксперимента – 3 месяца. Кровь брали в начале, середине и конце опыта. На протяжении всего опыта проводили мониторинг по зараженности радионуклидами всех видов кормов и прижизненной оценке радиоактивности животных. После убоя животных на мясокомбинате была определена радиоактивность парной туши.

### **Результаты и обсуждение**

Приведенный в таблицах 1 и 2 экспериментальный материал по совокупности зоотехнических и физиолого-биохимических показателей однознач-

но свидетельствует о преимуществах предлагаемого способа (опытная группа) выращивания откармливаемых на мясо бычков перед традиционным (контрольная группа). Бычки опытной группы имели лучший прирост живой массы за весь период опыта на 17 % (табл. 1).

**Таблица 1. Влияние скармливания эпофена на прирост живой массы откармливаемых бычков, кг**

| Время исследования                                | Масса | 1 группа (контрольная),<br>(n=12) | 2 группа (опытная),<br>(n=12) |
|---------------------------------------------------|-------|-----------------------------------|-------------------------------|
| Начало опыта                                      |       | 298,33±8,42                       | 305,83±6,21                   |
| Середина опыта                                    |       | 338,33±8,95                       | 358,33±5,48                   |
| Конец опыта                                       |       | 357,50±9,38                       | 375,00±6,57                   |
| Общий прирост живой массы за 85 дней эксперимента |       | 59.2 (694 г/сутки)                | 69.2 (800 г/сутки)            |
| % к контролю                                      |       | 100                               | 117                           |

По показателям, характеризующим тиол-дисульфидную и антиоксидантную системы (табл. 2 и рис. 1), также следует вывод о повышении адапционно-защитных функций и буферной емкости антиоксидантной системы опытных животных в сравнении с контрольными. Этот вывод на биохимическом уровне аргументируется снижением концентрации в крови малонового диальдегида и дисульфидных групп, при одновременном повышении активности глутатинпероксидазы первого типа и концентрации сульфгидрильных групп.

Транспортные и предубойные потери живой массы подопытных бычков мы рассчитывали как отношение живой массы при взвешивании животных на Брянском мясокомбинате после транспортировки и предубойной выдержки к живой массе перед транспортировкой (в СХПК им Ленина, Новозыбковского района), выраженное в процентах. Описанные физиолого-биохимические изменения в организме животных опытной группы явились причиной существенно меньших потерь живой массы при транспортировке и предубойном содержании бычков на мясокомбинате – потери живой массы у опытных животных составили 2,21±0,3 кг, а у контрольных 3,12±0,83 кг, что на 29% меньше по сравнению с контролем.

**Таблица 2. Влияние скармливания эпофена на активность глутатионпероксидаз и тиол-дисульфидный статус организма откармливаемых на мясо бычков**

| Группы             | ГПО-1   | ГПО-2  | МДА         | Гемоглобин  | Низкомолекулярные SH и SS группы |              |      |
|--------------------|---------|--------|-------------|-------------|----------------------------------|--------------|------|
|                    |         |        |             |             | Внеклеточные                     |              |      |
|                    |         |        |             |             | SH                               | SS           | ТДС  |
| Контрольная группа | 312 ±48 | 545±70 | 2.89±0.41   | 160.4±10.3  | 0.547±0.09                       | 0.238±0.06   | 2.29 |
| Опытная группа     | 460 ±61 | 565±81 | 2.30 ± 0.44 | 159.3 ± 6.5 | 0.615 ± 0.04                     | 0.201 ± 0.05 | 3.06 |

|              |     |     |    |    |     |    |     |
|--------------|-----|-----|----|----|-----|----|-----|
| % к контролю | 147 | 104 | 80 | 99 | 112 | 84 | 134 |
|--------------|-----|-----|----|----|-----|----|-----|

Примечание: ГПО-1 – глутатионпероксидаза селенсодержащая, мкм НАДФ окисленного/мин./г. гемоглобина, субстрат – перекись водорода; ГПО-2 – глутатионпероксидаза селеннесодержащая (глутатионтрансфераза), мкм НАДФ окисленного/мин./г. гемоглобина, субстрат – гидроперекись терт-бутила; МДА – малоновый диальдегид, мкм/мл плазмы крови; гемоглобин – грамм/литр крови; SH – низкомолекулярные сульфгидрильные группы (глутатион восстановленный + цистеин), мкм/мл; SS – низкомолекулярные дисульфидные группы (глутатион окисленный + цистин), мкм/мл; ТДС – тиол-дисульфидное соотношение (SH / SS).

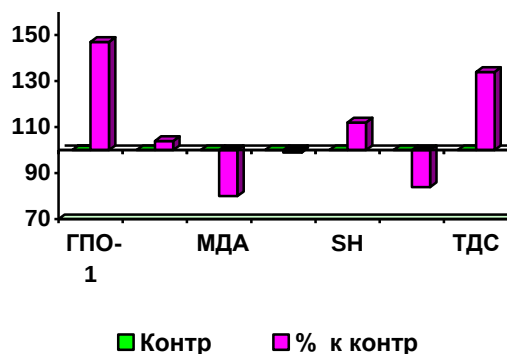


Рис.1. Влияние скармливания эпофена на активность глутатионпероксидаз и тиол-дисульфидный статус организма откармливаемых на мясо бычков (% к контролю)

По данным дозиметрических исследований Новозыбковской и Брянской ветеринарных радиометрических станций, эпофен способен эффективно выводить из организма радиоактивный цезий-137. Содержание радионуклида в парной туше в сравнении с контрольными животными в группе с эпофеном было на 23 % меньше.

### Заключение

По изученному комплексу зоотехнических и физиолого-биохимических показателей бычки опытной группы имели преимущество перед контрольной группой. По показателям, характеризующим тиол-дисульфидную и антиоксидантную системы (активность ферментов глутатионпероксидазы и глутатионтрансферазы, концентрация малонового диальдегида, гемоглобина, количество восстановленного и окисленного глутатиона) также следует вывод о повышении неспецифической резистентности, буферной емкости антиоксидантной системы и, следовательно, адаптационно-защитных функций у опытных животных в сравнении с контрольными. Введение в рацион антигипоксанта эпофена благотворно сказалось на состоянии защитных сил организма животных. Достоверные изменения в «эпофеновой» группе отмечены по активности глутатионпероксидазы, величины которой на 47 % превосходили значения, присущие контрольным животным. Концентра-

ция малонового диальдегида была на 20 % ниже, что подтверждает снижение интенсивности процессов перекисного окисления липидов и торможение процессов избыточного и пагубного образования свободных радикалов, то есть, эпофен работает как антиоксидант. Вследствие повышения концентрации низкомолекулярных сульфгидрильных групп на 12 % и одновременного снижения на 16 % низкомолекулярных дисульфидных групп, тиол-дисульфидное отношение существенно и достоверно повысилось на 34 %. Это также подтверждает способность эпофена предотвращать окислительный метаболический стресс в организме бычков.

Таким образом, анализ этой группы критериев также подтверждает вывод о повышении неспецифической резистентности, буферной емкости антиоксидантной системы и, следовательно, адаптационно-защитных функций у опытных животных в сравнении с контрольными при добавлении к скормливаемому рациону 1 г эпофена ежесуточно на протяжении 3 месяцев. Описанные величины физиолого-биохимических показателей привели к тому, что прирост живой массы у опытной группы животных за весь период эксперимента был на 17 % выше, чем в контроле. Эпофен в данном эксперименте показал, что он способен оказывать адаптогенный, антистрессовый эффект. Транспортные потери живой массы животных прямым образом связаны со стрессированием животных во время перевозок. В «эпофеновой» группе снижение живой массы при взвешивании в хозяйстве перед отправкой на Брянский мясокомбинат и взвешивании на мясокомбинате (расстояние от хозяйства до мясокомбината 250 км) было на 29 % меньше, чем в контроле.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бузлама В.С., Рецкий М.И., Рогачева Т.Е. Методическое пособие по изучению процессов перекисного окисления липидов в системе антиоксидантной защиты организма у животных. Воронеж, 1997: 350с.
2. Кондрашова М.Н., Сирота Т.В., Темная А.В. и др. Обратимая организация митохондрий в ассоциаты как фактор регуляции дыхания. Биохимия. 1997, 62: 154-163.
3. Кондрашова М.Н. Трансаминазный цикл окисления субстратов в клетке как механизм адаптации к гипоксии. Фармакологическая коррекция гипоксических состояний. М., 1989: 51-70.
4. Кургалюк Н. Н., Оксид азота как фактор адаптационной защиты при гипоксии. Успехи физиологических наук, 2002, 33, 4: 65-79.
5. Кургалюк Н.Н., Влияние модификации продукции оксида азота на состояние системы антиоксидантной защиты и перекисного окисления липидов в крови и тканях крыс с разной резистентностью к гипоксии. Физиол. журн. Укр. 2001, 47: 52-59.
6. Лукьянова Л.Д., Биоэнергетическая гипоксия: понятие, механизмы и способы коррекции. Бюл. эксперим. биологии и медицины. 1997, 124: 244-254.
7. Лукьянова Л.Д., Современные проблемы гипоксии. Вестн. РАМН. 2000, 9: 3-12.
8. Лукьянова Л.Д., Балмуханов Б.С., Уголев АЛ. Кислородзависимые процессы в клетке и ее функциональное состояние. М.: Наука, 1982: 300 с.

9. Малышев И.Ю., Манухина Е.Б. Стресс, адаптация и оксид азота. Биохимия, 1998, 63: 992-1006.
10. Скулачев В.П. Снижение внутриклеточной концентрации O<sub>2</sub> как особая функция дыхательных систем клетки. Биохимия, 1994, 59: 1910-1912.
11. Стрекозова Е.Н. Влияние хитозана и ферроцина на миграцию цезия-137 и стронция-90 в организме, рост и резистентность телят. Автореф. дисс... к.б.н., Дубровицы, 2004.
12. Agani F.H. et al. The role of mitochondria in the regulation of hypoxia-inducible. Factor 1 expression during hypoxia. J. Biol. Chem., 2000, 275: 863-867.
13. Bindoli A. Lipid peroxidation in mitochondria. Free Radical Biology & Medicine, 2005, 5: 247-261.
14. Lawrence R.A., Burk R.F. Glutathione peroxidase activity in selenium – deficient rat liver. Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1976, 71, 4: 952-958.
15. Thannhauser T.W., Y. Konishi, H.A. Scheraga. Sensitive quantitative analysis of disulfide bonds in polypeptides and proteins. Analytical Biochemistry, 1984, 138, 1:181-188.

### **ВЛИЯНИЕ СКАРМЛИВАНИЯ ПРЕПАРАТА IFO 6 ЕТ НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ЗАЩИТНЫХ МЕХАНИЗМОВ ОРГАНИЗМА ЦЫПЛЯТ-БРОЙЛЕРОВ**

*Е.В. Крапивина, В.Н. Шалегин (Брянская ГСХА)  
В.А. Галочкин (ВНИИФБиП с.-х. животных )*

#### **Введение**

Использование жиров в рационах цыплят-бройлеров повышает интенсивность перекисления липидов и свободнорадикальную активность в тканях, сопряженность окисления и фосфорилирования в митохондриях. При использовании этоксихина интенсивность этих негативных процессов резко снижается (Двинская, 1977). Активизация свободнорадикального перекисления липидов возникает и при действии различных неблагоприятных факторов (ионизирующее излучение, стрессы), что приводит к функциональным нарушениям в органах и тканях. Препарат IFO 6 ЕТ производится ООО «Ифохим» и является гидрированным аналогом этоксихина, но по своим антиоксидантным качествам может превосходить его.

Целью исследования являлось изучение влияния скармливания препарата IFO 6 ЕТ на функциональную активность защитных механизмов организма цыплят-бройлеров и их рост.

#### **Материал и методы**

Для эксперимента на птицефабрике ОАО «Снежка» методом групповых аналогов были созданы 4 группы цыплят бройлеров по 300 голов в каждой: 1 группа – контрольная, 2, 3 и 4 – опытные. Все подопытные цыплята получали основной рацион (ОР), который был составлен с учетом живой массы,

возраста и сбалансирован по основным питательным и биологически активным веществам согласно принятым нормам. В рацион цыплят 2, 3 и 4 опытных групп с 5- до 42-суточного возраста дополнительно включали препарат ИФО 6 ЕТ в дозах 20 мг/кг, 70 мг/кг и 200 мг/кг комбикорма соответственно. Содержание подопытных цыплят-бройлеров соответствовало ветеринарно-зоогигиеническим требованиям. Для оценки роста и физиологического состояния птицу перед убоем взвешивали (индивидуально по 100 голов из группы) и брали у цыплят-бройлеров пробы крови из яремной вены (после голодной выдержки).

Количество лейкоцитов и эритроцитов в крови подсчитывали в камере Горяева, лейкоцитарную формулу - в мазках, окрашенных по Романовскому-Гимза. Фагоцитарный показатель (ФП, %) рассчитывали как процент нейтрофилов, способных к поглощению частиц латекса. Фагоцитарный индекс (ФИ, у.е.) – среднее число частиц латекса, поглощенных одним активным нейтрофилом, абсолютный фагоцитоз крови (АФ,  $10^9/\text{л}$ ) – общее количество частиц латекса, поглощаемое нейтрофилами в литре крови (Чумаченко и др., 1990). Функционально-метаболическую активность нейтрофилов оценивали по результатам реакции восстановления нитросинего тетразолия (Шубич и др., 1978, 1980). Индекс активации нейтрофилов (ИАН) вычисляли согласно инструкции "Риакомплекс" по использованию НСТ-тест набора. Поглотительную способность нейтрофилов (ФП, %, ФИ, у.е., АФ,  $10^9/\text{л}$ ) и активность их оксидазных систем (+НСТ, %, ИАН) оценивали в двух состояниях: базальном (баз.) - в свежеснятой крови стабилизированной гепарином, и стимулированном (стим.) - после внесения в пробы крови зимозана, что моделирует условия бактериального заражения и характеризует адаптационные резервы поглотительной и микробицидной способности нейтрофильных гранулоцитов (Хаитов и др., 1995). Кислородонезависимую микробицидность нейтрофилов периферической крови оценивали по содержанию в них катионных белков по методу Жибинова (1983), рассчитывая средний цитохимический коэффициент (СЦК) по формуле, предложенной Макаревичем (1988). Содержание популяции Т-лимфоцитов (Е-РОЛ, %) определяли с помощью реакции розеткообразования лимфоцитов с эритроцитами барана, В-лимфоцитов (М-РОЛ, %) - с эритроцитами мыши (Понякина и др., 1982). Субпопуляции иммунорегуляторных Т-лимфоцитов (теофиллинрезистентных), обладающих преимущественно хелперной (Е-РОЛ<sub>тр</sub>, %) и супрессорной (Е-РОЛ<sub>тс</sub>, %) активностью (теофиллинчувствительных), - в тесте с теофиллином (Петров и др., 1989). В качестве значений физиологической нормы принимали интервалы соответствующих показателей, приведенные в литературе (Чумаченко и др., 1990).

### Результаты и обсуждение

В результате изучения гемограммы цыплят-бройлеров установлено, что содержание в крови эритроцитов и гемоглобина у птиц всех подопытных групп (табл. 1) соответствовало нормативным значениям.

*Таблица 1. Гемограмма цыплят-бройлеров*

| Показатели | 1 группа<br>(n=5) | 2 группа<br>(n=5) | 3 группа<br>(n=6) | 4 группа<br>(n=6) |
|------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|

|                         |             |             |             |             |
|-------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Эритроциты, $10^{12}/л$ | 2,06±0,06   | 2,11±0,10   | 2,13±0,10   | 2,19±0,12   |
| Гемоглобин, г/л         | 118,43±5,84 | 124,00±3,94 | 120,17±4,21 | 119,83±4,42 |
| Лейкоциты, $10^9/л$     | 30,97±1,99  | 32,33±1,58  | 33,90±1,79  | 36,27±2,24  |
| Σ нейтрофилов, %        | 36,29±3,18  | 26,49±5,12  | 26,46±2,48* | 33,64±4,30  |
| Σнейтрофилов, $10^9/л$  | 11,39±1,54  | 8,50±1,56   | 9,14±1,29   | 12,28±2,01  |
| Эозинофилы, %           | 2,54±0,62   | 1,75±0,40   | 1,27±0,29   | 1,96±0,29   |
| Базофилы, %             | 0,13±0,08   | 0,10±0,03   | 0,11±0,05   | 0,14±0,06   |
| Моноциты, %             | 1,83±0,48   | 2,67±0,77   | 2,10±0,39   | 1,89±0,30   |
| Лимфоциты, %            | 59,17±3,14  | 68,98±5,31  | 70,07±2,85* | 62,36±4,23  |
| Лимфоциты, $10^9/л$     | 18,22±1,12  | 22,38±2,18  | 23,56±0,75* | 22,54±1,89  |

Примечание: \*  $P<0,05$  по отношению к цыплятам 1 группы, °  $P<0,05$  по отношению к цыплятам 2 группы, ■  $P<0,05$  по отношению к цыплятам 3 группы.

Отмечена устойчивая тенденция к повышению содержания лейкоцитов в крови у цыплят-бройлеров опытных групп с увеличением уровня препарата IFO 6ЕТ в рационе (на 4,39, 9,46 и 17,11% у цыплят 2, 3 и 4 групп по отношению к контролю соответственно). Следует отметить, что у цыплят 2 и 3 групп, при наличии тенденции к повышению уровня лейкоцитов в крови, соотношение отдельных форм лейкоцитов в лейкоформуле в большей степени соответствовало нормативным значениям, а уровень нейтрофилов в крови у цыплят 1 и 4 групп превышал их. Однако в лейкоформуле цыплят 3 группы содержание лимфоцитов превышало как нормативные значения, так и аналогичные значения этого показателя у птицы контрольной группы (на 18,42%), что характерно для реакции активации адаптационного синдрома (Гаркави и др., 1990). Пониженный относительно нормативных значений уровень в крови у подопытных птиц эозинофилов и базофилов является косвенным показателем высокой активности коры надпочечников и щитовидной железы соответственно. Повышенная функциональная активность щитовидной железы связана, видимо, с активными обменными процессами при интенсивном типе выращивания цыплят-бройлеров, а коры надпочечников - обусловлена предубойным стрессом. С другой стороны, в исследованиях Гаркави и соавт. (1990) при стрессе отмечали не только повышение функциональной активности коры надпочечников, но и щитовидной железы. На основании показателей гемограммы подопытных цыплят-бройлеров можно заключить, что в большей степени стрессорная реакция была выражена у птиц 1 и 4 групп, в меньшей – у 2 и 3 групп. В условиях стресса, в том числе и предубойного, повышение уровня лейкоцитов, и в частности – нейтрофилов, в крови является адекватной защитной реакцией организма.

Анализ показателей, характеризующих поглотительную способность нейтрофилов крови (табл. 2) выявил, что абсолютное и относительное количество нейтрофилов, способных к поглощению чужеродного материала как в базальных условиях, так и после стимуляции проб крови зимозаном у цыплят, получавших с кормом препарат IFO 6 ЕТ, существенно не отличалось от контроля ( $P>0,05$ ). При этом у цыплят 2 и 4 групп как адаптационные резервы интенсивности поглощения чужеродного материала нейтрофилами крови в условиях стимуляции зимозаном, так и такие интегральные показатели способности нейтрофилов поглощать чужеродный материал как абсолютный фагоцитоз и фагоцитарное число, были достоверно выше, чем в контроле (на 97,37, 119,66 и 166,67 %, а также на 59,47, 110,43 и 94,77% соответственно).

Следовательно, наиболее благоприятное воздействие на адаптационные резервы поглотительной способности нейтрофилов крови цыплят оказывали дозы препарата IFO 6 ЕТ – 20 мг/кг и 200 мг/кг.

**Таблица 2. Поглотительная способность нейтрофилов крови цыплят-бройлеров**

| Показатели                   | 1 группа<br>(n=5) | 2 группа<br>(n=5) | 3 группа<br>(n=6) | 4 группа<br>(n=6) |
|------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                              | M ± m             | M ± m             | M ± m             | M ± m             |
| ФП баз., %                   | 22,80±5,56        | 16,10±2,34        | 32,17±5,83        | 23,67±5,97        |
| ФП баз., 10 <sup>9</sup> /л  | 2,53±0,66         | 1,34±0,29         | 2,84±0,54°        | 3,32±1,43         |
| ФП стим., %                  | 40,40±4,35        | 54,60±5,86        | 41,17±8,01        | 46,75±7,40        |
| ФП стим., 10 <sup>9</sup> /л | 4,63±0,80         | 4,84±1,27         | 4,09±1,21         | 5,74±1,36         |
| Δ ФП, %                      | 17,60±9,24        | 38,50±7,14        | 9,00±12,84        | 23,08±5,54        |
| Δ ФП, 10 <sup>9</sup> /л     | 2,09±1,06         | 3,47±1,14         | 1,25±1,20         | 2,42±0,54         |
| ФИ баз., у.е.                | 5,50±0,95         | 4,05±0,23         | 4,22±0,38         | 4,35±0,39         |
| ФИ стим., у.е.               | 3,80±0,36         | 7,50±0,44*        | 4,75±0,46         | 6,06±0,48*        |
| АФ баз., 10 <sup>9</sup> /л  | 12,49±3,19        | 5,38±1,10         | 10,30±3,08        | 16,40±8,37        |
| АФ стим., 10 <sup>9</sup> /л | 16,68±2,01        | 36,64±3,80*       | 20,42±6,45        | 35,10±7,35*       |
| ФЧ баз., у.е.                | 1,09±0,20         | 0,64±0,09         | 1,41±0,34         | 1,13±0,35         |
| ФЧ стим., у.е.               | 1,53±0,23         | 4,08±0,42*        | 2,03±0,44°        | 2,98±0,55*        |

Примечание: \* P<0,05 по отношению к цыплятам 1 группы, ° P<0,05 по отношению к цыплятам 2 группы, ■ <0,05 по отношению к цыплятам 3 группы.

В результате изучения способности нейтрофилов крови уничтожать чужеродный материал было установлено (табл. 3), что относительное количество НСТ-позитивных нейтрофилов крови в базальных условиях у цыплят-бройлеров всех подопытных групп было выше нормативных значений, которые могут достигать 10%, что следует расценивать как адекватную реакцию организма в условиях предубойного стресса. В наибольшей степени реактивность нейтрофилов крови была повышена у цыплят 2 и 4 групп, причем абсолютное количество НСТ-позитивных нейтрофилов было достоверно выше, чем у контрольных цыплят только в крови у птицы, получавшей 200 мг препарата на 1 кг корма. При этом как относительное, так и абсолютное содержание этих клеток после стимуляции проб крови зимозаном у цыплят, получавших с рационом препарат (при всех использованных дозировках) не имело существенных отличий от аналогичных показателей у цыплят-бройлеров контрольной группы. Достоверно более высокое значение, относительно контроля, индекса метаболической активации оксидазных ферментных систем нейтрофилов крови (ИАН баз.) в базальном состоянии было отмечено у цыплят 2 и 4 групп (на 130,56 и 28,57% соответственно). После стимуляции проб крови зимозаном повышение активности оксидазных ферментных систем нейтрофилов крови, отвечающих за кислородозависимую микробицидность, отмечено у птиц всех подопытных групп, но наиболее значительное (P<0,05) – у цыплят 4 группы (на 28,57% по отношению к контролю). Следовательно, скармливание цыплятам-бройлерам препарата IFO 6 ЕТ в дозе 200 мг/кг обусловило наиболее существенное повышение кислородозависимой микробицидности нейтрофилов крови.

Таблица 3. Микробицидная активность нейтрофилов крови цыплят-бройлеров

| Показатели                     | 1 группа<br>(n=5) | 2 группа<br>(n=5) | 3 группа<br>(n=6) | 4 группа<br>(n=6) |
|--------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                                | M ± m             | M ± m             | M ± m             | M ± m             |
| +НСТ баз., %                   | 22,80±2,99        | 50,40±8,08*       | 28,00±6,22        | 42,33±2,49*       |
| +НСТ баз., 10 <sup>9</sup> /л  | 2,63±0,53         | 4,62±1,44         | 2,73±0,87         | 4,97±0,52*        |
| +НСТ стим., %                  | 48,60±5,18        | 59,40±6,85        | 53,67±7,07        | 59,33±3,92        |
| +НСТ стим., 10 <sup>9</sup> /л | 5,80±1,33         | 5,34±1,46         | 5,25±1,26         | 7,28±1,39         |
| ИАН баз.                       | 0,36±0,05         | 0,83±0,14*        | 0,46±0,12         | 0,73±0,07*        |
| ИАН стим.                      | 0,91±0,07         | 1,05±0,17         | 0,95±0,15         | 1,17±0,07*        |
| СЦК                            | 1,06±0,24         | 1,18±0,36         | 1,18±0,22         | 1,31±0,26         |

Примечание: \* P<0,05 по отношению к цыплятам 1 группы, ° P<0,05 по отношению к цыплятам 2 группы, ■ P<0,05 по отношению к цыплятам 3 группы.

Кислородонезависимая бактерицидность нейтрофилов крови, о которой судят по содержанию в этих клетках катионных белков (СЦК), при внесении в корм птиц препарата во всех исследованных дозах практически не изменялась.

При изучении состояния клеточного звена иммунной системы организма цыплят-бройлеров установлено, что у птицы всех групп было понижено, относительно нормативных значений, содержание в крови Т-лимфоцитов и повышено – 0-лимфоцитов (табл. 4).

Наблюдаемый дисбаланс клеточного звена иммунной системы у птиц обусловлен, видимо, предубойными стрессами, что подтверждается и таким косвенным признаком повышенной функциональной активности коры надпочечников, как низкий уровень эозинофилов в лейкоформуле (табл. 1).

Скармливание цыплятам-бройлерам препарата IFO 6 ЕТ в дозе 20 мг/кг обусловило достоверно более высокое содержание Т-лимфоцитов в их крови, не достигавшее, однако, нормативных значений. Инверсный эффект теофиллина, ярко выраженный (P<0,05) у птиц других подопытных групп, у цыплят 2 группы отсутствовал. При этом уровень недифференцированных лимфоцитов (0-Л, %) у птиц этой групп был значительно (на 35,40%, P<0,05) ниже, чем в контроле, что указывает на повышение степени дифференцировки лимфоцитов под влиянием препарата в этой дозе.

Таблица 4. Клеточное звено иммунной системы организма цыплят-бройлеров

| Показатели  | 1 группа<br>(n=5) | 2 группа<br>(n=5) | 3 группа<br>(n=6) | 4 группа<br>(n=6) |
|-------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|             | M ± m             | M ± m             | M ± m             | M ± m             |
| Е-РОЛ, %    | 12,31±2,44        | 32,00±4,32*       | 9,50±1,01°        | 13,43±2,36°       |
| Е-РОЛ тр, % | 25,18±5,04        | 22,50±6,09        | 37,00±1,09*°      | 34,00±8,42        |
| М-РОЛ, %    | 15,33±4,31        | 21,25±3,28        | 18,92±1,72        | 19,3±1,80         |
| О-Л, %      | 72,37±4,49        | 46,75±5,64*       | 71,58±2,25°       | 67,27±3,16°       |

Примечание: \* P<0,05 по отношению к цыплятам 1 группы, ° P<0,05 по отношению к цыплятам 2 группы, ■ P<0,05 по отношению к цыплятам 3 группы.

Более высокая доза препарата IFO 6 ЕТ в рационе (70 мг/кг) вызывала достоверное увеличение числа теофиллинрезистентных Т-лимфоцитов (обладающих преимущественно хелперной активностью) в крови у цыплят-бройлеров 3 группы, что указывает на более выраженную, чем цыплят 1 и 2 групп активацию клеточного звена иммунной системы при пониженном содержании в крови зрелых форм Т-лимфоцитов. У цыплят 4 группы относительное содержание малодифференцированных лимфоцитов, как и у птиц 3 группы, было выше, чем у цыплят 1 и 2 групп, но в связи с высокими индивидуальными колебаниями достоверно значимая разница отсутствовала.

Следовательно, доза препарата IFO 6 ЕТ 20 мг/кг в рационе цыплят-бройлеров обеспечила более высокую степень дифференцировки Т-лимфоцитов по сравнению как с контролем, так и с другими дозами этого препарата в рационе птиц, а более высокие дозы обусловили стимуляцию клеточного звена иммунной системы и повышение уровня малодифференцированных Т-лимфоцитов.

Установлено, что с увеличением дозы препарата в рационе живая масса цыплят-бройлеров имела устойчивую тенденцию к повышению ( $1878,75 \pm 18,76$  г,  $1900,49 \pm 47,69$  г,  $1938,48 \pm 17,23^*$  г и  $1950,48 \pm 15,53^*$  г у птиц 1, 2, 3 и 4 групп соответственно), переходящую в достоверно значимую зависимость при использовании препарата в дозе 70 и 200 мг/кг комбикорма.

Следовательно, препарат IFO 6 ЕТ, скормливаемый цыплятам-бройлерам во всех исследованных дозах, обусловил повышение уровня естественной резистентности и иммунного статуса их организма. В зависимости от использованной дозы препарата обнаружены различные эффекты:

- доза 70 мг/кг комбикорма вызвала повышение числа лимфоцитов в лейкограмме за счет малодифференцированных Т-лимфоцитов и увеличение живой массы на 3,18%;

- дозы 20 и 200 мг/кг комбикорма обусловили повышение адаптационного резерва поглотительной способности нейтрофилов крови, проявившееся в увеличении, после стимуляции проб крови зимозаном, фагоцитарного индекса на 97,37 и 59,47%, фагоцитарного числа на 166,67 и 94,77%, абсолютного фагоцитоза на 119,66 и 110,43%, а также вызвали увеличение реактивности кислородозависимых систем микробицидности нейтрофилов крови, о чем свидетельствует повышение числа НСТ-позитивных нейтрофилов на 121,05 и 85,67%, индекса их метаболической активации на 130,56 и 102,78%. При этом увеличение живой массы (на 3,82%) и повышение адаптационных резервов оксидазных ферментных систем нейтрофилов крови (на 28,57%) отмечено при дозе препарата 200 мг/кг комбикорма. Таким образом, доза препарата 200 мг/кг комбикорма оказала благоприятное влияние на более широкий спектр защитных механизмов цыплят-бройлеров.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Двинская Л.М. Влияние качественно различных жиров, альфа-токоферола и антиоксидантов на морфофункциональные изменения в тканях, витаминную обеспеченность и продуктивность цыплят-бройлеров. Физиология и биохимия питания моногастричных животных. Научн. труды ВНИИФБиП, Боровск, 1977, 17: 134-149.

2. Журавлев В.Ф. Токсикология радиоактивных веществ. М.: Энергоатомиздат, 1999: 336 с.
3. Чумаченко В.Е., Высоцкий А.М., Сердюк Н.А., Чумаченко В.В. Определение естественной резистентности и обмена веществ у сельскохозяйственных животных. Киев: Урожай, 1990: 136 с.
4. Шубич М.Г., Медникова В.Г. NBT-тест у детей в норме и при гнойно-бактериальных инфекциях. Лаб. дело, 1978, 1: 663-666.
5. Шубич М.Г., Нестерова И.В., Старченко В.М. Тест с нитросиним тетразолием в оценке иммунологического статуса детей с гнойно-септическими заболеваниями. Лаб. дело, 1980, 7: 342-344.
6. Хаитов Р.Б., Пинегин Б.В., Истамов Х.И. Экологическая иммунология. М.: ВНИРО, 1995: 219 с.
7. Жибинов В.И. Применение лизосомально-катионного теста. Ветеринария, 1983, 8: 30-31.
8. Макаревич Н.А. Лизосомально-катионный тест для оценки уровня резистентности организма крупного рогатого скота. Ветеринария, 1988, 5: 26-28.
9. Понякина И.Д., Лебедев К.А., Васенович М.И. и др. Способ определения иммунологического состояния организма. А. с. 1090409 (РФ) МКИ<sup>3</sup> А 61 К 39/00, №3429. 198/28-13; заявл. 23.04.1982; опубл. 07.05.1984, Бюл. №17.
10. Петров Р.В., Хаитов Р.М., Пинегин Б.В. и др. Оценка иммунного статуса человека при массовых обследованиях (Методология и методические рекомендации). М.: Медицина, 1989: 153 с.
11. Иванов В.П., Крапивин И.А. Программа для статистической обработки результатов зоотехнических, физиологических и биохимических исследований. Новые формы и методы обучения студентов. Кострома, 1994, ч. 2: 90-91.
12. Гаркави Л.Х., Квакина Е.Б., Уколова М.А. Адаптационные реакции и резистентность организма.- Ростов-на-Дону: Изд.-во Ростовского ун-та, 1990: 224 с.

## **ВЛИЯНИЕ АРАБИНОГАЛАКТАНА НА ПРОДУКТИВНОСТЬ И НЕСПЕЦИФИЧЕСКУЮ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ ТЕЛЯТ**

*С.В. Максименко*

Лаборатория иммунобиотехнологии

*Изучено влияние пребиотика арабиногалактана на организм молодняка крупного рогатого скота. Получены данные, свидетельствующие о положительном влиянии арабиногалактана на неспецифическую резистентность организма телят.*

### **Введение**

Одной из характерных особенностей всех живых организмов, развившейся в процессе эволюции, является способность поддерживать постоянство

внутренней среды организма как в нормальных, так и в изменившихся условиях при различных неблагоприятных факторах.

В последние годы во всем мире значительно возрос интерес к антиоксидантам различной химической природы. Это вполне обосновано, поскольку уже сформировалось мнение, подтвержденное результатами многочисленных исследований, что причиной большинства патологий является окислительный стресс. Окислительный стресс это процесс пагубного воздействия свободных радикалов на молекулы и структуры клеток.

Образование свободных радикалов является частью физиологического процесса, в результате которого происходит синтез необходимых веществ. Под воздействием патологических факторов данный процесс выходит из-под контроля. Защитные системы не могут справляться с большим количеством свободных радикалов. Свободные радикалы отнимают недостающие электроны у других молекул, вследствие чего нарушается течение реакций и происходит повреждение внутриклеточных структур. Сбой в уравновешенности между процессами образования свободных радикалов и их нейтрализацией в силу различных причин приводит к накоплению и избыточной активности токсических продуктов перекисного окисления липидов, которые подавляют клеточные механизмы энергообеспечения, ингибируют большое число мембранозависимых ферментов, биосинтез белка и нуклеиновых кислот, нарушают процессы клеточного деления, дифференцировки, проницаемости, транспорта через мембраны и другие биохимические процессы. Все это приводит к расстройству клеточного метаболизма и деления клеток, преобладанию деструктивных процессов над регенеративными и к гибели клетки. Чтобы помочь организму справиться с запредельным уровнем свободных радикалов можно стимулировать антиоксидантную систему организма или вводить в организм вещества, обладающие антиоксидантным эффектом. Очень важно то обстоятельство, что применяемые с профилактической и лечебной целью антиоксиданты не нарушают процессы ферментативного окисления, лежащего в основе биоэнергетических процессов.

Понижение антиоксидантного статуса организма приводит к нарушению метаболизма, замедлению темпов роста, ослаблению регенеративных, пролиферативных процессов и снижению адаптационных способностей организма. Повышение антиокислительных возможностей организма в физиологических пределах увеличивает метаболическую активность органов и тканей, адаптационные возможности организма и усиливает пролиферативные процессы. Механизм активации свободнорадикального окисления и ингибирования его антиоксидантами функционирует по принципу обратной связи, обеспечивая ауторегуляторное поддержание стационарности состава мембранных фосфолипидов и постоянство внутренней среды организма. Поэтому интенсивность процессов перекисного окисления липидов и состояние антиоксидантной системы организма имеет исключительное значение для поддержания гомеостаза (Цыганский, 2003).

Важным показателем состояния регуляторных функций организма и системы неспецифической резистентности организма является тиолдисульфидное отношение, т.е. отношение тиоловых групп к дисульфидным. Тиоловые соединения способны быстро и обратимо окисляться, обладают гидрофильными свойствами, но также могут выполнять свои функции и в липидной фазе клетки, предохраняя мембраны от повреждений свободными радикалами.

Эти уникальные свойства позволяют поставить тиоловые соединения на одно из первых мест в ряду защитных систем организма. Динамика изменений тиолдисульфидного отношения является отражением развития адаптивной реакции, что позволяет оценивать неспецифическую резистентность организма. Повышение концентрации дисульфидных групп при снижении концентрации сульфгидрильных свидетельствует об истощении антирадикальной защитной системы. Следовательно, стимулируя реакции, ведущие к сохранению восстановленных тиоловых групп, можно повысить защитные свойства организма. Одним из таких способов является скармливание пребиотических препаратов. Пребиотики – вещества, являющиеся субстратами для полезных микроорганизмов, обитающих в кишечнике. У крупного рогатого скота эта микрофлора на 95-98% представлена бактериями рода *Esherichia*, стафилококками, стрептококками, лактобактериями, бифидобактериями и на 2-5% – факультативной микрофлорой. Возникает резонный вопрос: почему нужно корректировать микробиологическую картину кишечника именно таким оригинальным способом, ведь более логично было бы ввести в рацион препараты, содержащие живые культуры микроорганизмов? На сегодняшний день применению пробиотических препаратов уделяется все большее внимание. Разработано множество пробиотиков на основе лакто- и бифидобактерий. Несомненно, все эти добавки обладают рядом неоспоримых достоинств, но также не лишены и недостатков. Микроорганизмы должны переносить пассаж через начальные отделы пищеварительного тракта, способны к адгезии на слизистую оболочку кишечника, способны размножаться и реализовывать свои полезные свойства. Проверка всех этих условий является трудной, а зачастую и невыполнимой задачей (Тараканов, 1987). Применение пребиотических препаратов является альтернативой пробиотикам и заслуживает рассмотрения в этом контексте.

Одним из пребиотических препаратов является арабиногалактан – полисахарид, который не обладает токсичными свойствами, не вызывает аллергических реакций и обладает рядом полезных свойств: гепатопротекторными, иммуностимулирующими (стимулируют натуральных киллеров и макрофагов) и повышающими проницаемость сосудов в пределах физиологической нормы. Кроме вышеперечисленного, он является пребиотиком, т.е. субстратом для полезной микрофлоры толстого кишечника. В связи с вышеизложенным, целью нашей работы было изучить влияние на неспецифическую резистентность и антиоксидантно-антирадикальный статус организма телят биологически активной добавки, содержащей арабиногалактан.

### **Материалы и методы**

Данная работа выполнена в ОПХ «Ермолино» на бычках, начиная с месячного возраста (n=12). Продолжительность опыта составила 7 месяцев. Животных обеих групп содержали в одинаковых условиях на хозяйственном рационе. Контрольная группа получала только основной рацион. Опытная группа кроме основного рациона получала с кормом добавку, содержащую арабиногалактан. Суточная доза препарата составляла 10 г на протяжении одного месяца опыта (возраст животных к началу скармливания препарата составлял 1 месяц) и 20 г - на протяжении трех месяцев опыта (с 6-го по 8-й месяц жизни телят).

Для исследований у подопытных животных брали кровь в возрасте 2, 5 и 8 месяцев. Взятие проводилось до утреннего кормления, через 1 и через 3 часа после утреннего кормления.

Для оценки интенсивности свободнорадикальных процессов и состояния системы антиоксидантной защиты в крови телят определяли малоновый диальдегид (МДА) (Thannhauser et al., 1984), концентрацию сульфгидрильных, дисульфидных групп и рассчитывали тиол-дисульфидное отношение. Экспериментальный материал обрабатывали по методу Стьюдента.

### Результаты и обсуждение

Показатели тиол-дисульфидной системы свидетельствуют о повышении неспецифической резистентности у животных опытной группы по сравнению с контролем (табл. 1). У животных опытной группы в возрасте 4-х месяцев тиол-дисульфидное отношение превышало контрольное значение на 49% при взятии крови до кормления, на 52%- через 1 час после кормления и на 45% - через 3 часа после кормления. Концентрация малонового диальдегида в опытной группе была ниже, чем в контрольной на 31% при взятии крови до кормления, на 20% - через 1 час после кормления и на 19% - 3 часа после кормления.

*Таблица 1. Тиолдисульфидный статус организма в период скармливания биологически активной добавки, содержащей арабиногалактан*

| Показатели                   | МДА<br>нмоль/мл | SH мкмоль/л | SS мкмоль/л  | ТДС   |
|------------------------------|-----------------|-------------|--------------|-------|
| Возраст животных 1 мес       |                 |             |              |       |
| Контроль                     | 7,780±0,311     | 0,140±0,013 | 0,103±0,014  | 1,36  |
| Опыт                         | 7,650±5,890     | 0,148±0,008 | 0,096±0,005  | 1,54  |
| Процент к контролю           | 98              | 105         | 93,2         | 113   |
| Возраст животных 4 мес       |                 |             |              |       |
| До кормления                 |                 |             |              |       |
| Контрольная группа           | 7,845±0,212     | 0,170±0,022 | 0,102±0,010  | 2,045 |
| Опытная группа               | 5,460±0,635     | 0,225±0,007 | 0,075±0,007  | 3,050 |
| Процент к контролю           | 69              | 132         | 74           | 149   |
| через 1 час после кормления  |                 |             |              |       |
| Контроль                     | 8,242±0,449     | 0,198±0,006 | 0,095±0,00   | 2,050 |
| Опыт                         | 6,657±0,506     | 0,221±0,011 | 0,064±0,0123 | 3,07  |
| Процент к контролю           | 80              | 112         | 67           | 152   |
| через 3 часа после кормления |                 |             |              |       |
| Контроль                     | 7,970±0,249     | 0,155±0,014 | 0,118±0,009  | 2,238 |
| Опыт                         | 6,515±0,152     | 0,209±0,013 | 0,070±0,0123 | 3,243 |
| Процент к контролю           | 81              | 135         | 59           | 145   |
| Возраст животных 8 мес       |                 |             |              |       |
| До кормления                 |                 |             |              |       |
| Контроль                     | 6,951±0,346     | 0,216±0,014 | 0,097±0,004  | 2,23  |
| Опыт                         | 6,245±0,298     | 0,238±0,015 | 0,059±0,003  | 4,03  |
| Процент к контролю           | 90              | 110         | 61           | 181   |

Продолжение таблицы 1

|                    | через 1 час после кормления  |             |             |       |
|--------------------|------------------------------|-------------|-------------|-------|
| Контроль           | 5,772±0,242                  | 0,256±0,015 | 0,092±0,013 | 2,920 |
| Опыт               | 5,033±0,154                  | 0,221±0,020 | 0,057±0,004 | 3,886 |
| Процент к контролю | 87                           | 86          | 62          | 133   |
|                    | через 3 часа после кормления |             |             |       |
| Контроль           | 6,490±0,143                  | 0,233±0,016 | 0,118±0,023 | 1,97  |
| Опыт               | 5,072±0,129                  | 0,219±0,008 | 0,095±0,015 | 2,30  |
| Процент к контролю | 78                           | 94          | 80          | 117   |

В возрасте 8 месяцев у животных опытной группы тиол-дисульфидное отношение превышало контрольное значение на 81% при взятии крови до кормления, на 33% - через 1 час после кормления и на 17% через 3 часа после кормления. При этом концентрация малонового диальдегида была ниже на 10% при взятии крови до кормления, на 13% - через 1 час после кормления и на 22% - через 3 часа после кормления. В результате живая масса увеличилась на 106,1% по сравнению с контролем.

Увеличение живой массы бычков опытной группы за весь период опыта по сравнению с контрольной составило 7,8% (табл. 2).

Вследствие повышения концентрации сульфгидрильных и одновременного снижения дисульфидных групп у животных опытной группы тиол-дисульфидное отношение существенно повысилось. Это говорит о том, что неспецифическая резистентность и буферная емкость антиоксидантной системы увеличились и, следовательно, увеличились адаптационно-защитные функции организма опытных животных по сравнению с контрольными.

**Таблица 2. Влияние скармливания арабиногалактана на прирост живой массы откармливаемых бычков**

| Показатели                       | Возраст животных, мес. |          |           |           |           |           |
|----------------------------------|------------------------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|                                  | 1 мес                  | 2 мес*   | 4 мес     | 6 мес*    | 7 мес*    | 8 мес     |
| <i>Контроль</i>                  |                        |          |           |           |           |           |
| Живая масса, кг                  | 47,0±2,9               | 63,9±1,2 | 98,7±4,0  | 133,3±3,3 | 154,0±2,3 | 180,0±3,9 |
| Ср. сут. прирост живой массы, кг | -                      | 0,545    | 0,570     | 0,567     | 0,667     | 0,866     |
| <i>Арабиногалактан</i>           |                        |          |           |           |           |           |
| Живая масса, кг                  | 47,6±2,8               | 69,1±1,9 | 105,7±2,8 | 144,0±1,9 | 168,3±1,4 | 191,0±4,3 |
| Ср. сут. прирост живой массы, кг | -                      | 0,589    | 0,610     | 0,614     | 0,729     | 0,918     |
| Процент к контролю               | 101,2                  | 108,1    | 107,1     | 108,3     | 109,3     | 106,1     |

Примечание. \* P<0,05

Так как процессы активации свободнорадикального окисления и ингибирование его антиоксидантами в естественных условиях уравновешены, то по результатам исследования очевидно, что происходит сдвиг этого равновесия в сторону снижения интенсивности образования свободных радикалов. Об этом свидетельствует повышение концентрации сульфгидрильных групп и понижение концентрации дисульфидных групп и МДА в плазме крови. Малоновый диальдегид не является природным метаболитом и в организме отсутствует. Он образуется при кипячении в кислой среде в результате взаимодействия природных метаболитов липопероксидации с тиобарбитуровой кислотой. Концентрация МДА является показателем состояния процессов перекис-

ного окисления липидов. Чем выше концентрация МДА, тем больше концентрация продуктов липопероксидации в исследуемом образце.

### **Заключение**

Снижение концентрации малонового диальдегида, повышение концентрации низкомолекулярных сульфгидрильных групп, снижение содержания дисульфидных групп и, как следствие, повышение тиол-дисульфидного отношения у бычков опытной группы, которым скармливали арабиногалактан, свидетельствует о положительном влиянии препарата на показатели неспецифической резистентности. Усиление защитных сил организма этих животных сказалось на их продуктивности. Прирост живой массы бычков опытной группы за весь период эксперимента превысил этот показатель у животных контрольной группы на 7,8%.

### **ЛИТЕРАТУРА**

1. Костромитинов Н.А., Сидоров И.В. Антиоксидантная система защиты и липидный обмен у молодняка крупного рогатого скота в возрастной динамике. *Сельскохозяйственная биология*, 2006, 5: 46-50.
2. Майстров В.И., Галочкина В.П., Антиоксидантно-анирадикальная и тиол-дисульфидная системы племенных бычков под влиянием комплекса биологически активных веществ. *Сельскохозяйственная биология*, 2006, 2: 64-68.
3. Николаева Т.Н., Зорина В.В., Бондаренко В.М. Роль цитокинов в модуляции иммунореактивности организма бактериями рода *Lactobacillus*. *Журнал микробиол., эпидемиол. и иммунол.*, 2004, 6: 101-105.
4. Тараканов Б.В. Использование микробных препаратов и продуктов микробиологического синтеза в животноводстве. М.: 1987.
5. Цыганский Р.А. Динамика свободнорадикального окисления у коров при различном функциональном состоянии. Автореф. дис... к.б.н., 2003: 13-14.
6. Русаков Р.В. Применение антиоксидантных препаратов для стимуляции воспроизводительной функции у крупного рогатого скота. Автореф. дис... к.б.н., 2002: 3-4.
7. В.А. Галочкин, П.Е. Малиненко, В.И. Майстров. Система глутатиона как критерий антиоксидантного статуса животных. *Труды ВНИИФБиП с.-х. животных*, 2005, 24: 97-113
8. T.W. Thannhauser, Y. Konishi, H.A. Scheraga. Sensitive quantitative analysis of disulfide bonds in polypeptides and proteins. *Analytical biochemistry*, 1984, 138, 1: 181-188.

## ОСОБЕННОСТИ МЕТАБОЛИЗМА И МОЛОКООБРАЗОВАНИЯ У КОЗ ПРИ ОБОГАЩЕНИИ РАЦИОНА ПРОТЕИНОМ И ПРОПИЛЕНГЛИКОЛЕМ

З.Н. Макар, Р.И. Корнеева, М.И. Сапунов  
Лаборатория физиологии и биохимии лактации

*В опыте, проведенном на двух группах коз, установлено, что повышенное потребление доступного протеина (в пределах 15% сверх рекомендуемых норм) в сочетании со скормливанием добавки пропиленгликоля (в энергетическом эквиваленте до 3% от обменной энергии) обеспечивает повышение удоя на 21,3% и продукции белка на 22,9% по сравнению с основным рационом. Добавка пропиленгликоля к высокопротеиновому рациону повышала эффективность использования аминокислот на продуктивные цели.*

### Введение

Ранее нами в ходе комплексных опытов показано, что инфузии пропионата и глюкозы совместно с казеином существенно повышают его конверсию в белок молока вследствие стимуляции кровоснабжения молочной железы, увеличения активности трансмембранного переноса аминокислот в секреторные клетки и повышения эффективности их использования в синтезе молочного белка (Макар и др., 2006 а). В опыте, проведенном нами на козах, установлено, что добавки соевого шрота к сбалансированному рациону в сочетании с добавкой пропионата натрия способствовали увеличению удоя, продукции белка молока и эффективности использования аминокислот в обмене веществ, в сравнении с применением одной протеиновой добавки (Макар и др., 2006 б). Выявленный продуктивный эффект дополнительного поступления глюкозы в метаболический пул животных, по-видимому, опосредован инсулином. Установлено, что инфузия этого гормона в условиях поддержания нормогликемии повышает скорость молокообразования и продукцию молочного белка у жвачных в результате стимуляции кровоснабжения молочной железы и метаболической активности ее секреторных клеток (Макар и др., 2006 в).

Полученные экспериментальные данные свидетельствовали о целесообразности проведения специальных исследований о влиянии относительно дешевой глюкогенной добавки – пропиленгликоля в рационах с повышенным содержанием доступного для обмена протеина, направленных на разработку способа повышения его конверсии в белок молока. Дача жвачным пропиленгликоля широко применяется на ранней стадии лактации с целью снижения эндогенной продукции незатерифицированных жирных кислот, предупреждения метаболических нарушений, жировой инфильтрации печени (Hoedemaker et al., 2004; Overton, Maldron, 2004; Studer et al., 1993) и сопровождается ростом поступления глюкозы в метаболический фонд организма, стимуляцией инкреции инсулина и инсулиноподобного фактора роста-1 (Christensen et al., 1997; Grummer et al., 1994; Pickett et al., 2003).

## Материал и методы

Задача решалась в опыте на 6 лактирующих козах, находящихся на стадии установившейся лактации в виварии института. Опыт проведен методом латинского квадрата на двух группах коз. Продолжительность каждого из периодов опыта составляла три недели. Схема проведения опыта представлена в таблице 1.

В течение уравнительного периода животные адаптировались к ручному доению и основному рациону. Рацион составляли индивидуально по детализированным нормам (Калашников и др., 2003) с учетом живой массы и продуктивности и включал: сено, размолотое зерно и подсолнечниковый шрот (табл.2).

Таблица 1. *Схема проведения опыта*

| Группы животных | Уравнительный период | Основной период |            |
|-----------------|----------------------|-----------------|------------|
|                 |                      | 1               | 2          |
| 1               | ОР                   | ОР+ПШ           | ОР+ ПШ +ПГ |
| 2               | ОР                   | ОР+ ПШ +ПГ      | ОР+ ПШ     |

Примечание: ОР – основной рацион; ПШ – подсолнечниковый шрот; ПГ – пропиленгликоль.

Таблица 2. *Основной рацион для подопытных коз*

| Корма             | Количество, кг | В кормах содержится: |              |                       |                    |                          |            |           |
|-------------------|----------------|----------------------|--------------|-----------------------|--------------------|--------------------------|------------|-----------|
|                   |                | сухого вещества, г   | кормовых ед. | обменной энергии, МДж | сырого протеина, г | переваримого протеина, г | кальций, г | фосфор, г |
| Сено              | 1,8            | 1498                 | 0,86         | 12,2                  | 126,3              | 74,8                     | 9,7        | 2,2       |
| Пшеница (размол)  | 0,26           | 227                  | 0,33         | 3,2                   | 30,1               | 27,6                     | 0,2        | 0,9       |
| Ячмень (размол)   | 0,26           | 230                  | 0,30         | 3,0                   | 28,2               | 20,8                     | 0,1        | 0,7       |
| Шрот подсолнечн.  | 0,19           | 169                  | 0,19         | 1,8                   | 69,5               | 58,4                     | 0,6        | 2,3       |
| Трикальций фосфат | 0,01           |                      |              |                       |                    |                          | 3,8        | 2,0       |
| Поваренная соль   | 0,01           |                      |              |                       |                    |                          |            |           |
| Итого             |                | 2124                 | 1,68         | 20,2                  | 254,1              | 181,6                    | 14,4       | 8,1       |

В течение последующих периодов к основному рациону добавляли подсолнечниковый шрот в количестве, соответствующем 15 % от потребности в протеине. Пропиленгликоль скармливали с комбикормом два раза в сутки в дозе 2,5 мл/кг живой массы<sup>0,75</sup>. Ежедневно учитывали поедаемость корма. Раз в неделю измеряли удой и брали пробы молока и крови. В молоке определяли белок - колориметрическим методом (Постхумус, 1965), жир на анализаторе молока Milko-tester F3140 (Foss Electric, Дания), лактозу (Teles et al., 1978) и мочевины (набор Urea 450 фирмы «Лаксема»). Пробы крови из яремной и молочной вен отбирали через 3 ч после кормления. В крови определяли содержание  $\alpha$ -аминоазота (Mitsukawa et al., 1971), глюкозы с помощью глюкозооксидазного метода (набор реагентов фирмы «Витал Диагностика СПб»), триацилглицеролов посредством энзиматического колориметрического метода (на-

бор реагентов фирмы «Витал Диагностика СПб»), мочевины (набор Urea 450 фирмы «Лахема») и инсулина (набор реактивов фирмы «ДРГ Интернешнл, Инк.»). Плазмоток через молочную железу определяли расчетным путем по отношению выхода  $\alpha$ -аминоазота с белком молока к его артерио-венозной разности.

### Результаты и обсуждение

Как видно из таблицы 3, при скормливания козам на стадии установившейся лактации протеиновой добавки в количестве 15 % от потребности в протеине в сочетании с пропиленгликолем в дозе 2,5 мл/кг метаболической массы, наблюдалась тенденция к повышению содержания белка в молоке, содержание лактозы существенно повысилось, а концентрация молочного жира, напротив, понизилась. Применение пропиленгликоля повысило среднесуточный удой, продукцию белка молока и лактозы (табл. 3).

Таблица 3. Молочная продуктивность коз

| Показатели              | Периоды опыта |             |              |
|-------------------------|---------------|-------------|--------------|
|                         | ОР            | ОР+ПШ       | ОР+ПШ+ПГ     |
| Среднесуточный удой, г  | 965±206,4     | 980±217,0   | 1170±285,4   |
| Разность средних: от ОР |               | 15±29,9     | 205±89,7     |
| от ОР+ПШ                |               |             | 190±72,4     |
| Белок, %                | 3,02±0,033    | 2,99±0,065  | 3,06±0,055   |
| Разность средних: от ОР |               | -0,03±0,066 | 0,04±0,072   |
| от ОР+ ПШ               |               |             | 0,06±0,055   |
| Жир, %                  | 2,85±0,119    | 2,67±0,084  | 2,47±0,160   |
| Разность средних: от ОР |               | -0,18±0,490 | -0,38±0,099* |
| от ОР+ ПШ               |               |             | -0,20±0,116  |
| Лактоза, %              | 4,53±0,173    | 4,57±0,136  | 4,72±0,144   |
| Разность средних: от ОР |               | 0,04±0,065  | 0,19±0,050*  |
| от ОР+ ПШ               |               |             | 0,15±0,060   |
| Белок, г                | 29,2±6,21     | 29,5±6,71   | 35,9±8,80    |
| Разность средних: от ОР |               | 0,34±1,28   | 6,70±2,96    |
| от ОР+ ПШ               |               |             | 6,36±2,36*   |
| Жир, г                  | 27,8±6,38     | 26,2±5,97   | 28,4±7,04    |
| Разность средних: от ОР |               | -1,60±0,87  | 0,58±1,75    |
| от ОР+ ПШ               |               |             | 2,18±1,83    |
| Лактоза, г              | 43,9±9,98     | 44,5±9,71   | 55,2±14,3    |
| Разность средних: от ОР |               | 0,64±1,18   | 11,32±4,65   |
| от ОР+ ПШ               |               |             | 10,68±4,75   |

Примечание: ОР – основной рацион; ПШ – подсолнечный шрот; ПГ – пропиленгликоль. \*  $P < 0,05$  по парному  $t$ -критерию.

Так, в результате применения глюкогенной добавки в сочетании с протеиновой среднесуточный удой и продукция молочного белка повысились соответственно на 19,4 и 21,5% по сравнению с применением одной протеиновой добавки (рис. 1). Продукция молочного жира в этой экспериментальной ситуации не претерпела существенных изменений (табл. 3).

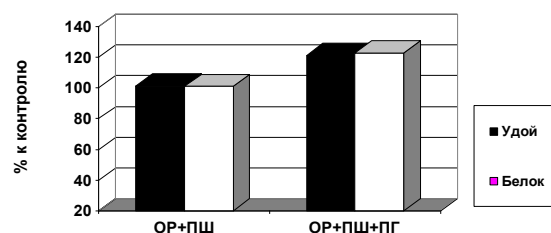


Рис. 1. Среднесуточный удой и продукция белка молока

Как свидетельствуют данные, представленные в таблице 4, при обогащении рациона протеином в сочетании с пропиленгликолем содержание в крови глюкозы существенно повысилось, а концентрация  $\alpha$ -аминоазота и триацилглицеролов несколько снизилась.

Таблица 4. Содержание в крови яремной вены коз основных предшественников молока

| Показатели               | Периоды опыта    |                  |                  |
|--------------------------|------------------|------------------|------------------|
|                          | ОР               | ОР+ПШ            | ОР+ПШ+ПГ         |
| Глюкоза, ммоль           | 3,76 $\pm$ 0,150 | 3,86 $\pm$ 0,116 | 4,41 $\pm$ 0,23  |
| Разность средних: от ОР  |                  | 0,10 $\pm$ 0,18  | 0,65 $\pm$ 0,22* |
| от ОР+ПШ                 |                  |                  | 0,55 $\pm$ 0,33  |
| $\alpha$ -аминоазот, мг% | 5,49 $\pm$ 0,18  | 5,55 $\pm$ 0,37  | 5,16 $\pm$ 0,22  |
| Разность средних: от ОР  |                  | 0,06 $\pm$ 0,26  | -0,33 $\pm$ 0,13 |
| от ОР+ПШ                 |                  |                  | -0,39 $\pm$ 0,31 |
| Триацилглицеролы, мг%    | 18,9 $\pm$ 1,19  | 18,1 $\pm$ 1,66  | 17,4 $\pm$ 2,50  |
| Разность средних: от ОР  |                  | 0,87 $\pm$ 0,96  | -1,53 $\pm$ 0,31 |
| от ОР+ПШ                 |                  |                  | -0,66 $\pm$ 1,33 |

Примечание: ОР – основной рацион; ПШ – подсолнечный шрот; ПГ – пропиленгликоль. \*  $P < 0.05$  по парному  $t$ -критерию

В условиях дачи как одной протеиновой добавки, так и протеиновой добавки в сочетании с пропиленгликолем артерио-венозная разность триацилглицеролов и  $\alpha$ -аминоазота в молочной железе снизилась, а глюкозы не претерпела существенных изменений (табл.5). В период скармливания добавок подсолнечникового шрота и подсолнечникового шрота в сочетании с пропиленгликолем эффективность извлечения выменем основных предшественников молока снижалась (табл.6).

Таблица 5. Артерио-венозная разность основных предшественников молока в молочной железе коз

| Показатели               | Периоды опыта   |                  |                  |
|--------------------------|-----------------|------------------|------------------|
|                          | ОР              | ОР+ПШ            | ОР+ПШ+ПГ         |
| Глюкоза, ммоль           | 0,90 $\pm$ 0,07 | 0,75 $\pm$ 0,151 | 0,85 $\pm$ 0,066 |
| Разность средних: от ОР  |                 | -0,15 $\pm$ 0,16 | 0,05 $\pm$ 0,116 |
| от ОР+ПШ                 |                 |                  | 0,10 $\pm$ 0,14  |
| $\alpha$ -аминоазот, мг% | 1,11 $\pm$ 0,12 | 0,82 $\pm$ 0,11  | 0,81 $\pm$ 0,10  |
| Разность средних: от ОР  |                 | -0,29 $\pm$ 0,15 | -0,30 $\pm$ 0,14 |

|                         |           |            |             |
|-------------------------|-----------|------------|-------------|
| от ОР+ПШ                |           |            | 0,01±0,04   |
| Триацилглицеролы, мг%   | 4,36±0,59 | 3,29±0,66  | 1,48±0,21   |
| Разность средних: от ОР |           | -1,10±0,45 | -2,88±0,53* |
| от ОР+ПШ                |           |            | -1,81±0,61* |

Примечание: ОР – основной рацион; ПШ – подсолнечный шрот; ПГ – пропиленгликоль. \* P< 0.05 по парному t-критерию

**Таблица 6. Эффективность извлечения молочной железой основных предшественников молока**

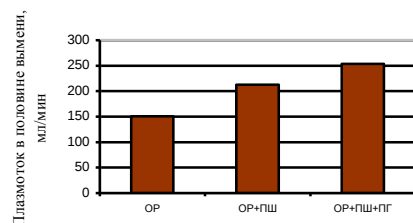
| Показатели              | Периоды опыта |            |             |
|-------------------------|---------------|------------|-------------|
|                         | ОР            | ОР+ПШ      | ОР+ПШ+ПГ    |
| Глюкоза, ммоль          | 0,90±0,07     | 0,75±0,151 | 0,85±0,066  |
| Разность средних: от ОР |               | -0,15±0,16 | 0,05±0,116  |
| от ОР+ПШ                |               |            | 0,10±0,14   |
| α-аминоазот, мг%        | 1,11±0,12     | 0,82±0,11  | 0,81±0,10   |
| Разность средних: от ОР |               | -0,29±0,15 | -0,30±0,14  |
| от ОР+ПШ                |               |            | 0,01±0,04   |
| Триацилглицеролы, мг%   | 4,36±0,59     | 3,29±0,66  | 1,48±0,21   |
| Разность средних: от ОР |               | -1,10±0,45 | -2,88±0,53* |
| от ОР+ПШ                |               |            | -1,81±0,61* |

Примечание: ОР – основной рацион; ПШ – подсолнечный шрот; ПГ – пропиленгликоль. \* P< 0.05 по парному t-критерию

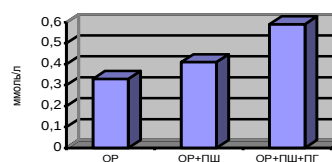
Как видно из рисунка 2, введение в рацион протеиновой добавки оказало стимулирующее влияние на кровоснабжение вымени. Скармливание протеиновой добавки совместно с пропиленгликолем оказало дополнительное стимулирующее влияние на кровоток.

При скармливании подсолнечникового шрота совместно с пропиленгликолем повышалось поглощение молочной железой глюкозы и α-аминоазота, а поглощение триацилглицеролов, напротив, снижалось (табл. 7).

В условиях дачи животным глюкогенной добавки повысилось содержание глюкозы в молоке, которое отражает ее концентрацию в секреторных клетках (рис.3).



**Рис. 2. Плазмоток в половине вымени (ОР – основной рацион; ПШ – подсолнечный шрот; ПГ – пропиленгликоль).**



**Рис. 3. Содержание глюкозы в молоке (ОР – основной рацион; ПШ – подсолнечный шрот; ПГ – пропиленгликоль).**

Таблица 7. Поглощение молочной железой основных предшественников молока

| Показатели               | Периоды опыта |             |              |
|--------------------------|---------------|-------------|--------------|
|                          | ОР            | ОР+ПШ       | ОР+ПШ+ПГ     |
| Глюкоза, ммоль/мин       | 0,27±0,050    | 0,28±0,049  | 0,42±0,064   |
| Разность средних: от ОР  |               | 0,007±0,031 | 0,147±0,050* |
| от ОР+ПШ                 |               |             | 0,140±0,049* |
| α-аминоазот, мг/мин      | 3,25±0,601    | 3,10±0,511  | 3,72±0,625   |
| Разность средних: от ОР  |               | -0,15±0,197 | 0,47±0,251   |
| от ОР+ПШ                 |               |             | 0,62±0,153*  |
| Триацилглицеролы, мг/мин | 12,2±1,24     | 11,3±1,26   | 7,05±1,74    |
| Разность средних: от ОР  |               | -0,90±1,03  | -5,10±2,44   |
| от ОР+ПШ                 |               |             | -4,20±2,08   |

Примечание: ОР – основной рацион; ПШ – подсолнечный шрот; ПГ – пропиленгликоль. \*  $P < 0.05$  по парному  $t$ -критерию

Как видно из рисунка 4, пропиленгликоль оказал стимулирующее влияние на инкрецию инсулина у коз.

Положительный продуктивный эффект добавки пропиленгликоля сопровождался более эффективным использованием аминокислот, по сравнению с применением высокопротеинового рациона, так как при этом снижалось содержание мочевины в молоке с 8,34 до 6,72 ммоль/л ( $P < 0.05$ ) (рис. 5). Известно, что концентрация мочевины в молоке тесно коррелирует с содержанием ее в крови, следовательно, можно предположить, что использование пропиленгликоля стабилизировало конверсию протеина корма в молочный белок при скармливании высокопротеинового рациона.

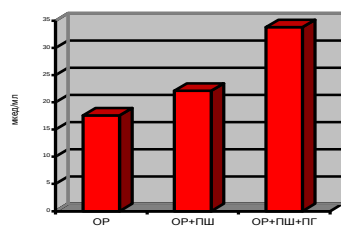


Рис. 4. Концентрация инсулина в крови (ОР – основной рацион; ПШ – подсолнечный шрот; ПГ – пропиленгликоль).

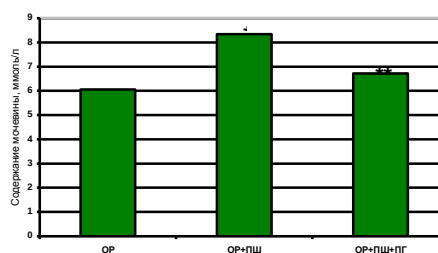


Рис. 5. Содержание мочевины в молоке. (ОР – основной рацион; ПШ – подсолнечный шрот; ПГ – пропиленгликоль. \*  $P < 0.05$  по сравнению с ОР; \*\*  $P < 0.05$  по сравнению с ОР+ПШ).

### Заключение

Повышенное потребление доступного протеина (в пределах 15% сверх рекомендуемых норм) в сочетании со скармливанием добавки пропиленгликоля (в энергетическом эквиваленте до 3% от обменной энергии) обеспечивает у продуктивных жвачных на стадии установившейся лактации повышение удоя на 21,3% и продукции белка на 22,9%, по сравнению с основным рацио-

ном. Добавка пропиленгликоля к высокопротеиновому рациону снижает уровень мочевины в молоке, что свидетельствует о более эффективном использовании аминокислот на продуктивные цели. Выявленный продуктивный результат обусловлен положительными сдвигами в инкреции инсулина, содержании глюкозы в крови, органном кровотоке и повышенной активностью транспорта аминокислот и глюкозы в секреторные клетки молочной железы.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Макара З.Н., Бояршинов И.А., Корнеева Р.Н., Сапунов М.И., Черепанов Г.Г. Исследование физиологических механизмов влияния разного уровня и соотношения нутриентов на продукцию молочного белка у жвачных животных. Труды регион. конкурса научных проектов в области естественных наук. Калуга: Изд-во "Калужский научный центр", 2006 а, выпуск 10: 350-355.
2. Макара З.Н., Сапунов М.И., Корнеева Р.И., Черепанов Г.Г. Влияние кормовых добавок ацетата и пропионата натрия на молочную продуктивность коз при повышенном уровне доступного протеина. Вестник РАСХН, 2006 б, 6: 65-67.
3. Макара З.Н., Сапунов М.И., Корнеева Р.И., Бояршинов И.В., Черепанов Г.Г. Особенности метаболизма и молокообразования у коз при нагрузке инсулином в условиях поддержания нормогликемии. Труды ВНИИФБиП, 2006 в, 45: 55-65.
4. Нормы и рационы кормления сельскохозяйственных животных. Справочное пособие. 3-е издание переработанное и дополненное. /Под ред. А.П. Калашникова, В.И. Фисинина, В.В. Щеглова, Н.И. Клейменова. Москва, 2003: 456 с.
5. Постхумус Г. Массовые исследования содержания белка в молоке колориметрическим методом. В кн.: Методы определения белка в молоке. М., Колос, 1965: 72-86.
6. Christensen J. O., Grummer R. E. Rasmussen R., F., and Bertics S.J.. Effect of Method of Delivery of Propylene Glycol on Plasma Metabolites of Feed-Restricted Cattle. J. Dairy Sci. 1997, 80: 563-568.
7. Grummer R. R., Winkler J.C., Bertics S. J., and Studer V.A.. Effect of Propylene Glycol Dosage During Feed Restriction on Metabolites in Blood of Prepartum Holstein Heifers. J. Dairy Sci., 1994, 77: 3618-3623.
8. Hoedemaker M., Prange D., Zerbe H. et al. Peripartal propylene glycol supplementation and metabolism, animal health, fertility and production in dairy cows. J. Dairy Sci., 2004, 87: 2136.
9. Juchem S. O., Santos F. P., Imaizumi H., Pires A. V., and Barnabe E. C. Production and Blood Parameters of Holstein Cows Treated Prepartum with Sodium Monensin or Propylene Glycol. J. Dairy Sci., 2004. 87:680-689.
10. Mitsukawa H., Shimizu O., Nishi H. Colorimetric determination of  $\alpha$ -amino nitrogen in urine and plasma with ninhydrin reaction. Agric. Biol. Chem., 1971, 35: 272-274.
11. Teles F.F., Young C.K., Stull J.W. A method for rapid determination of lactose. J. Dairy Sci., 1978, 61: 506-508.
12. Overton T.R., Maldron M.R. Nutritional management of transition dairy cows: strategies to optimize metabolic health. J. Dairy Sci., 2004, 87: E105.

13. Pickett M. M., Piepenbrink M. S. and Overton T. R. Effects of Propylene Glycol or Fat Drench on Plasma Metabolites, Liver Composition, and Production of Dairy Cows During the Periparturient Period. J. Dairy Sci., 2003, 86: 2113-2121.
14. Studer V. A., Grummer R. R., and Bertics S. J. Effect of Prepartum Propylene Glycol Administration on Periparturient Fatty Liver in Dairy Cows. J Dairy Sci., 1993, 76: 2931-2939.

### **ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ОТКАРМЛИВАЕМЫХ БЫЧКОВ ХОЛМОГОРСКОЙ ПОРОДЫ ПРИ ВВЕДЕНИИ В РАЦИОН ПРОПИЛЕНГЛИКОЛЯ**

В.А. Матвеев, В.В. Воловников, И.А. Баранова

Лаборатория эндокринной регуляции обмена веществ и продуктивности

*При введении в типовой рацион бычков пропиленгликоля в качестве глюкогенной и энергетической добавки отмечено более высокое по сравнению с контролем содержание в плазме крови бычков опытной группы трийодтиронина и тироксина, что свидетельствует о повышенной функциональной активности щитовидной железы у бычков, получавших пропиленгликоль. Созданные в эксперименте условия позволили повысить продуктивные и мясные качества бычков: от опытных животных получено больше мякоти (на 8,5%), меньше внутреннего жира (на 19,1%) и выше отношение мякоти к костям.*

#### **Введение**

Основными субстратами для обеспечения процессов биосинтеза белков, углеводов и липидов в организме жвачных животных являются аминокислоты, глюкоза, ацетат, пропионат, высшие жирные кислоты и кетоновые тела. Можно полагать, что максимальная эффективность процессов биосинтеза компонентов мяса в организме растущего молодняка крупного рогатого скота будет наблюдаться в случае, если метаболический пул будет в достаточном количестве и в оптимальном соотношении обеспечен аминокислотами и глюкозой. В целях создания у бычков дополнительной обеспеченности метаболизма глюкозой, животным вводили в рацион синтетическую биологически активную добавку – пропиленгликоль, который по данным ряда авторов (Christensen, 1997; Kim, 2003) после всасывания из рубца поступает в клетки печени, где практически полностью используется на образование глюкозы. В мировой практике пропиленгликоль преимущественно используют в качестве глюкогенной и энергетической добавки для коров в последнюю декаду сухостойного периода и в период ранней стадии лактации с целью предотвращения кетозов (Фомичев, 2006). Как потенциальный углевод пропиленгликоль включается в обмен веществ на уровне триозофосфатов. Некоторые авторы считают его пролонгированной формой пропионата, максимальный уровень которого в крови после введения регос наблюдается через 1 час, а затем постепенно снижается и к 12 часам обнаруживаются только следы (Miyoshi, 1996).

Известно, что тиреоидные гормоны оказывают многочисленные и разнообразные эффекты на дифференцировку, развитие и метаболический гомеостаз, контролируя синтез и активность регуляторных белков, в том числе ключевых ферментов метаболизма, гормонов и рецепторов (Ньюсхолм и др., 1977). Тиреоидные гормоны играют важную роль в регуляции роста мышц, влияя как на анаболические, так и на катаболические процессы, и это влияние дозозависимо (Brown e. a., 1982). При повышенных концентрациях тиреоидных гормонов в крови усиливается основной обмен, что проявляется в увеличении количества и размера митохондрий, митохондриальной мембраны и количества рибосом. Эти изменения приводят к усилению выработки энергии за счет повышения активности ферментов глицерофосфат-дегидрогеназы, цитохромксидазы, цитохрома С, НАД-зависимой изоцитратдегидрогеназы.

В доступной литературе мы не нашли объективного объяснения механизма влияния глюкогенных добавок на активность щитовидной железы бычков. Известно, что экзогенные факторы (голодание, повышение уровня белкового питания, дополнительное введение углеводов) могут влиять на содержание тиреоидных гормонов в крови посредством воздействия: 1) на концентрацию тироксинсвязывающих белков, в функцию которых входит транспорт, связывание избыточного количества гормона, регулирование скорости доставки тиреоидных гормонов на периферию; 2) на активность ферментов дейодиназы, с помощью которых осуществляется периферическое монодейодирование Т4. Вместе с тем, большинство модуляций эффектов тиреоидных гормонов в отдельных тканях и в разных физиологических условиях запускаются в результате мультигормональной регуляции обменных процессов с участием кортизола, половых гормонов, СТГ и др. и контролируются по закону обратной связи тиреотропным гормоном.

Целью нашей работы было изучение влияния длительного введения в рацион откармливаемых бычков пропиленгликоля в разных дозах на функциональную активность щитовидной железы, в частности, на уровень тиреоидных гормонов, которые регулируют процессы синтеза мышечного белка и в целом отражают энергетическую ситуацию в организме животных.

Предположительно, исследование возможной взаимосвязи между содержанием тиреоидных гормонов в крови бычков и показателями интенсивности роста и мясной продуктивности в условиях различной обеспеченности глюкозой позволит расширить наши знания о роли щитовидной железы в реализации продуктивного потенциала животных.

### **Материалы и методы**

Для решения поставленных задач проведена экспериментальная работа на бычках холмогорской породы в периоды доращивания и интенсивного откорма в условиях вивария института. Опыт проведен методом групп и периодов, продолжительность опыта с 8- до 13 – месячного возраста. Содержание животных привязное, кормление 2-разовое. Уровень кормления был рассчитан на обеспечение интенсивного выращивания и откорма (Нормы и рационы..., 2003). В состав рациона входили: сено злаковое, силос злаковый и комбикорм в количестве 55-60 % по обменной энергии. По принципу аналогов с учетом живой массы и интенсивности роста было сформировано три группы животных по 3 головы в каждой. Первая группа – контрольная, которой про-

пропиленгликоль не давали. Бычкам опытных групп 2 раза в день скармливали с комбикормом пропиленгликоль. В первый период опыта бычки получали в сутки по 80 (2-я группа) и 160 мл (3-я группа) пропиленгликоля. Во второй период опыта суточная доза пропиленгликоля составила во 2-й группе – 200 мл, а в 3-й – 250 мл. Продолжительность первого периода опыта составила 41 день, второго – 42 дня и третьего – 54 дня. В третьем периоде опыта уровень сырого протеина был увеличен с 12,7 до 14,2% за счет введения в рацион соевого шрота. Кровь для исследования брали пункцией яремной вены до кормления, через 1 и 3 часа после него. В плазме крови определяли концентрацию тироксина и трийодтиронина иммуноферментным методом (Радченков и др, 1985). Математическую обработку проводили стандартными методами (Лакин, 1980).

Пропиленгликоль давали в течение всего периода опыта в расчете на голову. По мере интенсивного роста (среднесуточный прирост массы тела был более 1100 г) доза пропиленгликоля на единицу массы тела в процессе опыта снижалась. Поэтому в целях объективного анализа полученных данных в периоды взятия проб крови рассчитывали фактическую дозу пропиленгликоля на кг метаболической массы тела (масса тела в степени 0,75) бычков (табл. 1).

*Таблица 1. Доза пропиленгликоля в расчете на кг метаболической массы тела бычков по периодам опыта, мл*

| Группа | Периоды опыта |          |          |
|--------|---------------|----------|----------|
|        | I             | II       | III      |
| 1-ая   | контроль      | контроль | контроль |
| 2-ая   | 1,44          | 2,92     | 3,12     |
| 3-я    | 2,85          | 3,54     |          |

### Результаты и обсуждение

По величине биологической активности трийодтиронин значительно превосходит тироксин, но уступает по продолжительности периода полураспада. Nodate и др. (1981) указывают на однонаправленное действие тироксина и трийодтиронина на обмен веществ и энергии и их строго координированное соотношение. Результаты наших исследований показали, что во все периоды опыта обнаружена тенденция к более высокому содержанию в плазме крови бычков опытных групп трийодтиронина (рис. 1).

Наибольшая разница по содержанию трийодтиронина в плазме крови бычков между опытной и контрольной группами (35,08%) наблюдалась во второй серии эксперимента при введении в рацион максимальной дозы пропиленгликоля. Возможно, за счет увеличения концентрации трийодтиронина в плазме крови бычков при скармливании 3,54 мл пропиленгликоля на килограмм метаболической массы, биологический эффект тиреоидных гормонов был более выражен и обеспечивал возможность поддержания на высоком уровне интенсивности процессов обмена веществ, что подтверждается данными о высоких среднесуточных приростах массы бычков. Не выявлено каких-либо зависимостей в содержании трийодтиронина в плазме крови бычков опытных и контрольной групп после приема корма.

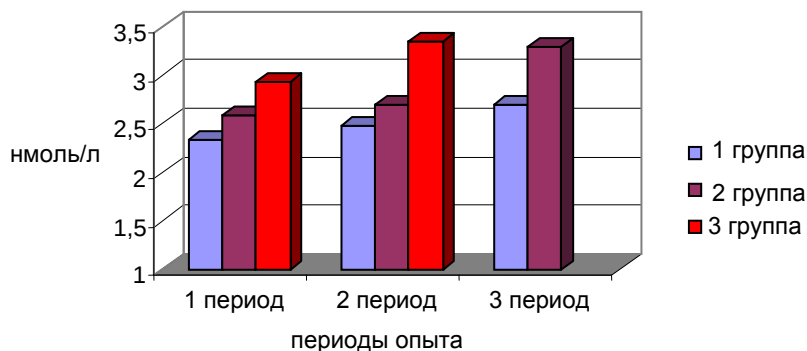


Рис. 1 – Базальная концентрация трийодтиронина в плазме крови бычков, нмоль/л

Анализ концентрации тироксина в крови животных показал, что введение в рацион пропиленгликоля вызывало увеличение его уровня в большинстве периодов опыта (табл. 2). Наибольшая разница по концентрации тироксина наблюдалась во второй серии эксперимента и составила в 1-й опытной группе (доза пропиленгликоля – 2,92 мл/кг метаболической массы) 6,38% ( $P \leq 0,01$ ), во 2-й опытной группе (доза пропиленгликоля 3,54 мл/кг метаболической массы) – 24,4% ( $P \leq 0,01$ ). На фоне высокопротеинового уровня кормления в третий период опыта базальная концентрация тироксина в крови животных не имела существенных различий между группами. После приема корма у бычков опытных групп отмечено превышение уровня тироксина по сравнению с контролем. Через 3 часа после кормления содержание тироксина у бычков опытных групп оставалось на высоком уровне, а в контроле снижалось. Особенно ярко это было выражено в заключительный период откорма. Полученные данные дают основание предполагать, что функциональная активность щитовидной железы у опытных бычков была несколько выше, чем в контроле.

Важным показателем физиологического действия тиреоидных гормонов на организм является отношение концентраций тироксина и трийодтиронина в крови. На протяжении всего опыта наблюдалась тенденция к понижению этого показателя у животных, получавших пропиленгликоль (табл. 3).

Таблица 2. Концентрация тироксина в плазме крови бычков при введении в рацион пропиленгликоля, нмоль/л

| Группы         | Время после приема корма, часы |             |            |
|----------------|--------------------------------|-------------|------------|
|                | До кормления                   | 1           | 3          |
| 1 период       |                                |             |            |
| 1 группа       | 80,94±1,12                     | 97,03±2,99  | 94,68±4,73 |
| % к базальному | 100                            | 119,88      | 116,97     |
| 2 группа       | 86,06±1,15                     | 103,63±7,88 | 99,27±2,08 |
| % к 1 группе   | 106,33**                       | 106,8       | 104,85     |

|                |            |             |             |
|----------------|------------|-------------|-------------|
| % к базальному | 100        | 120,42      | 115,35      |
| 3 группа       | 87,59±7,01 | 105,64±1,72 | 101,65±3,86 |
| % к 1 группе   | 108,21     | 108,87      | 107,36      |
| % к базальному | 100        | 120,61      | 116,05      |
| 2 период       |            |             |             |
| 1 группа       | 72,58±2,29 | 71,62±6,80  | 78,32±6,43  |
| % к базальному | 100        | 98,68       | 107,91      |
| 2 группа       | 77,21±8,17 | 87,01±6,61  | 84,74±0,78  |
| % к 1 группе   | 106,38**   | 121,49      | 108,19      |
| % к базальному | 100        | 112,69      | 109,75      |
| 3 группа       | 90,29±4,94 | 111,54±8,62 | 81,43±4,19  |
| % к 1 группе   | 124,40**   | 155,75      | 103,96      |
| % к базальному | 100        | 123,54      | 90,19       |
| 3 период       |            |             |             |
| 1 группа       | 82,79±6,61 | 74,14±0,52  | 64,60±0,35  |
| % к базальному | 100        | 89,55       | 78,03       |
| 2 группа       | 84,19±4,07 | 83,33±2,76  | 78,66±2,03  |
| % к 1 группе   | 101,69     | 112,4*      | 121,77**    |
| % к базальному | 100        | 98,98       | 93,43       |

Чем ниже величина соотношения тироксина и трийодтиронина, тем выше конверсия Т4 в Т3 (периферическое монодейодирование Т4), осуществляемая с помощью ферментов дейодиназ, на активность которых, по-видимому, оказало влияние дополнительное поступление предшественника углеводов. В третий период опыта, при максимальной дозе введения в рацион пропиленгликоля, наблюдалась наименьшая величина соотношения концентраций тиреоидных гормонов на фоне высокой концентрации трийодтиронина и максимальных среднесуточных приростов живой массы.

**Таблица 3. Соотношение концентраций тироксина и трийодтиронина в плазме крови бычков при введении в рацион пропиленгликоля**

| Группы       | Периоды опыта |            |            |
|--------------|---------------|------------|------------|
|              | 1 период      | 2 период   | 3 период   |
| Контрольная  | 34,59±2,54    | 34,78±1,92 | 32,95±4,01 |
| 1 опытная    | 33,17±3,08    | 30,52±3,43 | 30,29±1,39 |
| % к контролю | 95,9          | 87,7       | 91,9       |
| 2 опытная    | 32,27±1,26    | 29,94±1,97 |            |
| % к контролю | 93,3          | 86,1       |            |

В наших исследованиях выявлена положительная высокая зависимость между концентрацией трийодтиронина в плазме крови бычков опытных групп и интенсивностью роста в большинстве периодов опыта (табл. 4). У бычков контрольной группы данная зависимость была слабой и недостоверной.

*Таблица 4. Коэффициенты корреляции между концентрацией трийодтиронина в плазме крови и среднесуточными приростами живой массы бычков при введении в рацион пропиленгликоля*

| Группы   | I период | II период | III период |
|----------|----------|-----------|------------|
| 1 группа | +0,79    | -0,19     | +0,51      |
| 2 группа | +0,997** | +0,83     | +0,32      |
| 3 группа | +0,92    | +0,98     |            |

При изучении зависимости между концентрацией Т4 и интенсивностью роста установлено, что данные связи носят не четкий характер (табл. 5).

*Таблица 5. Коэффициенты корреляции между концентрацией тироксина в плазме крови и среднесуточными приростами живой массы бычков при введении в рацион пропиленгликоля*

| Группы   | I период | II период | III период |
|----------|----------|-----------|------------|
| 1 группа | +0,29    | -0,44     | +0,96*     |
| 2 группа | +0,28    | +0,10     | +0,67      |
| 3 группа | +0,96    | +0,48     |            |

Полученные другими авторами данные по взаимосвязи между активностью щитовидной железы и интенсивностью роста неоднозначны и зачастую противоречат друг другу. Многие авторы указывают на сильную вариабельность показателей тиреоидных гормонов в крови (Токарь, 2003).

В период заключительного откорма у бычков опытной группы обнаружена существенная положительная взаимосвязь между уровнем Т4 и количеством мякоти в туше ( $r=+0,77$ ). У животных контрольной группы эта связь была заметно слабее ( $r=+0,15$ ). Анализ связи между уровнем Т4 и убойным выходом показал, что коэффициент корреляции у бычков, получавших пропиленгликоль, положителен и относительно высок ( $r=+0,90$ ), а в контроле данная связь отсутствует ( $r=-0,48$ ).

Известно, что снижение функции щитовидной железы ведет к понижению всасывания углеводов в кишечнике, подавлению окислительных процессов, вследствие чего наступает отложение жира в организме (Brown *et al.*, 1982). При повышенной функциональной активности щитовидной железы у животных опытной группы по результатам контрольного убоя отмечено большее количество мякоти в туше на 8,5% ( $P < 0,05$ ), на 17,8% выше отношение мякоти к костям и меньше на 19,1% ( $P < 0,05$ ) внутреннего жира в туше по сравнению с контролем (табл. 6).

*Таблица 6. Результаты контрольного убоя*

| Показатели                   | Группа           |                   | % к контролю |
|------------------------------|------------------|-------------------|--------------|
|                              | Контрольная      | Опытная           |              |
| Масса туши, кг               | 192,0 $\pm$ 3,6  | 200,0 $\pm$ 2,2   | 104,1        |
| Убойный выход, %             | 54,67 $\pm$ 0,36 | 54,67 $\pm$ 0,22  | 100,0        |
| Количество мякоти в туше, кг | 146,8 $\pm$ 3,42 | 159,30 $\pm$ 3,53 | 108,5*       |
| Количество мякоти в туше, %  | 76,44 $\pm$ 0,44 | 78,33 $\pm$ 1,16  | 102,5        |
| Количество костей в туше, кг | 45,22 $\pm$ 0,58 | 42,09 $\pm$ 2,11  | 93,1         |

|                                        |            |            |       |
|----------------------------------------|------------|------------|-------|
| Количество костей в туше, %            | 23,56±0,44 | 22,70±0,70 | 96,32 |
| Отношение мясо/кости                   | 3,25±0,08  | 3,83±0,29  | 117,8 |
| Количество внутреннего жира в туше, кг | 14,39±0,58 | 11,65±0,71 | 80,9* |

Мясо бычков опытной группы характеризовалось выраженной мраморностью. Известно, что мраморность мяса обуславливает хорошую сочность, нежность и высокие вкусовые качества говядины. По данным лаборатории БАВ в образцах длиннейшей мышцы спины у бычков, получавших пропиленгликоль, на 0,94% было ниже содержание влаги, выше процент сырого жира на 18,56%. В образцах средней пробы мякотной части туши у бычков опытной группы на 1,73% было ниже содержание влаги и на 4,16% выше содержание сырого жира по сравнению с контролем. Эти данные свидетельствуют о лучшем качестве говядины, полученной от животных опытной группы.

### Заключение

Длительное скормливание бычкам пропиленгликоля не оказывает отрицательного влияния на функциональное состояние эндокринной системы, в частности, на активность щитовидной железы.

Введение в рацион бычков пропиленгликоля обеспечило дополнительное поступление глюкозы в метаболический пул, что явилось фактором, модифицирующим влияние тиреоидных гормонов на основной обмен и, в конечном итоге, привело к повышению их концентрации в крови и усилению конверсии Т4 в Т3. Выявлена положительная высокая зависимость между концентрацией трийодтиронина в плазме крови бычков опытных групп и интенсивностью роста в большинстве периодов опыта.

Применение в рационах бычков пропиленгликоля в качестве глюкогенной кормовой добавки биологически целесообразно, так как повышается эффективность использования протеина корма на биосинтез мышечных белков, что в конечном итоге обеспечивает увеличение в туше бычков количества мяса и повышает качество говядины.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Christensen J.O., Grummer R.R., Rasmussen E.E., Berdics S.J. Effect of method of delivery of propylene glycol on plasma metabolites of feed-restricted cattle. J. Dairy Sci., 1997, 80: 563-568.
2. Kim J.S., Kim Y.O., Ryu H.J., Kwak Y.S., Lee J.Y., Kang H. Effect of lactaldehyde to propanediol. J. Biol. Chem., 235:1609-1612.
3. Фомичев Ю.П. и др. Применение пропиленгликоля и конъюгированной линолевой кислоты в кормлении молочных коров. Актуальные проблемы биологии в животноводстве: Материалы четвертой международной конференции, посвященной 100-летию со дня рождения академика РАСХН Н.А. Шманенкова. (г. Боровск, 5-7 сентября 2006 г.). Боровск, ВНИИФ-БиП, 2006: 361с.
4. Miyoshi S., Pate J.L., Palmquist D.L. Propylene glycol improve reproductive performance in early postpartum. Spec. circular/Ohio agr. research and development center. Wooster, 1996, 156: 83-86.

5. Ньюсхолм Э., Старт К. Регуляция метаболизма. М.: Колос, 1971:30.
6. Brown J.S., Bates P.S., Holliday M.A., Millward D.J. Thyroid hormones and muscle protein turnover. The effect of thyroid hormone deficiency and replacement in thyroidectomized and hypophysectomized rats. Biochem. J., 1981, 194: 771-782.
7. Нормы и рационы кормления с.-х. животных: Справочное пособие. Под ред. А.П. Калашникова. М., 2003.
8. Радченков В.П. и др. Определение гормонов в крови крупного рогатого скота, свиней и их гормональный статус. Методические указания. Боровск, 1985: 74 с.
9. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1980.
10. Hodate K., Johnke J., Kawabata A. et al. Effects of age, body weight and sex on pituitary-thyroid axis in dairy cattle and dairy variations of thyrotropin and thyroid hormones. Japan. J. Zootechn. Sci., 1981, 52, 5: 334-342.
11. Токарь В.В., Окожеев А.А. Определение гормонов щитовидной железы у овец. Материалы Международной научной конференции «Возрастная физиология и патология с.-х. животных». Улан-Удэ, 25-27 июня, 2003, 1: 91-92.

## **ВЛИЯНИЕ ПРОПИЛЕНГЛИКОЛЯ НА ПРОЦЕСС ГЛЮКОНЕОГЕНЕЗА И ИНТЕНСИВНОСТЬ РОСТА БЫЧКОВ**

*В.П. Галочкина, С.В. Максименко, В.А. Галочкин*  
Лаборатория иммунобиотехнологии

*На фоне использования в рационе бычков на откорме соевого шрота, введение бычкам опытной группы пропиленгликоля повышает его использование через лактат как в реакции глюконеогенеза, так и в окислительных реакциях, с преимущественным потоком метаболитов через глюконеогенез. Это привело в условиях опыта к увеличению интенсивности роста животных с 1335 до 1537 г в сутки, с улучшением состава туш (увеличение доли мякоти, снижение костей и внутреннего жира).*

### **Введение**

Пропиленгликоль (1,2-пропандиол) в мировой практике в основном используется для дойных коров на пике лактации и рекламируется как гликогенная и энергетическая добавка (Бекасова, 2003, Виркки, 2003, Болдырева, 2004). Но поскольку энергетический эквивалент не велик (225 г пропиленгликоля эквивалентно скармливанию 400 г концентратов), это наводит на мысль, что функция препарата специфична. Пропиленгликоль уже в рубце может сбраживаться до пропионата и лактата (Пятковский, 1978). Основной метаболизм пропиленгликоля протекает в печени животного, как и полости рубца - до пропионата и лактата (Бекасова, 2003). Однако мы не исключаем возможности превращений пропиленгликоля и в стенке рубца в аналогичной последовательности реакций. Продукты этого метаболизма могут уже в стенке рубца включаться в процесс глюконеогенеза и влиять на обменные процессы во всем

организме. Возникает резонный вопрос – почему для этих же целей не применяют пропионовую, молочную или любые другие кислоты – промежуточные продукты цикла Кребса?

Ответов может быть несколько. По всей вероятности, пропиленгликоль, во-первых, большую роль играет как гликогенная и антикетогенная добавка. Во-вторых, возможно он более медленно метаболизируется в организме животного, чем пропионат, поэтому можно предположить, что это в некоторой степени является пролонгированной формой пропионата. Распадаясь до пропионата, пропиленгликоль через лактальдегид может метаболизироваться в лактат и далее через карбоксилирование пирувата пойдет на глюконеогенез. Или же молочная кислота через пируватдегидрогеназную реакцию пойдет на аэробное окисление и выработку биологической энергии. Имеется и другой вариант превращения пропиленгликоля в сукцинил-КоА через пропионат с затратой одной молекулы АТФ и путем двух промежуточных реакций. Сукцинил-КоА может использоваться непосредственно для образования высокоэнергетического фосфатного соединения ГТФ или в специфической реакции, например, в мышечной ткани для активации ацетоацетата и превращения его в источник энергии ацетоацетил-КоА. Сукцинат может быть использован непосредственно для выработки энергии как интермедиат цикла трикарбоновых кислот через цитохромную систему, передавая протон с восстановленного ФАД непосредственно на коэнзим Q, в итоге давая две молекулы АТФ. Не исключена также возможность использования сукцината через обратный транспорт электронов (этот механизм включается, когда организм остро нуждается в быстром обеспечении энергией).

После дегидрогенизации янтарной кислоты, фумаровая кислота превращается в яблочную, которая переносится в цитоплазму или в митохондриях через оксалоацетат идет на поддержание цикла Кребса. В цитоплазме яблочная кислота, дегидрогенизируясь до оксалоацетата, через фосфоенолпируваткарбоксикиназу может включаться в глюконеогенез. Другой путь метаболизации яблочной кислоты в цитоплазме может проходить, по нашей гипотезе, посредством включения ее в пероксисомальные реакции. В пероксисомах с вовлечением ацетил-КоА она может быть направлена по глиоксилатному циклу, с превращением в изоцитрат и сукцинат, которые, в свою очередь, используются в реакциях глюконеогенеза или в цикле трикарбоновых кислот.

Цель работы – повышение интенсивности роста и улучшение качества туш бычков в заключительном периоде откорма путем интенсификации процесса глюконеогенеза.

Поставленную задачу решали с помощью использования пропиленгликоля на фоне рациона, включающего комбикорм с подсолнечным и соевым шротами, что обеспечивало соответствующий уровень сырого протеина и оптимальное содержание в нем нерасщепляемого в рубце протеина для получения среднесуточного прироста 1400 г.

### **Материал и методы**

Для решения поставленной задачи в виварии института в период заключительного откорма проведен эксперимент методом групп на 10-ти бычках холмогорской породы с живой массой 290 кг при постановке на опыт. Содержание животных привязное, кормление - индивидуальное с ежедневным уче-

том потребления корма. Для оценки интенсивности роста ежемесячно, в течение двух смежных суток, до утреннего кормления проводили взвешивание животных. В рацион бычков обеих групп, в соответствии с нормами для интенсивного выращивания и откорма молодняка крупного рогатого скота (Нормы и рационы кормления..., 2003), входили: злаково-бобовое сено, силос злаковый и комбикорм. Комбикорм состоял из: ячменя 42 %, пшеницы, шрота подсолнечного, отрубей пшеничных по 15 %, шрота соевого 10 %, поваренной соли, обесфторенного фосфата и премикса по 1 %. Соевый шрот вводили в комбикорм из расчета его потребления бычками обеих групп по 0,5 кг на голову в сутки для увеличения поступления аминокислот в оттекающую от кишечника кровь с целью активизации биосинтеза мышечного белка и наращивания мышечной массы. Данное количество соевого шрота необходимо для удовлетворения потребности бычков на откорме в сыром и нерасщепляемом в рубце протеине для получения среднесуточного прироста живой массы 1400 г. Пропиленгликоль, скармливаемый бычкам опытной группы по 250 мл в сутки (по 125 мл в утреннее и вечернее кормление) должен обеспечивать процессы интенсивного протеосинтеза глюкозой. В потребленных бычками опытной группы кормах содержалось на 4,3 % меньше сырого протеина при повышении энергетической ценности рациона приблизительно на 7 %.

Для выяснения влияния пропиленгликоля на процесс глюконеогенеза и его метаболизм через лактат в плазме крови определяли активность пируваткарбоксилазы (Галочкина, 1997) и лактатдегидрогеназы. Лактатдегидрогеназу определяли с набором фирмы Лахема (Чехия). Кровь для анализа брали до кормления и через 1 и 3 часа после него. Активность пируваткарбоксилазы выражали в микромолях НАДН, окисленного за минуту инкубации при 30°С, активность лактатдегидрогеназы – в микромолях НАД, восстановленного за минуту инкубации при 30°С из расчета на литр плазмы.

### Результаты и обсуждение

Бычки опытной группы потребили меньше сена и силоса, но больше комбикорма, что привело к большему потреблению обменной энергии и меньшему – протеина. Но у бычков опытной группы была значительно выше интенсивность роста. Среднесуточный прирост живой массы у бычков опытной группы был на 15,1 % выше, чем в контрольной группе. В связи с этим, несмотря на большее потребление комбикорма, оплата корма у бычков опытной группы по обменной энергии была выше на 8,1 %, а по сырому протеину – на 16,9 % (табл. 1).

*Таблица 1. Интенсивность роста, потребление корма и питательных веществ подопытными бычками*

| Показатели                 | Группы      |          | % к контролю |
|----------------------------|-------------|----------|--------------|
|                            | контрольная | опытная  |              |
| Средне-суточный прирост, г | 1335±67     | 1537±32* | 115,1        |
| Потреблено: сена, кг       | 1,268       | 1,116    | 88,0         |
| Силоса, кг                 | 10,488      | 8,090    | 77,1         |
| Комбикорма, кг             | 4,488       | 5,00     | 111,4        |
| Обменной энергии, МДЖ      | 79,4        | 84,1     | 105,9        |

|                                   |      |      |      |
|-----------------------------------|------|------|------|
| Сырого протеина, г                | 1487 | 1423 | 95,7 |
| Расщепляемого протеина, г         | 907  | 883  | 97,4 |
| Нерасщепляемого протеина, г       | 580  | 540  | 93,1 |
| Оплата корма по:                  |      |      |      |
| обменной энергии, МДж/кг прироста | 59,5 | 54,7 | 91,9 |
| сырому протеину, г/кг прироста    | 1114 | 926  | 83,1 |

Примечание: \* -  $P < 0,04$

Как и предполагали, при включении в рацион бычков опытной группы пропиленгликоля один из путей его метаболизма проходил через лактат, что способствовало интенсификации процесса глюконеогенеза (табл. 2, рис. 1). По активности ферментов и по отношению активности пируваткарбоксилазы к лактатдегидрогеназе (коэффициенту ПК/ЛДГ) можно сделать заключение, что в опытной группе после приема корма лактат через пируват в большей степени использовался в глюконеогенезе, а до приема корма - в окислительных реакциях (рис. 2). Это еще раз подтверждает, что в организме животных пропиленгликоль способен довольно активно метаболизироваться через лактат.

**Таблица 2. Активность пируваткарбоксилазы и лактатдегидрогеназы в плазме крови бычков при применении пропиленгликоля при высоком уровне протеина, обеспечивающего 1400 г среднесуточного прироста**

| Показатели           | Контрольная группа, после кормления, час |        |        | Опытная группа, после кормления, час |        |        |
|----------------------|------------------------------------------|--------|--------|--------------------------------------|--------|--------|
|                      | 0                                        | 1      | 3      | 0                                    | 1      | 3      |
| Пируваткарбоксилаза  | 95±6                                     | 103±15 | 119±27 | 107±16                               | 118±24 | 157±14 |
| % к контролю         |                                          |        |        | 112,6                                | 114,6  | 131,9  |
| ПК/ЛДГ               | 1,92                                     | 1,53   | 1,86   | 1,80                                 | 1,68   | 2,36   |
| Лактатдегидрогеназа, | 49,5                                     | 67,3   | 64     | 59,4                                 | 70,2   | 66,6   |
| % к контролю         |                                          |        |        | 121,0                                | 104,3  | 104,1  |

В контрольной группе до приема корма лактат использовался через пируват преимущественно в глюконеогенезе, т.к. у этих животных отношение величины активности пируваткарбоксилазы к активности лактатдегидрогеназы (коэффициент ПК/ЛДГ) до кормления было выше на 6,6 %, чем у бычков опытной группы. У животных опытной группы величина коэффициента ПК/ЛДГ до приема корма также указывает на преимущественное использование лактата в реакциях глюконеогенеза, но эта метаболическая направленность была выражена в меньшей степени, чем в контроле (рис. 2).

Активность лактатдегидрогеназы после приема корма повышалась в основном за счет продуктов гидролитического расщепления корма в кишечнике. Это следует из того, что наибольшая активность фермента отмечалась именно через час после приема корма и в большей степени в опытной группе по сравнению с контрольной. Мы склонны утверждать, что более высокая активность ЛДГ у бычков опытной группы по сравнению с контрольной была связана именно со скармливанием пропиленгликоля.

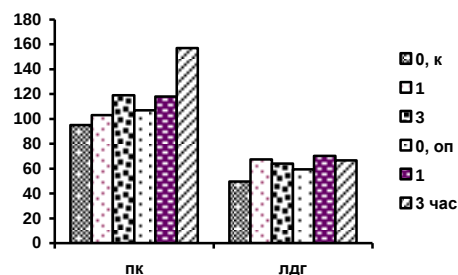


Рис. 1. Активность пируваткарбоксилазы (ПК) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в плазме бычков контрольной (к) и опытной (оп) групп до приема корма (0), через 1 (1) и 3 (3) часа после приема корма.

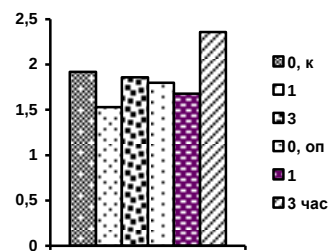


Рис. 2. Отношение активности пируваткарбоксилазы к лактатдегидрогеназе в плазме крови бычков контрольной (к) и опытной (оп) групп через 0 (0), 1 (1) и 3 (3) часа после приема корма.

Соевый шрот потребляли бычки обеих групп, но активность лактатдегидрогеназы до утреннего приема корма была выше в опытной группе, что указывает на большее депонирование глюкозы в мышечной ткани бычков этой группы за счет используемого пропиленгликоля. Высокие запасы гликогена в мышце бычков опытной группы позволили поддерживать гликолитические процессы до утреннего кормления на более высоком уровне. У бычков контрольной группы в этот период времени повышался процесс глюконеогенеза из аминокислот, что и привело к снижению наращивания мышечной массы в туше.

По всей вероятности интенсификация роста бычков опытной группы происходила не только за счет включения пропиленгликоля в процесс глюконеогенеза через лактат и пируват, но и за счет усиления его участия в глюконеогенезе через сукцинат. Активизация использования сукцината в процессе глюконеогенеза в терминальном окислении и завершении оборота цикла Кребса видимо и была первопричиной снижения содержания внутреннего жира в тушах бычков опытной группы, так как по данным Lai et al. (2003) сукцинат, наряду с другими органическими кислотами (альфа-кетоглутаровой, фумаровой, яблочной), увеличивают процесс дифференциации адипоцитов. Использование пропиленгликоля при достаточном поступлении нерасщепляемого и расщепляемого в рубце протеина способствовало не только активизации микробиальных процессов в рубце, но и лучшему использованию поступающих в кровотоки продуктов гидролиза из желудочно-кишечного тракта. Отмеченный более высокий коэффициент ПК/ЛДГ у животных опытной группы непосредственно указывал на снижение в их организме уровня окислительных процессов.

В последнее время в литературе появилась информация, что свободные радикалы способны резко снижать активность пируватдегидрогеназного комплекса. Причем показана наибольшая уязвимость от свободнорадикальной деструкции именно этого звена (Asanuma, 2004). С другой стороны появились работы, в которых сообщается, что сам пируват является весьма сильным антиоксидантом, способным разрушать перекись водорода. Например, Upreti et

al. (1998) показали, что при его наличии в разбавителях спермы нет необходимости добавлять другие антиоксиданты. Aouffen (2004) продемонстрировал, что пируват предотвращает окислительные повреждения молекулы церулоплазмينا, являющегося хорошо известным антиоксидантом. Приведенные примеры свидетельствуют о том, что увеличение образования пирувата при применении пропиленгликоля не только обеспечивает процессы синтеза глюкозой и, через цикл Кребса, биологической энергией, но и усиливает антиоксидантную систему организма, роль которой при интенсификации процессов роста существенно повышается. Возросший синтез пирувата и глюкозы способствовал тому, что бычки опытной группы испытывали в меньшей степени воздействие стрессов на метаболические процессы.

В итоге среднесуточный прирост живой массы бычков опытной группы повысился до  $1537 \pm 32$  г ( $P < 0,04$ ), что превышало этот показатель у бычков контрольной группы на 15,1% при их среднесуточном приросте  $1335 \pm 67$  (табл. 1). Условия кормления бычков опытной группы позволили не только интенсифицировать рост животных, но и повысили качество туш (увеличение доли мякоти и снижение жира), что логично объясняется произошедшей перестройкой обмена веществ. Изменилось соотношение активности пируваткарбоксилазы и лактатдегидрогеназы. Оба фермента катализируют взаимопревращение лактата и пирувата (конечных продуктов гликолиза и исходных продуктов глюконеогенеза). Они рассматриваются не только как наиболее информативные, но и как определяющие показатели, способные управлять обменом глюкозы. Пируваткарбоксилаза является первым ключевым ферментом глюконеогенеза из пировиноградной кислоты.

Конечно же, специфика обмена веществ у жвачных животных приобретает особую значимость в требовании постоянных высоких затрат на поддержание уровня глюкозы в крови. Видимо Greenfield et al. (2000) одними из первых продемонстрировали высокую положительную корреляцию между экспрессией мРНК и активностью фосфоенолпируваткарбоксикиназы и пируваткарбоксилазы в ответ на скармливание повышенных количеств протеина коровам перед отелом. На основании полученных результатов авторами был сделан вывод, что в последний период у таких коров повышается метаболизм лактата, пирувата и аминокислот, увеличивающий пул пирувата в печени.

В нашем опыте у бычков большее вовлечение в метаболические процессы аминокислот за счет повышения доли лизина и нерасщепляемого в рубце протеина, с одновременным увеличением синтеза глюкозы, обеспечивало на более высоком уровне биосинтез мышечного белка. В итоге у животных опытной группы получена масса туши на 4,1 кг выше с большим содержанием в ней (на 10,1 кг) мякоти, более высоким коэффициентом мясности, меньшей долей костей и внутреннего жира (табл. 3).

*Таблица 3. Результаты контрольного убоя бычков при применении пропиленгликоля*

| Показатели                   | Группы           |                  | % к контролю |
|------------------------------|------------------|------------------|--------------|
|                              | контрольная      | опытная          |              |
| Масса туши, кг               | $192,0 \pm 3,6$  | $200,0 \pm 2,2$  | 104,1        |
| Количество мякоти в туше, кг | $144,5 \pm 0,36$ | $154,6 \pm 2,66$ | 107,0        |
| Количество костей в туше, %  | $44,95 \pm 0,52$ | $45,36 \pm 1,05$ | 100,92       |

|                                   |           |           |        |
|-----------------------------------|-----------|-----------|--------|
| Обмускуленность, %                | 42,1      | 43,6      | 103,6  |
| Коэффициент мясности              | 3,22±0,06 | 3,42±0,11 | 106,17 |
| Количество внутреннего жира, кг   | 14,4±0,58 | 11,7±0,71 | 80,9   |
| Дополнительно получено мякоти, кг | -         | 10,1      |        |

Таким образом, бычки опытной группы при меньшем потреблении протеина на единицу прироста живой массы повысили интенсивность роста с увеличением наращивания мышечной массы. Достигнутый зоотехнический эффект явился следствием снижения окислительных процессов и увеличения синтеза глюкозы. Это подтверждает наше предположение о произошедшей перестройке обмена веществ в организме бычков опытной группы.

### Заключение

По совокупности полученных нами зоотехнических и биохимических данных следует, что один из альтернативных путей метаболизации пропиленгликоля у интенсивно откармливаемых на мясо бычков происходит через лактат, который в свою очередь через пируват участвует в глюконеогенезе и окислительных реакциях в цикле Кребса. Увеличение активности пируваткарбоксилазы и лактатдегидрогеназы идет как за счет субстратов, поступающих из желудочно-кишечного тракта, так и за счет эндогенных источников.

Результаты опыта подтверждают высказанное нами ранее предположение о том, что отношение активности пируваткарбоксилазы к активности лактатдегидрогеназы может описывать величины альтернативной направленности метаболизма пирувата на синтез глюкозы или на окислительные процессы. При использовании пропиленгликоля бычкам на откорме, несмотря на повышение активности лактатдегидрогеназы до утреннего приема корма, коэффициент ПК/ЛДГ сохраняется выше единицы. Введение в комбикорм бычков подсолнечного и соевого шротов с одновременным использованием пропиленгликоля у бычков опытной группы способствовало повышению интенсивности роста на 15,1% и увеличению наращивания мышечной массы при снижении доли костей и внутреннего жира в туше. Причем, данные изменения продуктивности и качества продукции произошли на фоне меньшего потребления протеина на единицу продукции у бычков опытной группы. Это достаточно аргументированно подтверждает факт перехода организма животных на новый уровень обмена веществ с более экономным расходованием энергетического и пластического материала и пониженной интенсивностью окислительных процессов.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Галочкина В.П. Определение активности пируваткарбоксилазы. В кн.: Методы биохимического анализа. Боровск, 1997: 240-249.
2. Бекасова Т.. Селко-Энергия – энергетик для молочных коров. Животноводство России, 2003. сен., 26-27.
3. Нормы и рационы кормления сельскохозяйственных животных. Справочное пособие под ред. Калашникова А.П., Фисинина В.И., Щеглова В.В., Клейменова Н.И. Москва, 2003: 455 с.

4. Болдырева Е. Новый источник энергии для коров. Животноводство России, 2004, нояб., 18-19.
5. Виркки М. Когда коровам нужна помощь. Животноводство России, 2003, окт., 26-27.
6. Использование питательных веществ жвачными животными. (Nährstoffverwertung beim Wiederkäuer. Herausgegeben von B.Piatkowski). Перевод с немецкого Гельман Н.С. М.: Колос, 1978: 423 С.
7. Aouffen M., Paquin J., Furtos A., Waldron K.C., Mateescu M.A. Oxidative aggregation of ceruloplasmin induced by hydrogen peroxide is prevented by pyruvate. Free Radic Res. 2004, Jan., 38(1): 19-26.
8. Lai R.K., Goldman P. Organic acid profiling in adipocyte differentiation of 3T3-F442A cells: increased production of Krebs cycle acid metabolites. Metabolism. 2003, May, 41(5): 545-547.
9. Asanuma N., Yoshii T., Hino. Molecular characterization of CcpA and involvement of this protein in transcriptional regulation of lactate dehydrogenase and pyruvate formate-lyase in the ruminal bacterium Streptococcus bovis. Appl Environ Microbiol., 2004, Sep. 70(9): 5244-51.
10. Upreti G.C., Jensen K., Munday R, Duganzich DM, Vishwanath R, Smith JF. Studies on aromatic amino acid oxidase activity in ram spermatozoa: role of pyruvate as an antioxidant. Anim Reprod Sci., 1998, 1(4): 275-287.
11. Greenfield R.B., Cecava M.J., Donkin S.S. Changes in mRNA expression for gluconeogenic enzymes in liver of dairy cattle during the transition to lactation. J Dairy Sci., 2000, 83(6): 1228-36.

## НЕСПЕЦИФИЧЕСКАЯ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ ОРГАНИЗМА ИНТЕНСИВНО РАСТУЩИХ БЫЧКОВ ПРИ СТИМУЛИРОВАНИИ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА

В.Ф. Сухих, С.В. Максименко  
Лаборатория иммунобиотехнологии

*Приведены первые результаты исследования регуляторного влияния пропиленгликоля(1,2-пропандиола) на элементы неспецифической резистентности и уровень иммуноглобулинов класса G у бычков холмогорской породы в период интенсивного роста и последующего откорма. В заключительный период откорма активность лизоцима в крови подопытных бычков превышала контроль на 15,3%, а концентрация иммуноглобулина G была выше на 15,9%(P<0,01).*

### Введение

Ранее нами была изучена связь эффективности использования азотистых веществ рациона при низкой распадаемости протеина в рубце с показателями неспецифической резистентности организма бычков (Сухих, Галочкина, 2006). Позднее мы изучили влияние различной распадаемости крахмала в рационе на показатели иммунологического профиля и неспецифической резистентности растущих бычков. В результате проведенного опыта установили

повышение активности лизоцима на 14,7% и увеличение концентрации сывороточного иммуноглобулина G на 9,0%.

Однако вопрос о роли углеводного компонента в регуляции мясной продуктивности жвачных остается окончательно нерешенным, что и побудило нас исследовать данную проблему. В качестве элемента, регулирующего углеводный обмен в организме животного, был использован пропиленгликоль, потому что в литературе представлен материал об использовании пропиленгликоля в качестве энергетического компонента рациона для коров в период раздоя (Шакиров, Кузнецов, 2006). В этом случае пропиленгликоль является субстратом для глюконеогенеза. Часть вновь синтезируемой глюкозы идет на образование лактозы, повышая тем самым уровень молочной продуктивности, а некоторое количество ее используется для образования триглицеридов и повышения жирности молока.

В организме животного из пропиленгликоля образуются эфиры органических кислот (эфир щавелевой кислоты). Эфиры связывают некоторое количество кетонных тел, предотвращая таким образом кетозы. Пропиленгликоль повышал среднесуточный удой на 9,5%, а в пересчете на базисную жирность молока разница между опытом и контролем составила 14% при снижении затрат кормов на получение 1 кг молока на 10,6%.

Конкретного материала о влиянии пропиленгликоля на неспецифическую резистентность организма бычков в литературе нет, и, тем не менее, поскольку глюкоза является основным энергетическим субстратом всех регуляторных механизмов в организме, то, следовательно, есть основание предполагать стимулирующее влияние препарата на эффективность неспецифической резистентности и иммунитета растущих животных.

Цель настоящей работы состояла в изучении действия экзогенных регуляторов углеводного обмена, в частности пропиленгликоля, на элементы неспецифической резистентности и иммунологического профиля бычков в период выращивания и откорма.

### **Материал и методы**

Работа выполнена в виварии института на 10 бычках холмогорской породы, поделенных на три группы. В предварительный и основной периоды опыта во всех группах было по 3 бычка, в заключительный период опыта в контрольной группе было 4 бычка, в опытной группе – 5 бычков. Бычков содержали на сбалансированном рационе, соответствующем массе животных и запланированному среднесуточному приросту. Кормление изменяли в соответствии с возрастом животных и предполагаемой продуктивностью 300-400 кг живой массы при среднесуточном приросте не менее 1000 г. Основу комбикорма для всех животных составляла ячменно-пшеничная смесь. Препарат давали в смеси с комбикормом. Суточная доза препарата составляла 80-250 мл, при этом изменение количества вводимого в рацион пропиленгликоля не зависело ни от возраста животного, ни от сезона года, а было обусловлено первоначально взятым количеством препарата. В качестве минимальной дозы бычки первой опытной группы получали 80 мл пропиленгликоля, а бычки второй опытной группы – 160 мл. Затем количество вводимого в рацион препарата увеличивали до 200 мл в сутки. В заключительный период опыта исследовали эффективность пропиленгликоля на фоне высокого содержания протеина

в рационе животных. Для этого в ежедневный рацион ввели 560 г соевого шрота, что увеличило содержание протеина на 16-17 % при повышении энергетической ценности на 7 Мдж/кг.

В качестве критериев иммунобиологического состояния организма бычков использовали концентрацию иммуноглобулинов в сыворотке крови, активность лизоцима и общую бактерицидную активность. Лизоцим определяли, используя в качестве тест-культуры *Micrococcus lysodeicticus* (Дорофейчук, 1968), бета-лизины с помощью *Bac. Subtilis* (Бухарин и др., 1972), общую бактерицидную активность по степени задержки роста культуры *E. coli* в среде, содержащей плазму крови подопытных животных. Иммуноглобулины класса G определяли иммуноферментным методом, используя иммуноспецифические антитела против обоих подклассов (H+I) иммуноглобулина G. Экспериментальный материал обрабатывали статистически, используя критерии Стьюдента.

### Результаты и обсуждение

В изменении показателей неспецифической резистентности животных наблюдали тенденцию к повышению уровня отдельных звеньев системы. Это не обязательно должно быть связано с продуктивностью, так как между иммунологическими показателями крови и продуктивностью животных не всегда наблюдается достоверная корреляционная связь.

**Таблица 1. Показатели неспецифической резистентности в плазме крови бычков, содержащихся на рационах с разным количеством пропиленгликоля**

| Показатели                        | Предвари-<br>тельный<br>период опы-<br>та | Основной период<br>опыта |                    | Заклю-<br>читель-<br>ный<br>период<br>опыта |
|-----------------------------------|-------------------------------------------|--------------------------|--------------------|---------------------------------------------|
|                                   |                                           | 25-й<br>день<br>опыта    | 55-й день<br>опыта |                                             |
|                                   |                                           |                          |                    |                                             |
| Общая бактерицидная активность(%) |                                           |                          |                    |                                             |
| Контрольная группа                |                                           |                          |                    |                                             |
| M±m                               | 37,7±1,5                                  | 30,1±3,8                 | 33,0±2,9           | 35,2±2,5                                    |
| Первая опытная группа             |                                           |                          |                    |                                             |
| M±m                               | 39,2±0,9                                  | 32,5±3,0                 | 37,3±1,5           | 39,7±2,5                                    |
| Процент к контролю                | 104,0                                     | 108,0                    | 113,0              | 127,7                                       |
| Достоверность различия, P         | >0,5                                      | >0,5                     | >0,2               | -                                           |
| Вторая опытная группа             |                                           |                          |                    |                                             |
| M±m                               | 38,2±2,5                                  | 33,1±0,6                 | 37,5±0,7           | -                                           |
| Процент к контролю                | 101,3                                     | 110,0                    | 113,6              | -                                           |
| Достоверность различия, P         | >0,5                                      | >0,5                     | >0,2               | -                                           |
| Лизоцим(%)                        |                                           |                          |                    |                                             |
| Контрольная группа                |                                           |                          |                    |                                             |
| M±m                               | 14,0±0,6                                  | 13,3±0,7                 | 15,7±0,7           | 15,3±0,5                                    |
| Первая опытная группа             |                                           |                          |                    |                                             |
| M±m                               | 15,0±0,6                                  | 14,0±1,0                 | 16,0±1,0           | 17,78±0,4                                   |
| Процент к контролю                | 107,1                                     | 105,3                    | 101,9              | 115,3                                       |
| Достоверность различия, P         | >0,5                                      | >0,5                     | >0,5               | <0,01                                       |
| Вторая опытная группа             |                                           |                          |                    |                                             |
| M±m                               | 15,3±0,3                                  | 14,3±0,7                 | 18,3±0,3           | -                                           |

|                           |       |       |       |   |
|---------------------------|-------|-------|-------|---|
| Процент к контролю        | 102,0 | 107,5 | 116,6 | - |
| Достоверность различия, P | >0,2  | >0,02 | <0,02 | - |

Например, при исследовании фагоцитарной, бактерицидной и лизоцимной активности в крови нескольких пород и внутривидовых конституциональных типов выявили различия (Улимбашев, 2006), не превышающие 2%. Представляется более вероятной связь иммунологического состояния животных с возрастом. К окончанию опыта, когда у животных наступила половая зрелость, наблюдали повышение уровня лизоцима (табл. 1) на 16,3-16,6% и иммуноглобулина класса G (табл. 2) на 15,9-18,6%, но в то же время у бычков контрольной группы концентрация иммуноглобулинов класса G в сравнении с предыдущим периодом опыта также повысилась.

**Таблица 2. Показатели неспецифической резистентности и иммунитета в плазме крови бычков, содержащихся на рационах с разным количеством пропиленгликоля**

| Показатели                      | Предвари-<br>тельный<br>период<br>опыта | Основной период опыта |                    | Заключи-<br>тельный<br>период<br>опыта |
|---------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------|--------------------|----------------------------------------|
|                                 |                                         | 25-й день<br>опыта    | 55-й день<br>опыта |                                        |
| Бета-лизины(%)                  |                                         |                       |                    |                                        |
| Контрольная группа              |                                         |                       |                    |                                        |
| M±m                             | 17,4±0,2                                | 17,6±0,2              | 17,9±0,2           | 18,6±0,4                               |
| Первая опытная группа           |                                         |                       |                    |                                        |
| M±m                             | 17,7±0,5                                | 18,9±0,3              | 19,1±0,4           | 19,9±0,4                               |
| Процент к контролю              | 101,7                                   | 107,4                 | 106,7              | 107,0                                  |
| Достоверность различия, P       | >0,5                                    | <0,05                 | >0,05              | >0,05                                  |
| Вторая опытная группа           |                                         |                       |                    |                                        |
| M±m                             | 17,9±0,2                                | 18,2±0,3              | 19,1±0,1           | -                                      |
| Процент к контролю              | 102,9                                   | 103,4                 | 106,7              | -                                      |
| P                               | >0,5                                    | >0,1                  | >0,01              | -                                      |
| Иммуноглобулины класса G(мг/мл) |                                         |                       |                    |                                        |
| Контрольная группа              |                                         |                       |                    |                                        |
| M±m                             | 12,0±0,8                                | 11,9±0,8              | 11,8±07            | 13,8±0,2                               |
| Первая опытная группа           |                                         |                       |                    |                                        |
| M±m                             | 11,1±0,7                                | 12,6±1,6              | 13,0±0,8           | 16,0±0,4                               |
| Процент к контролю              | 92,5                                    | 105,9                 | 116,9              | 115,9                                  |
| P                               | >0,1                                    | >0,5                  | >0,5               | <0,01                                  |
| Вторая опытная группа           |                                         |                       |                    |                                        |
| M±m                             | 11,1±0,6                                | 12,1±0,9              | 14,0±0,7           | -                                      |
| Процент к контролю              | 92,5                                    | 101,7                 | 118,6              | -                                      |
| P                               | >0,1                                    | >0,5                  | <0,05              | -                                      |

Это свидетельствует о том, что механизм регулирования мясной продуктивности иммунологическими факторами идет несколькими параллельными путями. И, тем не менее, прослеживается непосредственная связь факторов неспецифической резистентности с продуктивностью животных. В заключительный период опыта, когда среднесуточный прирост у подопытных и контрольных животных существенно различался (на 14,6%), уровень иммуноглобулинов класса G у бычков в опытной группе был выше на 15,9%, активность бета-лизинов повысилась на 7,0%, лизоцима- на 16,3%, а бактерицидная ак-

тивность увеличилась на 12,7%. В некоторых случаях, в частности по иммуноглобулинам класса G, различие между группами было статистически достоверным. Отсюда следует, что изменение иммунологической составляющей в комплексе регуляторных механизмов мясной продуктивности является более стабильным, чем изменение показателей неспецифической резистентности.

Поскольку различие в среднесуточном приросте у подопытных и контрольных бычков наблюдали только в конце опыта, и различие в показателях неспецифической резистентности отмечалось в тот же период, то следует заключить, что биологическое действие пропиленгликоля возникает не сразу, а нарастает постепенно.

### **Заключение**

Показатели неспецифической резистентности и иммунитета у бычков под влиянием пропиленгликоля повышаются раньше, чем наступают изменения в росте (в среднесуточном приросте) животных; эти изменения наиболее выражены в заключительный период опыта, когда они соответствуют значению среднесуточного прироста животных; при суточной дозе пропиленгликоля 80 мл показатели неспецифической резистентности и иммунитета изменяются в меньшей степени, чем при дозах, превышающих 160 мл, а поскольку в этот период между опытом и контролем в величине среднесуточного прироста было наибольшее различие, то следует заключить, что только доза пропиленгликоля, равная 160 мл, является достаточной для получения биологического эффекта.

### **ЛИТЕРАТУРА**

1. Сухих В.Ф., Галочкина В.П. Влияние кормов с низкой распадаемостью протеина в рубце на показатели неспецифической резистентности и продуктивности откармливаемых бычков. Труды ВНИИФБиП с-х животных, 2006, 45: 108-115.
2. Дорофейчук В.Г. Определение активности лизоцима нефелометрическим методом. Лаб. дело, 1968, 1:28.
3. Бухарин О.В. Фролов Б.А., Луда А.П. Ускоренный метод определения бета-лизинов в сыворотке крови. Журнал микробиол., эпидемиол. и иммунол., 1972: 119-42.
4. Улимбашев М.Б. Продуктивные и иммунологические показатели крупного рогатого скота. Вестник РАСХН, 2006, 1: 74-77.
5. Вирки М. Когда коровам нужна помощь. Животноводство России, 2003, окт.: 26-27.
6. Шакиров Ш., Кузнецов А., Таранович А., Пропиленгликоль в рационах высокопродуктивных коров. Молочное и мясное скотоводство, 2006, 7:31-32.

## ТЕСТИРОВАНИЕ ОБЕСПЕЧЕННОСТИ ВИТАМИНАМИ БЫЧКОВ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ УРОВНЯХ ПРОПИЛЕНГЛИКОЛЯ В РАЦИОНЕ

В.И. Дудин, Т.Е. Рябых

Лаборатория БАВ и сертификации кормов

*В связи с использованием пропиленгликоля в качестве дополнительного источника углеводного питания существенные изменения претерпевали концентрации тиамина и пирувата, как следствие действия пропиленгликоля на увеличение фонда пирувата в организме бычков. Эти изменения в гораздо большей степени относились к тиамину и состояли в усилении появления свободного тиамина в крови, скорее всего, как следствие большего синтеза тиамина в желудочно-кишечном тракте, возможно под влиянием пропиленгликоля. В печени пропиленгликоль также вызывал достоверное повышение фонда пирувата и в результате существенно (статистически достоверно) увеличивал вовлечение тиамина для участия в пируватдегидрогеназном комплексе.*

### Введение

Лучшая эффективность процессов биосинтеза компонентов мяса в организме растущего молодняка скота связана с оптимальным соотношением глюкозы и аминокислот в рационе. Процессы регуляции метаболизма в системе дыхание/гликолиз/глюконеогенез являются определяющими для обеспечения нормального роста, особенно молодняка животных. Большой интерес представляет идея применения в кормлении простых соединений, легко превращающихся в ключевые метаболиты, такие как пируват. Здесь чрезвычайно важны последствия этих количественных модификаций фонда пирувата. Ввиду того, что водорастворимые и жирорастворимые витамины участвуют в метаболизме на его важнейших участках, обеспечение оптимальных условий витаминного питания очень важно для поддержания обменных процессов в норме. При этом следует учитывать участие рубца в разрушении жирорастворимых и в биосинтезе водорастворимых витаминов. Выходом из этой ситуации является разработка функциональных тестов контроля обеспеченности животных витаминами. В институте разработаны тесты определения обеспеченности свиней рибофлавином, ретинолом,  $\alpha$ -токоферолом, ниацином, тиамин. В настоящей работе начаты исследования по верификации этих тестов в отношении растущих бычков. В их числе выбран тест на тиамин, который состоит в расчете отношения пирувата в свободному тиамину в крови или в выделении пирувата с суточной мочой. Необходимо было установить, влияет ли модификация пула пирувата в организме растущих бычков на воспроизводимость теста обеспеченности тиамин.

### Материалы и методы

Для решения поставленных задач проведен опыт в условиях вивария института на молодняке крупного рогатого скота. Опыт был проведен методом групп и периодов на 8-месячных бычках холмогорской породы с живой массой в начале опыта 150-160 кг. Содержание животных привязное, кормление индивидуальное, 2-х разовое с ежедневным учетом потребления корма. Для

оценки интенсивности роста ежемесячно до утреннего кормления в течение 2-х смежных дней проводили взвешивание животных.

В предварительный период опыта в течение 2-х месяцев животные находились на одном и том же рационе. Бычков приучали к максимальному потреблению сена и силоса, а их среднесуточный прирост живой массы достигал 700-800 г. В последующем по принципу аналогов с учетом живой массы и интенсивности роста бычки были разделены на 3 группы по 3 головы в каждой. Животные всех групп получали одинаковый рацион, сбалансированный по питательным веществам согласно существующим нормам для молодняка при интенсивном выращивании и откорме, обеспечивающий среднесуточный прирост 1000-1400 г (Калашников и др., 2003). В его состав входило сено злаковое, силос злаковый и комбикорм в количестве 55-60% по обменной энергии.

Бычкам 1-й группы при каждом кормлении к разовой порции комбикорма добавляли пропиленгликоль в количестве 40 (80 в сутки) мл, а животным 2-й группы в количестве 80 (160 в сутки) мл. Группа 3 была контрольной. Продолжительность этой серии экспериментов 41 сутки. В начале и в конце опыта была взята кровь из яремной вены до утреннего кормления. В конце опыта был проведен балансовый опыт.

Во второй серии опытов суточная доза пропиленгликоля составила 200 мл (1 гр) и 250 мл (2 гр). Продолжительность опыта 43 суток.

В третьей серии опытов эксперимент после уравнительного периода был продолжен на 2-х группах бычков по 5 голов в каждой. Одна группа – контроль (2), другая (1) получала пропиленгликоль в дозе 250 мл в сутки. Продолжительность опыта 48 суток.

В конце опыта была взята кровь из яремной вены до утреннего кормления. Был проведен балансовый опыт. По окончании опытов животные были убиты с последующей обваловкой туш для определения убойных качеств и отбора образцов крови, печени, длиннейшей мышцы спины, жира.

Были определены витамины А и Е в кормах и крови (Скурихин и Двинская, 1989), в печени, мышцах и жире (Скурихин и Шабаев, 1996). В области изучения статуса водорастворимых витаминов планируется определение витамина В<sub>1</sub> в цельной крови. При постановке теста обеспеченности свиней витамином В<sub>1</sub> дополнительно проведено определение пировиноградной кислоты в плазме и моче по известным прописям (Петрунькина, 1961). В процессе экспериментов начата разработка теста определения обеспеченности организма бычков фолиевой кислотой путем ее определения в крови, печени, моче. Помимо этого проводилось определение в моче количества уроганиновой кислоты, уровень которой в моче, согласно данным литературы (Степанова и др., 1979), хорошо соответствует степени обеспеченности организма витамином В<sub>с</sub>.

### **Результаты и обсуждение**

Как уже сообщалось, тестирование обеспеченности животных тиаминном первоначально отрабатывалось на свиньях. Тогда было предложено определять отношение концентрации пирувата к концентрации свободного тиамина в цельной крови. Этот тест мы применили в эксперименте на бычках (таблица 1). Основное воздействие на животных – это скармливание пропиленгли-

коля, способного изменять углеводный метаболизм. Судя по нашим данным, статистически достоверные сведения существуют только в отношении межгрупповой разницы в концентрации свободного тиамина в крови. Концентрация в ней пирувата имела некоторые межгрупповые различия, но они не были статистически достоверными.

Судя по результатам исследований, включение в рацион пропиленгликоля вносит определенный вклад в фонд пирувата организма бычков, размер которого регулируется пируватдегидрогеназным комплексом. Активизация этой ферментной системы в наших исследованиях сопровождалась уменьшением пула свободного тиамина. Изменения теста обеспеченности бычков тиамином под влиянием пропиленгликоля были хорошо заметны лишь в последней фазе опыта, но разница из-за больших индивидуальных колебаний оказалась статистически недостоверной ( $P=0,058$ ). На этом основании можно считать, что включение в рацион пропиленгликоля не накладывает ограничений для применения теста контроля обеспеченности бычков тиамином, основанного на определении отношения концентрации пирувата к концентрации свободного тиамина в цельной крови.

**Таблица 1. Результаты тестирования обеспеченности бычков тиамином в процессе экспериментов со скормливанием пропиленгликоля**

| Группы                          | 21.12.2005   | 18.01.2006   | 14.03.2006  | 27.04.2006   |
|---------------------------------|--------------|--------------|-------------|--------------|
| <i>Пируват, мкг/мл</i>          |              |              |             |              |
| 1                               | 12,37±0,31   | 11,24±0,67   | 7,27±0,44   | 14,91±1,71   |
| 2                               | 12,43±0,51   | 10,62±0,63   | 7,36±0,51   |              |
| 3                               | 12,46±0,80   | 11,71±2,01   | 5,96±0,41   | 15,56±2,21   |
| <i>Свободный тиамин, мкг/мл</i> |              |              |             |              |
| 1                               | 0,104±0,003  | 0,103±0,030* | 0,105±0,002 | 0,172±0,019* |
| 2                               | 0,103±0,003  | 0,079±0,001* | 0,095±0,007 |              |
| 3                               | 0,101±0,005  | 0,098±0,003  | 0,087±0,005 | 0,100±0,006  |
| <i>Отношение пируват/тиамин</i> |              |              |             |              |
| 1                               | 121,81± 2,28 | 109,32± 3,76 | 69,35±5,08  | 92,05±14,71  |
| 2                               | 121,43± 4,57 | 133,97± 8,34 | 77,26±2,74  |              |
| 3                               | 125,17±13,09 | 119,23±20,06 | 69,93±7,98  | 157,29±25,63 |

Примечание: \* от 18.01.06:  $P_{1vs2}=0.0014$ ;  $P_{2vs3}=0.0285$   
от 27.04.06:  $P_{1vs2}=0.0071$

В текущем году мы начали разработку теста биохимического контроля обеспеченности животных фолатином. В первую очередь интерес представляло прямое определение витамина в цельной крови (таблица 2). По полученным нами результатам, в первой серии опытов отмечаются самые существенные (статистически достоверные) изменения концентрации фолацина в цельной крови. При этом, добавки пропиленгликоля увеличивали, тогда как в последующие серии опытов, наоборот, понижали концентрацию фолацина в цельной крови бычков, статистически достоверно во второй серии опытов. Здесь, скорее всего, сказывалась величина дозы препарата. Ее действие стало проявляться уже в первую фазу опыта, когда более высокая дозировка пропиленгликоля (160 мл) имела меньший эффект на концентрацию изучаемого вещества по сравнению с более низкой дозой (80 мл).

**Таблица 2. Концентрация фолатина в цельной крови бычков в связи со скормливанием пропиленгликоля, нг/мл**

| Группы | 21.12.2005 | 18.01.2006  | 14.03.2006  | 27.04.2006 |
|--------|------------|-------------|-------------|------------|
| 1      | 28,45±2,36 | 44,02±0,66* | 17,29±2,02* | 8,92±0,71  |
| 2      | 28,45±3,55 | 32,53±1,11* | 24,21±1,5   |            |
| 3      | 26,7±2,18  | 26,0 ±1,58  | 27,43±2,64  | 11,62±2,33 |

Примечание: \* от 18.01.06:  $P_{1vs2} = 0,0009$ ;  $P_{1vs3} = 0,0035$ ;  $P_{2vs3} = 0,0319$ ; от 14.03.06:  $P_{1vs3} = 0,0475$

Здесь, скорее всего, существует баланс между стимулированием пропиленгликолем синтеза фолатина в рубце и расходом его в тканях в связи с метаболизацией введенного вещества. Содержание фолатина в цельной крови считается важным при диагностике недостаточности фолиевой кислоты в организме животных. В наших опытах снижение концентрации фолатина в цельной крови не является столь существенным, чтобы свидетельствовать о значительном снижении фонда этого витамина в организме бычков.

При разработке тестов в качестве субстратов предпочтительны экскременты, особенно моча, отражающая межклеточный обмен. В наших исследованиях (таблица 3), концентрация в моче фолатина выглядит заметной, по сравнению с известной для человека (2,3 – 10 мкг/сутки), что скорее всего обусловлено способностью экосистемы рубца синтезировать этот витамин. Добавки пропиленгликоля несколько увеличивали указанный показатель, но статистически недостоверно ( $P=0,4424$ ).

**Таблица 3. Выделение фолатина, пирувата, свободного тиамин и уроганиновой кислоты с мочой бычков в связи со скормливанием пропиленгликоля**

| Показатели           | Концентрация, мкг/мл |                    | Суточное выделение с мочой, мг |                  |
|----------------------|----------------------|--------------------|--------------------------------|------------------|
|                      | гр.1                 | гр.2               | гр.1                           | гр.2             |
| Фолатин              | 11,09±2,11<br>нг/мл  | 9,15±0,42<br>нг/мл | 113,55±27,3<br>мкг             | 85,6±16,5<br>мкг |
| Пируват              | 15,01±1,71           | 16,49±1,76         | 143,76±11,55                   | 152,7±28,11      |
| Тиамин               | 1,19±0,081*          | 0,90±0,050         | 11,45±0,44*                    | 8,09±0,85        |
| Пируват/тиамин       | 12,70±1,37           | 17,59±1,55         | 12,70±1,37                     | 17,59±1,55       |
| Уроганиновая кислота | 5,75±0,39            | 5,58±0,40          | 55,38±2,09                     | 51,08±7,36       |

Примечание: \*Тиамин :  $P=0,036$  и  $0,0408$

Примененные на бычках воздействия мало влияли также на выделение с мочой уроганиновой кислоты. Из этого не следует, что определение уроганиновой кислоты в моче на предмет тестирования обеспеченности фолатином организма жвачных непригодно. Для таких выводов необходимо провести эксперимент на животных с разной обеспеченностью фолатином. Вместе с тем из того, что мы имеем, лучшим вариантом для тестирования может считаться определение фолатина в цельной крови бычков.

При изучении концентрации и суточного содержания в моче фолатина, пирувата, уроганиновой кислоты и тиамин достоверная разница между группами была обнаружена только в отношении тиамин. Этот факт хорошо

увязывается со скормливанием пропиленгликоля. В связи с участием пропиленгликоля в формировании фонда пирувата и отсутствием достоверных различий в содержании пирувата в изучаемых объектах можно заключить, что фонд пирувата в организме корректировался за счет пируватдегидрогеназного комплекса. В пользу этого свидетельствует отношение пирувата к тиамину, меньшее у бычков, получавших пропиленгликоль.

Анализ содержания изучаемых веществ (таблица 4) в печени интересен тем, что для фолацина скормливание пропиленгликоля не создавало необычных биохимических условий, в связи с этим не было существенных изменений ни концентрации, ни тотального его содержания в этом органе.

**Таблица 4. Содержание тиамина, пирувата, фолацина и пропиленгликоля в печени бычков в связи со скормливанием пропиленгликоля**

| Показатель                      | Группы        |              |
|---------------------------------|---------------|--------------|
|                                 | 1             | 2            |
| <i>Концентрация, мкг/г</i>      |               |              |
| Тиамин                          | 25,38±2,78*   | 50,59±3,59   |
| Пируват                         | 14,74±1,06    | 12,25±1,02   |
| Фолацин, нг/г                   | 450,12±7,12   | 469,55±29,26 |
| <i>Тотальное содержание, мг</i> |               |              |
| Тиамин                          | 162,99±17,60* | 278,71±16,30 |
| Пируват                         | 90,94±6,35*   | 68,59±4,96   |
| Фолацин                         | 2,78±0,06     | 2,59±0,19    |

Примечание: \*Тиамин: P = 0,001 и 0,0038; \*Пируват: P=0,0423

В то же время отмечено достоверное увеличение тотального содержания пирувата в печени при резком и высокодостоверном снижении фонда свободного тиамина в цитоплазме клеток печени, что неминуемо связано с повышением активности пируватдегидрогеназного комплекса, а следовательно судьба пропиленгликоля в данном случае может быть связана с его участием через пируват в работе цикла трикарбоновых кислот. Пируваткарбоксилаза включает другой витамин – биотин. Мы этот витамин не исследовали, поэтому нет возможности сделать предположение об усилении или ослаблении этого пути метаболизации пирувата.

Что касается уровня жирорастворимых витаминов А и Е, то и в их отношении в организме в связи со скормливанием пропиленгликоля не складывалось необходимых условий, побуждающих эти системы заметно измениться (таблицы 5 и 6). Это рассуждение базируется на одном и том же фоне витаминов в рационах всех групп.

**Таблица 5. Концентрация и тотальное содержание витаминов А и Е в плазме крови бычков в связи со скормливанием пропандиола**

| Группы                  | 21.12.2005  | 18.01.2006  | 16.02.2006  | 14.03.2006  | 27.04.2006  |
|-------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Альфа-токоферол, мкг/мл |             |             |             |             |             |
| 1                       | 4,10±0,164  | 4,01±0,218  | 4,84±0,068  | 5,13±0,416  | 5,44±0,163  |
| 2                       |             | 4,12±0,162  | 4,87±0,338  | 5,18±0,235  |             |
| 3                       |             | 4,05±0,117  | 4,67±0,205  | 5,27±0,253  | 5,40±0,123  |
| Ретинол, мкг/мл         |             |             |             |             |             |
| 1                       | 0,338±0,019 | 0,335±0,023 | 0,337±0,018 | 0,346±0,015 | 0,342±0,014 |
| 2                       |             | 0,351±0,015 | 0,351±0,020 | 0,357±0,009 |             |

|   |             |             |             |             |
|---|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 3 | 0,340±0,008 | 0,346±0,004 | 0,344±0,013 | 0,353±0,015 |
|---|-------------|-------------|-------------|-------------|

**Таблица 6. Концентрация и тотальное содержание альфа-токоферола и ретинола в органах и тканях бычков в связи со скармливанием им пропиленгликоля**

| Ткани                  | 1 группа    |               | 2 группа     |               |
|------------------------|-------------|---------------|--------------|---------------|
|                        | Мкг/г       | Мг/орган/туша | Мкг/г        | Мг/орган/туша |
| <i>Альфа-токоферол</i> |             |               |              |               |
| Печень                 | 11,27±0,613 | 69,41±3,52    | 11,03±1,04   | 61,15±5,51    |
| Жир                    | 0,952±0,033 | -             | 0,955±0,06   | -             |
| Фарш мякоти            | 0,867±0,050 | 131,38±7,25   | 0,871±0,06   | 124,69±8,55   |
| Мышцы                  | 1,35± 0,083 | -             | 1,36±0,039   | -             |
| <i>Ретинол</i>         |             |               |              |               |
| Печень                 | 149,15±11,6 | 914,83±55,18  | 162,69±22,34 | 899,7±121,4   |
| Жир                    | 0,321±0,010 | -             | 0,304±0,014  | -             |
| Фарш мякоти            | 0,234±0,010 | 35,53±1,89    | 0,233±0,015  | 33,56±2,96    |
| Мышцы                  | 0,057±0,002 | -             | 0,051±0,001  | -             |

В качестве теста обеспеченности организма животных фолатом, судя по полученным результатам, наиболее удачным является измерение концентрации его в цельной крови, что подтверждает имеющиеся в литературе сведения. Кроме того, определение уроганиновой кислоты представляет собой довольно громоздкий процесс, включающий выделение ферментного препарата и нагрузку испытуемых животных гистидином.

### Заключение

Таким образом, существенные изменения в связи со скармливанием пропиленгликоля претерпевали системы тиамина и пирувата, как следствие действия пропиленгликоля по увеличению фонда пирувата в организме бычков. Эти изменения в гораздо большей степени относились к тиамину и состояли в усилении появления свободного тиамина в крови. В печени пропиленгликоль вызывал достоверное повышение фонда пирувата и в результате существенно (статистически достоверно) увеличивал вовлечение тиамина в биохимические процессы для участия в пируватдегидрогеназном комплексе. В то же время в примененных дозах пропиленгликоль практически не сказывался на постановке тиаминного теста, рассчитанного как отношение концентраций пирувата и свободного тиамина в цельной крови. При этом, пропиленгликоль не влияет на обмен изученных витаминов, поэтому он может применяться в кормлении бычков.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Калашников А.П. Нормы и рационы кормления с.-х. животных. Москва. 2003: 455с.
2. Петрунькина А.И. Практическая биохимия. Л: Медгиз, 1961
3. Скурихин В.Н., Двинская Л.М. Определение альфа-токоферола и ретинола в плазме крови сельскохозяйственных животных методом ВЭЖХ. Сельскохозяйственная биология, 1989, 4: 127-129.

4. Скурихин В.Н., Шабает С.В. Методы анализа витаминов А,Е,Д и каротина в кормах, биологических объектах и продуктах животноводства. М: Химия,1996.
5. Степанова Е.Н., Григорьева М.П., Коновалова Л.В. Фолацин. Сб. Экспериментальная витаминология, 1979: 345-384

## **УЧАСТИЕ БЕТА-АМИНОКИСЛОТ В АЗОТИСТОМ ПИТАНИИ ЛАКТИРУЮЩИХ КОРОВ**

*Е.В. Швакель*

*Инфузия таурина и β-аланина в кишечник коров в первую фазу лактации повышает выделение молочного белка на 5,9-6,7% по сравнению с контролем, а при сочетании β-аланина с гистидином на 13,7%. Оптимальный уровень гистидина в доступном белке для коров в разгар лактации составляет не менее 2,7%.*

### **Введение**

Питание животных, адекватное их физиологическим потребностям, возможно на основе обеспечения всех функций организма необходимыми субстратами. Одним из важнейших субстратов для жизнедеятельности и продуктивности животных являются аминокислоты. Для коров в период лактации необходимо соблюдать такое соотношение аминокислот и их уровней в крови, при котором идет наиболее эффективное образование компонентов молока и, в первую очередь, белка.

Поступление аминокислот из пищеварительного тракта в кровь обеспечивается за счет кормов рациона. Наряду с незаменимыми аминокислотами, в обеспечении коров обменным протеином важную роль играет ряд заменимых аминокислот. Они или входят в состав молочного белка, или выполняют важную регуляторную роль в обмене веществ. К таким аминокислотам относятся – таурин, бета-аланин и др. На их образование в тканях, и особенно в молочной железе, используется значительное количество незаменимых аминокислот, которое возрастает при относительно недостаточном поступлении вышперечисленных заменимых аминокислот. Таким образом, можно полагать, что обеспечение оптимального поступления бета-аминокислот в молочную железу с кровью сократит расход незаменимых аминокислот.

Роль бета-аминокислот как регуляторов обменных процессов в организме и особенности их обмена достаточно подробно изучены (Нефедов, 1990, Раевский, Георгиев, 1986). Однако все эти исследования выполнены на лабораторных животных и на фоне патологии. В медицине в основном используются свойства этих аминокислот как нейромедиаторов. Для некоторых грызунов и кошек таурин является, по ряду сведений (Раевский, Георгиев, 1986, Нефедов, 1990), незаменимой аминокислотой и вводится в состав кормов для последних.

Аминокислота таурин, как серосодержащая, образуется из цистеина, а последний имеет своим предшественником в организме метионин. Это и позволяет полагать, что оптимальное обеспечение организма таурином за счет

набора определенных кормов позволит снизить расход метионина на образование таурина. Бета-аланин имеет своим предшественником аспарагиновую кислоту, из которой он образуется в результате декарбоксилирования (т.е. бета-аланин как и таурин является амином). Помимо участия в обмене веществ в составе дипептида карнозина, эта бета-аминокислота выполняет многочисленные самостоятельные регуляторные функции, будучи нейромедиатором и биохимически активным метаболитом. Производные бета-аланина участвуют в обмене других аминокислот, синтезе гормонов, оказывают берегающее действие на карнозин, ансерин, пантотеновую кислоту, КоА, аспартат, дигидроурацил (Раевский, Георгиев, 1986; Страйер, 1985). Применительно к питанию жвачных, в том числе молочных коров, роль бета-аминокислот и особенности их превращения практически не изучены, хотя известно, что эти аминокислоты имеются в составе кормов, особенно силосованных, и в кормах животного происхождения.

В связи с этим основной задачей исследований было изучить роль бета-аминокислот в азотистом питании молочных коров и влияние их на обеспеченность лимитирующими аминокислотами.

### **Материал и методы**

Экспериментальную часть работы проводили на 3 лактирующих коровах холмогорской породы в условиях вивария ВНИИФБиП. Животным была наложена канюля на двенадцатиперстную кишку и выведена под кожу сонная артерия. Содержание привязное, поение вволю из автопоилок. Рацион был сбалансирован по нормам, разработанным во ВНИИФБиП (Физиол. потребности..., 2001), и включал сено злаковое многолетних трав, силос разнотравный и комбикорм, составляющий 60% по энергетической питательности. В рационе содержалось: обменной энергии – 147,5 МДж, сырого протеина – 2480 г, обменного протеина 1934 г. На фоне такого уровня кормления коровам периодами по 5 дней в течение 12 часов ежедневно инфузирвали раствор одной из изучаемых аминокислот в объеме 3 л в двенадцатиперстную кишку через канюлю. В одном случае вводили таурин и его сочетание с глутаматом натрия, в другом – бета-аланин и его смесь с гистидином. Дозы инфузируемых аминокислот составляли около 2,5% от уровня обменного протеина.

В течение опыта ежедневно учитывали молочную продуктивность и потребление кормов. В конце каждого периода инфузии в течение суток собирали мочу и отбирали пробы молока для анализа; двукратно брали кровь из сонной артерии и молочной вены: утром до кормления (в 7 часов) и через 3 часа после него (в 11 часов).

Был проведен зоотехнический анализ кормов. В пробах молока анализировали общий азот и жир, в крови – мочевины и глюкозу, в моче – азот. Статистическую обработку полученных данных проводили методом парных сравнений (Асатиани, 1965).

### **Результаты и обсуждение**

Инфузия серосодержащей аминокислоты таурина в кишечник в дозе 25 г в форме водного раствора в течение 5 суток привела к увеличению среднесуточного удоя коров на 7,3% и выделения суточного количества молочного

белка на 6,6%, при некотором снижении его процентного содержания, по сравнению с исходным (контрольным) периодом (табл. 1).

*Таблица 1. Продуктивность коров в период проведения опытов*

| Период опыта, вводимая аминокислота | Продуктивность, кг/сут | Белок молока |                       | Жир молока |                    |
|-------------------------------------|------------------------|--------------|-----------------------|------------|--------------------|
|                                     |                        | %            | кол-во в сут. удое, г | %          | кол-во в сут. удое |
| Контроль                            | 19,4                   | 3,23         | 626,3                 | 3,76       | 729,4              |
| Инфузия таурина                     | 20,8                   | 3,21         | 667,7                 | 3,73       | 775,8              |
| % к контролю                        | +7,3                   |              | +6,6                  |            | +6,4               |
| Контроль                            | 18,7                   | 3,02         | 564,7                 | 3,63       | 677,9              |
| Инфузия таурина+глутамата           | 19,1                   | 3,13         | 587,8                 | 3,73       | 712,4              |
| % к контролю                        | +2,1                   |              | +5,9                  |            | +4,5               |
| Контроль                            | 18,5                   | 2,98         | 551,3                 | 3,63       | 671,6              |
| Инфузия β-аланина                   | 18,9                   | 3,11         | 588,2                 | 3,60       | 680,4              |
| % к контролю                        | +2,2                   |              | +6,7                  |            | +1,3               |
| Контроль                            | 19,7                   | 3,03         | 596,3                 | 3,63       | 715,1              |
| Инфузия β-аланина+гистидина         | 20,2                   | 3,36         | 673,7                 | 3,51       | 709,0              |
| % к контролю                        | +2,5                   |              | +13,7                 |            | -0,9               |

Через 3 часа после начала инфузии таурина в крови повысился уровень мочевины в среднем на 27,6%, причем эта тенденция сохранялась и через 12 часов после окончания введения аминокислоты, по сравнению с контролем (табл. 2).

*Таблица 2. Концентрация мочевины в крови коров и выделение азота с мочой*

| Период опыта, вводимая аминокислота | Содержание мочевины в крови, ммоль/л |       |         |            | Азот мочи |                         |
|-------------------------------------|--------------------------------------|-------|---------|------------|-----------|-------------------------|
|                                     | в 7 ч                                | в 11ч | ± к 7 ч | ± к 7 ч, % | г/гол/сут | % от принятого с кормом |
| Контроль                            | 2,77                                 | 2,97  | +0,20   | +7,2       | 80,36     | 28,7                    |
| Инфузия таурина                     | 3,18                                 | 3,79  | +0,61   | +19,2      | 87,67     | 31,2                    |
| % к контролю                        | +14,8                                | +27,6 |         |            |           |                         |
| Контроль                            | 3,04                                 | 3,22  | +0,18   | +5,9       |           |                         |
| Инфузия таурина и глутамата         | 3,09                                 | 3,07  | -0,02   | -0,6       | 73,71     | 26,8                    |
| % к контролю                        | +1,6                                 | 4,66  |         |            |           |                         |
| Контроль                            | 2,72                                 | 2,94  | +0,22   | +8,1       |           |                         |
| Инфузия β-аланина                   | 3,00                                 | 3,55  | +0,55   | 18,3       | 83,22     | 29,2                    |
| % к контролю                        | +10,3                                | +20,8 |         |            |           |                         |
| Контроль                            | 2,43                                 | 2,61  | +0,18   | +7,4       |           |                         |
| Инфузия β-аланина и гистидина       | 2,56                                 | 2,81  | +0,25   | +9,8       | 80,08     | 28,1                    |
| % к контролю                        | +5,4                                 | +7,7  |         |            |           |                         |

В работе Нефедова (1990) отмечена активация цикла мочевинообразования и глюконеогенеза из аминокислот у крыс на фоне токсического гепатита при пероральном введении таурина. Полученные в наших опытах результаты в определенной мере позволяют предположить аналогичные пути воздействия таурина и у молочных коров, поскольку отмечено повышение уровня мочевины в крови как по сравнению с контрольным периодом, так и с последующими опытами. При этом возросло выделение азотистых веществ с мочой, которые представлены, как известно, в основном мочевиной (табл.2). Суточное количество выделенного с мочой азота у опытных коров составило 31,2% от потребленного с кормом, и этот показатель превышал по величине аналогичные показатели в другие периоды опыта.

Снижение уровня глюкозы в крови коров при инфузии таурина связано с повышением его потребления молочной железой на синтез лактозы и обеспечение энергетических процессов. Хотя в этом случае и предполагается активация гликонеогенеза из аминокислот, но образовавшаяся глюкоза не компенсирует ее количества, необходимого для потребления молочной железой (табл. 3).

*Таблица 3. Содержание глюкозы в крови коров, ммоль/л*

| Период опыта, вводимая аминокислота | Сонная артерия | Молочная вена | ± к артериальной крови | Интенсивность поглощения, % |
|-------------------------------------|----------------|---------------|------------------------|-----------------------------|
| Контроль                            | 2,31           | 1,89          | −0,47                  | 20,3                        |
| Инфузия таурина                     | 2,19           | 1,73          | −0,46                  | 21,0                        |
| Инфузия таурина и глутамата         | 2,12           | 1,59          | −0,53                  | 25,0                        |
| Инфузия β-аланина                   | 2,43           | 1,65          | −0,78                  | 32,1                        |
| Инфузия β-аланина и гистидина       | 2,64           | 1,68          | −0,96                  | 36,3                        |

Инфузия раствора, включающего половинную дозу таурина с добавлением 25 г глутамата, как и в первом периоде, повысила продукцию молочного белка почти на 6%. При этом отмечено некоторое увеличение концентрации белка в молоке (+3,6 отн.%) по сравнению с контрольным периодом (табл. 1). Характерным было определенное снижение уровня мочевины в крови через 3 часа после введения смеси аминокислот по сравнению с контрольным периодом (табл. 2), а также выделения азота с мочой. В этих изменениях просматривается участие глутаминовой кислоты, являющейся активным компонентом системы связывания аммиака в организме с образованием глутамина или обеспечения орнитинового цикла аммиаком после дезаминирования (Маркова, Шабалов, 1993; Страйер, 1985). Подобные закономерности изменения уровня мочевины в крови коров и выделения азота с мочой при инфузии глутамата наблюдались ранее, но доза вводимого препарата была в 2 раза выше.

Существенных изменений уровня глюкозы в крови коров по сравнению с предшествующим периодом, когда вводили один таурин, в проведенном опыте не отмечено, кроме некоторого увеличения поглощения глюкозы молочной железой (табл. 3). Хотя глутаминовая кислота и относится к группе глюкогенных аминокислот, но в данном случае ее доза была относительно не-

большой для достижения глюкогенного эффекта. Изучение ее действия в сочетании с таурином в нашем опыте обосновано тем, что в опытах на лабораторных животных с патологией печени установлено нормализующее действие таурина на обмен глутамата (Нефедов, 1990). Особенно сложные взаимоотношения между двумя этими аминокислотами, как разнонаправленными по действию нейромедиаторами, установлены в структурах головного мозга (Раевский, Георгиев, 1986). Как упоминалось ранее, подобные исследования взаимоотношений таурина и глутаминовой кислоты на сельскохозяйственных животных не проводились, в том числе с позиции азотистого обмена и питания.

Введение в кишечник раствора  $\beta$ -аланина несколько увеличило выделение молока (на 2,2%), по сравнению с контрольным периодом (табл. 1). За счет повышения содержания белка в молоке общая продукция молочного белка возросла на 6,7%. Повысился на 2,1% уровень мочевины в крови коров через 3 часа после начала инфузии бета-аланина по сравнению с аналогичным моментом в контрольный период, а выделение азота с мочой составило 29,2% от принятого с кормом (табл. 2). Вместе с тем, интенсивность поглощения глюкозы молочной железой оказалась более высокой в сравнении с предыдущим периодом опыта (табл. 3), но при этом уровень глюкозы в «общей» крови отличался на 11,0% в сторону повышения.

Имеющиеся сведения по физиологической роли  $\beta$ -аланина (Раевский, Георгиев, 1986) позволяют рассматривать возможность воздействия этой аминокислоты на молокообразование путем оптимизации кровоснабжения молочной железы, что имеет немаловажное значение для обеспечения синтетических процессов в ней метаболитами и регуляторами. Ранее было выяснено стимулирующее действие  $\beta$ -аланина на процессы сычужной секреции, переваривания и всасывания питательных веществ, эффективность их использования организмом молодняка крупного рогатого скота (Харитонов, Матвеев и др., 2001). Вероятно, подобное влияние эта бета-аминокислота могла оказать и при инфузии в кишечник на организм молочных коров, что в итоге способствовало увеличению продукции молока в их молочной железе.

Известно, что  $\beta$ -аланин участвует в образовании главного катализатора энергетического обмена – коэнзима А, являясь его составной частью (Страйер, 1985). В головном мозге  $\beta$ -аланин является важнейшим координатором фонда возбуждающих и тормозящих нейромедиаторов, в частности, поглощения глиальными клетками глутамата (возбуждающего нейромедиатора) (Раевский, Георгиев, 1986). Действие  $\beta$ -аланина во многом сходно с таковым таурина (оба тормозящие нейромедиаторы), но при транспорте через клеточные мембраны они проявляют свойства антагонистов, являясь структурными аналогами. Можно полагать, что в итоге  $\beta$ -аланин оказывает на процессы пищеварения и обмен веществ действие, подобное в определенной мере действию парасимпатической нервной системы.

В следующий опытный период животным инфузировали смесь бета-аланина и гистидина, при этом доза бета-аланина была уменьшена. Сочетание бета-аланина с гистидином обосновано тем, что эти две аминокислоты являются основой дипептида карнозина, выполняющего важную регуляторную роль, особенно в мышечной ткани, где и сосредоточено большее его количество (Страйер, 1985). Именно после расщепления этого дипептида освободившийся  $\beta$ -аланин поступает в клетки, в том числе и головного мозга. Гистидин является незаменимой аминокислотой и во многих случаях у молочных коров

бывает первой лимитирующей аминокислотой, недостаточный уровень которой в составе обменного протеина служит причиной снижения продуктивности и эффективности использования обменного протеина и энергии.

В результате инфузии в кишечник коров смеси бета-аланина и гистидина выделение белка с молоком увеличилось на 13,5% по сравнению с контрольным периодом, при этом содержание белка в молоке возросло на 10,9 отн.%. Близкие к этим величины по изменению синтеза белка в молочной железе наблюдались ранее в опытах нашей лаборатории при инфузии одного гистидина. По сравнению с периодом введения одного  $\beta$ -аланина у коров снизилось содержание мочевины в крови и выделение азота с мочой при одинаковом потреблении протеина с кормом, что позволяет сделать заключение о более эффективном использовании аминокислот обменного протеина на синтез белка. Повысилась и эффективность поглощения глюкозы молочной железой на 13,1 отн.%. Более высоким был уровень глюкозы в «общей» крови (+8,6 отн.%). Помимо участия гистидина в синтезе белка, в том числе белков молока в качестве структурной единицы, воздействие этой аминокислоты на процесс молокообразования могло осуществляться за счет регулирующих свойств этой аминокислоты или продуктов превращения гистидина, воздействующих, например, на кровоснабжение вымени, в чем есть определенные совпадения с регулируемыми свойствами  $\beta$ -аланина. Известны антиоксидантные свойства гистидина, влияние его на секрецию пищеварительных желез, индукцию выделения ряда гормонов и др. Для эффективного действия гистидина на выделение молочного белка у коров дополнительно вводилась глюкоза внутривенно (Kim, e.a., 2001). Вероятно, в наших опытах необходимое обеспечение глюкозой шло за счет стимуляции вводимым  $\beta$ -аланином глюконеогенеза из аминокислот. Результаты опыта подтверждают, что рекомендуемый уровень гистидина 2,4% в доступном белке для коров в разгар лактации должен быть повышен до 2,7%, хотя по данным некоторых авторов оптимальное содержание гистидина должно быть выше 3,4% (Hvelplung e.a., 2001; Rulguin, Pisulewsky, 2000). Таким образом, проведенные эксперименты на лактирующих коровах выявили определенное влияние бета-аминокислот и их сочетания с глутаматом и гистидином на интенсивность и направленность азотистого обмена в их организме и молочную продуктивность, что подчеркивает роль этих аминокислот как регуляторов обмена веществ в качестве нейромедиаторов и биологически активных метаболитов.

### **Заключение**

На коровах с канюлями двенадцатиперстной кишки изучали влияние инфузии в кишечник бета-аминокислот – таурина,  $\beta$ -аланина, их сочетания с глутаматом натрия и гистидином на молочную продуктивность, интенсивность и направленность азотистого обмена с целью выяснения роли этих аминокислот в регуляции обменных процессов в организме коров и уточнения норм обменного протеина. Установлено, что инфузия всех использованных аминокислот в кишечник коров в количестве 2,5% от уровня обменного протеина повышает выделение молочного белка в среднем на 5,9-6,7% по сравнению с контрольным периодом, а при сочетании бета-аланина с гистидином – на 13,7%. Более эффективное усвоение азота корма отмечено при введении смеси бета-аланина с гистидином. В эти же периоды наблюдалась повышенная ин-

тенсивность поглощения глюкозы молочной железой. Оптимальный уровень гистидина в доступном белке для коров в разгар лактации составляет не менее 2,7%.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Асатиани В.С. Новые методы биохимической фотометрии. М., 1965.
2. Кальницкий Б.Д., Харитонов Е.Л. К вопросу о нормировании аминокислотного питания молочного скота. Доклады РАСХН, 2004, 3: 24-27.
3. Маркова И.В. Шабалов Н.П. Клиническая фармакология новорожденных. С-Пб, 1993: 375 с.
4. Методы биохимического анализа (справочное пособие). (Под редакцией Кальницкого Б.Д.). Боровск, 1997.
5. Нефедов Л.И. Метаболизм таурина у млекопитающих. Весці АН Респ. Беларусь, сер. биол. наук, 1990, 5: 99-106.
6. Новая система оценки и нормирования протеинового питания коров. Боровск, 1999: 105 с.
7. Раевский К.С., Георгиев В.Н. Медиаторные аминокислоты. М., 1986: 240 с.
8. Страйер Л. Биохимия (под ред. Северина С.Е.). М: 1985, 2: 359 с.
9. Физиологические потребности в питательных веществах и нормирование питания молочных коров (справочное руководство), Боровск, 2001: 137 с.
10. Харитонов Л.В., Матвеев В.А., Великанов В.И. и др. Участие аминокислот в регуляции процессов питания и резистентности молодняка крупного рогатого скота. Материалы 3-й Международной конф. «Актуальные проблемы биологии в животноводстве», Боровск, 2006: 183-194.
11. Hvelplung T., Misciatelli L., Weisberg M.R. Supply of the dairy cows with amino acids from dietary protein. J. Anim. Feed Sci., 2001, 10: 69-85.
12. Kim C.H., Kim T.C., Chaung J.J., Chamberlain D.G. Effects of intravenous infusion of amino acids and glucose on the field and concentration of milk protein in dairy cows. J Dairy Res., 2001, 68, 1: 27-34.
13. Rulguin H., Pisulewsky P.M. Effects of duodenal infusion of graded amounts of His on mammary uptake and metabolism in dairy cows. J. Anim. Sci. 83: 1-164 (Abstr.)

#### ОБЕСПЕЧЕННОСТЬ МОЛОЧНЫХ КОРОВ АРГИНИНОМ В РАЗГАР ЛАКТАЦИИ

*Н.В. Штенцель*

*Инфузия в кишечник смеси аргинина с орнитином и аргинина с глутаматом натрия приводит к повышению в крови уровня большинства аминокислот за счет оптимизации их смеси в кишечнике и более эффективного всасывания, а так же мочевины и аминокислот орнитинового цикла. Введение указанных аминокислот вызывает снижение содержания глюкозы, при возрастании уровня энергозатрат на биосинтез белков молока и увеличения выделения белка в составе молока (4,3 % и 2,6% соответственно). Проведенные опыты показали, что потребность в обменном аргинине в разгар лактации*

*составляет 5,4% от уровня обменного протеина.*

### **Введение**

Для высокопродуктивных коров, наряду с белковым питанием, особую значимость приобретают вопросы аминокислотного питания. При одинаковом содержании в рационе протеина и его фракций, молочная продуктивность и эффективность использования доступного белка зависят от сбалансированности смеси аминокислот, поступающих в кровь. Решение вопросов оптимизации аминокислотного питания осуществляется за счет балансирования аминокислот во всасываемой смеси и снижения их использования на энергетические нужды.

Задачей наших исследований была проверка уровня обеспеченности молочных коров аргинином в разгар лактации и изучение особенностей метаболизма аминокислот в организме лактирующих коров при инфузии в кишечник смеси аргинина с орнитином и аргинина с глутаматом.

В разгар лактации у коров лимитирующей аминокислотой может быть полузаменимая аминокислота аргинин. Известно, что молочная железа поглощает аргинин из крови в количестве, превышающем в 2-2,5 раза её потребность для синтеза молочного белка, в составе которого эта аминокислота содержится в количестве около 4%. Установлено, что при этом часть аргинина идет на образование пролина, глутамата и других заменимых аминокислот. В свою очередь, пролин и глутаминовая кислота могут частично замещать аргинин, как фактор, повышающий скорость роста молодняка животных. Как активное звено цикла мочевинообразования, аргинин участвует в обезвреживании аммиака в организме животных, а также в ассимиляции повышенных количеств аминокислот, способствуя их эффективному использованию.

Одновременным введением аргинина и глутамата натрия мы стремились сократить нерациональное использование аргинина и других аминокислот в молочной железе. В медицинской литературе рассматривается действие "метаболического дуэта" - аргинина и орнитина для регулирования интенсивности метаболизма в организме человека (Минделл Э., 1997). Данное сочетание, кроме стимулирования образования белка, может приводить к экономии расхода аргинина по принципу обратной связи.

Указанные вопросы являются важными при установлении оптимального уровня обменного аргинина для молочных коров и создания условий эффективного его использования в их организме.

### **Материал и методы**

Опыты проведены в условиях вивария института на 6 коровах в разгар лактации методом групп-периодов. Подопытные животные были подготовлены хирургически путем выведения сонной артерии под кожу и наложения канюли на двенадцатиперстную кишку.

Сформировано 2 группы коров - контрольная и опытная, по 3 головы в группе. Эксперименты проводились в 3 периода: предварительный и 2 опытных. В опытные периоды на фоне основного рациона коровам опытной группы в продолжении 5 дней инфузирова́ли в кишечник через канюлю раствор аргинина в сочетании с орнитином или глутаматом в течение 12 часов в сутки. В

первый опытный период инфузирвали: аргинин 20 г, орнитин 5 г; во второй период - аргинин 20 г и глутамат натрия 40 г. Основной рацион состоял из 4,5 кг сена разнотравного, 15 кг силоса козлятничкового, 1,5 кг патоки и 9 кг комбикорма. Рацион был сбалансирован в соответствии с рекомендуемыми нормами ВНИИФБиП (Физиол. потребности..., 2001; Новая система..., 1999; Харитонов, 2004) и содержал обменной энергии 123,07 МДж, сырого протеина 1874 г, обменного протеина 1321 г и обменного аргинина 56,8 г. Уровень обменного аргинина в обменном протеине составлял у коров контрольной группы 4,3%, а в опытной с учетом инфузии – 5,4%. Во время опыта проводили учет молочной продуктивности и поедаемости кормов. На 5-й день каждого периода у животных брали кровь 2 раза в день из сонной артерии - до утреннего кормления (в 7 часов) и через 3 часа после него (в 11 час) с целью определения уровня азотистых метаболитов (свободные аминокислоты и мочевины) и глюкозы (Курилов и др. 1987; Методы биохим. анализа, 1997) (табл. 2). Статистическую обработку полученного материала проводили методом парных сравнений (Асатиани, 1965).

### Результаты и обсуждение

Инфузия в кишечник смеси аргинина с орнитином и смеси аргинина с глутаматом натрия не отразилась достоверно на величине суточного удоя. В первый опытный период было зарегистрировано повышение количества белка, выделенного в составе молока, на 4,3 %. Во второй опытный период увеличение продукции молочного белка у коров составило 2,6 % (табл.1).

*Таблица 1. Выделение белка с молоком (г/сут)*

| Группы животных | Периоды опыта   |             |             |
|-----------------|-----------------|-------------|-------------|
|                 | предварительный | 1-й опытный | 2-й опытный |
| Контрольная     | 686             | 705         | 680         |
| Опытная         | 701             | 735         | 698         |
| Разница, %      | +2,2            | +4,30       | +2,6        |

Изменение выделения белка молока связано с оптимизацией соотношения и количества аминокислот в кишечнике и повышением эффективности использования других аминокислот и глюкозы на биосинтетические процессы, а также с воздействием аргинина и его производных на обмен аминокислот и кровоснабжение молочной железы.

Следует учесть, что сама процедура инфузии снижает удой коров на 3-5%. В конце первого опытного периода уровень свободных аминокислот в крови повысился на 5,9%. Концентрация большинства аминокислот в артериальной крови повысилась, но при этом доля глутамата, глутамина и аспартата уменьшилась, что связано с увеличением их использования в глюконеогенезе и на молокообразование (табл. 2). Отмечено повышение концентрации мочевины в артериальной крови, обусловленное, вероятно, активацией орнитинового цикла, так как нагрузка инфузией аргинина до рекомендуемой суточной нормы проводилась согласно методике в течение 12 часов, что привело к некоторому избытку как этой аминокислоты, так и аминокислот, вследствие увеличения напряженности биосинтеза молочных белков. При этом закономерно

было предполагать незначительное снижение эффективности использования аминокислот на продукцию белка. Наблюдалось некоторое уменьшение уровня глюкозы, обусловленное, с одной стороны, возросшей потребностью молочной железы в ней как в энергетическом субстрате, а с другой, – как в предшественнике лактозы (табл. 3, 4).

При инфузии раствора аргинина в сочетании с глутаматом натрия как и в предыдущий период наблюдалось повышение уровня свободных аминокислот в крови коров на 6,2%, что привело к увеличению их использования в глюконеогенезе и на молокообразование. Отмечено увеличение относительно содержания аспартата, глутамата, глутамина и лизина, а также аргинина и его производных (цитруллина и орнитина) при некотором снижении доли изолейцина, лейцина, валина, фенилаланина и гистидина, по сравнению с предварительным периодом (табл. 2). Нарастание уровня мочевины, как и снижение концентрации глюкозы в крови по отношению к предварительному периоду, было сходным с предыдущим опытным периодом (табл. 3, 4).

В то же время отмечены некоторые отличия в параметрах этих изменений при сравнении опытных периодов между собой, связанные с сопутствующими аргинину инфузируемыми аминокислотами (орнитином и глутаматом натрия).

Таблица 2. Концентрация свободных аминокислот крови коров

| Аминокислоты          | Предварительный период |       |                |       | 1-й период опыта   |       |                |       | 2-й период опыта   |       |                |       |
|-----------------------|------------------------|-------|----------------|-------|--------------------|-------|----------------|-------|--------------------|-------|----------------|-------|
|                       | контрольная группа     |       | опытная группа |       | контрольная группа |       | опытная группа |       | контрольная группа |       | опытная группа |       |
|                       | мг%                    | %     | мг%            | %     | мг%                | %     | мг%            | %     | мг%                | %     | мг%            | %     |
| Аспарагиновая кислота | 0,83                   | 5,00  | 0,81           | 5,00  | 0,89               | 5,73  | 0,85           | 5,17  | 0,8                | 4,98  | 0,95           | 5,56  |
| Треонин               | 0,81                   | 4,88  | 0,88           | 5,43  | 0,77               | 4,95  | 0,83           | 5,05  | 0,88               | 5,47  | 0,89           | 5,21  |
| Серин                 | 0,68                   | 4,10  | 0,74           | 4,57  | 0,62               | 3,99  | 0,66           | 4,01  | 0,64               | 3,98  | 0,73           | 4,27  |
| Глутаминовая кислота  | 1,46                   | 8,80  | 1,27           | 7,84  | 1,32               | 8,49  | 1,23           | 7,48  | 1,45               | 9,02  | 1,76           | 10,30 |
| Глутамин              | 1,54                   | 9,28  | 1,43           | 8,83  | 1,41               | 9,07  | 1,32           | 8,02  | 1,52               | 9,45  | 1,78           | 10,42 |
| Глицин                | 2,11                   | 12,71 | 1,93           | 11,91 | 1,74               | 11,20 | 1,83           | 11,12 | 1,88               | 11,69 | 1,86           | 10,89 |
| Аланин                | 1,06                   | 6,39  | 1,14           | 7,04  | 0,78               | 5,02  | 0,81           | 4,92  | 0,93               | 5,78  | 0,75           | 4,39  |
| Цитруллин             | 0,86                   | 5,18  | 0,97           | 5,99  | 0,7                | 4,50  | 0,89           | 5,41  | 0,81               | 5,04  | 0,97           | 5,68  |
| Валин                 | 1,74                   | 10,48 | 1,55           | 9,57  | 1,52               | 9,78  | 1,72           | 10,46 | 1,42               | 8,83  | 1,47           | 8,61  |
| Метионин              | 0,25                   | 1,51  | 0,27           | 1,67  | 0,28               | 1,80  | 0,31           | 1,88  | 0,27               | 1,68  | 0,28           | 1,64  |
| Изолейцин             | 0,82                   | 4,94  | 0,85           | 5,25  | 0,81               | 5,21  | 0,86           | 5,23  | 0,82               | 5,10  | 0,73           | 4,27  |
| Лейцин                | 0,94                   | 5,66  | 1,03           | 6,36  | 0,92               | 5,92  | 1,03           | 6,26  | 1,1                | 6,84  | 0,97           | 5,68  |
| Тирозин               | 0,45                   | 2,71  | 0,41           | 2,53  | 0,51               | 3,28  | 0,55           | 3,34  | 0,46               | 2,86  | 0,52           | 3,04  |
| Фенилаланин           | 0,76                   | 4,58  | 0,45           | 2,78  | 0,45               | 2,90  | 0,51           | 3,10  | 0,57               | 3,54  | 0,49           | 2,87  |
| Орнитин               | 0,39                   | 2,35  | 0,49           | 3,02  | 0,55               | 3,54  | 0,68           | 4,13  | 0,49               | 3,05  | 0,66           | 3,86  |
| Лизин                 | 0,58                   | 3,49  | 0,67           | 4,14  | 0,78               | 5,02  | 0,8            | 4,86  | 0,63               | 3,92  | 0,75           | 4,39  |
| Гистидин              | 0,72                   | 4,34  | 0,69           | 4,26  | 0,82               | 5,28  | 0,75           | 4,56  | 0,77               | 4,79  | 0,73           | 4,27  |
| Аргинин               | 0,6                    | 3,61  | 0,62           | 3,83  | 0,67               | 4,31  | 0,82           | 4,98  | 0,64               | 3,98  | 0,79           | 4,63  |
| Сумма аминокислот     | 16,6                   | 100   | 16,2           | 100   | 15,54              | 100   | 16,45          | 100   | 16,08              | 100   | 17,08          | 100   |

Так, некоторое увеличение относительной разницы содержания мочевины в крови коров во второй опытный период, по сравнению с первым, можно объяснить продолжением лактации. Снижение концентрации глюкозы в 11 ч в первый опытный период было более выраженным, чем во второй (8 и -3,2% соответственно).

*Таблица 3. Концентрация мочевины в крови коров (мг %)*

| Группа коров | Периоды опыта   |        |             |        |             |        |
|--------------|-----------------|--------|-------------|--------|-------------|--------|
|              | предварительный |        | 1-й опытный |        | 2-й опытный |        |
|              | 7 час           | 11 час | 7 час       | 11 час | 7 час       | 11 час |
| Контрольная  | 19,8            | 25,2   | 20,9        | 27,6   | 27,2        | 32,7   |
| Опытная      | 23,2            | 27,1   | 21,7        | 30,2   | 28,5        | 35,8   |
| Разница, %   | +17,2           | +7,5   | +3,8        | +9,4   | +4,8        | +9,5   |

*Таблица 4. Концентрация глюкозы в крови коров (мг %)*

| Группа коров | Периоды опыта   |        |             |        |             |        |
|--------------|-----------------|--------|-------------|--------|-------------|--------|
|              | предварительный |        | 1-й опытный |        | 2-й опытный |        |
|              | 7 час           | 11 час | 7 час       | 11 час | 7 час       | 11 час |
| Контрольная  | 36,0            | 35,8   | 36,3        | 37,5   | 37,8        | 43,2   |
| Опытная      | 34,5            | 37,3   | 37,7        | 34,5   | 40,6        | 41,8   |
| Разница, %   | -4,2            | +4,2   | +39         | -8     | +7,4        | -3,2   |

### Заключение

При инфузии аргинина в сочетании с орнитином отмечалось некоторое увеличение уровня выделенного белка в составе молока (+4,3 %) по сравнению с контролем. При введении аргинина в комбинации с глутаматом различия в количестве выделенного молочного белка у подопытных групп сократились. Инфузия аргинина в кишечник в сочетании с орнитином или с глутаматом натрия приводит к повышению в крови уровня большинства аминокислот за счет оптимизации смеси аминокислот в кишечнике и более эффективно их всасывания и к снижению содержания глюкозы при возрастании уровня энергозатрат на биосинтез белков молока. При этом наблюдалась повышенная концентрация мочевины и аминокислот орнитинового цикла.

Проведенные опыты показали, что потребность в обменном аргинине в разгар лактации составляет 5,4% от уровня обменного протеина.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Асатиани В.С. Новые методы биохимической фотометрии. М, 1965.
2. Курилов Н.В и др. Изучение пищеварения у жвачных. Методические указания. Боровск, 1987.
3. Кальницкий Б.Д., Харитонов Е.Л. К вопросу о нормировании аминокислотного питания молочного скота. Доклады РАСХН, 2004, 3: 24 – 27.
4. Методы биохимического анализа (справочное пособие). Под редакцией Кальницкого Б. Д. Боровск, 1997.
5. Минделл Э. Справочник по витаминам и минеральным веществам. Изд-во «Медицина и питание», 1997.
6. Новая система оценки и нормирования протеинового питания коров. Боровск, ВНИИФБиП, 1999: 105 с.
7. Физиологические потребности в питательных веществах и нормирование питания молочных коров (справочное пособие). Боровск, ВНИИФБиП, 2001: 136 с.

## **ОБЕСПЕЧЕННОСТЬ ОРГАНИЗМА СВИНЕЙ ВИТАМИНАМИ А,Е,В<sub>1</sub> И В<sub>2</sub> ПРИ СКАРМЛИВАНИИ ИМ НИЗКОПРОТЕИНОВЫХ РАЦИОНОВ, СБАЛАНСИРОВАННЫХ ЗА СЧЕТ ДОБАВОК СИНТЕТИЧЕСКИХ АМИНОКИСЛОТ**

*В.И. Дудин, Т.Е.Рябых*

Лаборатория БАВ и сертификации кормов

*В опыте на трех группах поросят испытывали комбикорма с низким фоном протеина, улучшенного путем добавок синтетических аминокислот или добавок соевого шрота. У поросят, получавших добавки соевого шрота, увеличивалось тотальное содержание витаминов А и Е в мышечной ткани. Применение отработанного нами ранее теста контроля обеспеченности витамином В<sub>1</sub> показало, что поросята, получавшие основной рацион, имели достоверно более низкий уровень тиамина в крови и существенно более высокое отношение пирувата к тиамину в цельной крови и моче, что указывает на недостаточную обеспеченность этих поросят тиамином. При улучшении белкового питания обеспеченность витаминами повышается.*

## **Введение**

Необходимость изучения обеспеченности свиней водорастворимыми и жирорастворимыми витаминами диктуется вариациями в белковом питании, направленными на поиск оптимальных уровней снабжения рационов протеином на основе модели идеального белка, когда за основу рациона берутся низкопротеиновые корма с окончательной балансировкой белковой части за счет синтетических аминокислот. Ввиду того, что водорастворимые и жирорастворимые витамины участвуют в метаболизме на его важнейших участках, обеспечение оптимальных условий витаминного питания очень важно для поддержания обменных процессов в норме. В отчетный период мы продолжили разработку обоснования для теста на тиамин и вели контроль обеспеченности поросят рибофлавином и витаминами А и Е.

## **Материал и методы**

В соответствии с задачами исследований эксперимент вели в условиях вивария института на помесных поросятах. С учетом парных аналогов сформировали 3 группы поросят по 10 голов в каждой. Содержание групповое, клеточное, поение из автопоилок. Опыт продолжали до достижения поросятами живой массы 40 кг в 105-суточном возрасте. Животные 1 группы (контроль) получали ОР (ячмень лущеный – 50%, пшеница – 40%, соевый шрот – 5%, жир – 2%, минерально-витаминная смесь – 3%) с содержанием сырого протеина 11-12% без балансировки синтетическими аминокислотами. Поросятам 2-й группы в ОР добавляли до нормы синтетические треонин, лизин, триптофан, метионин, лейцин, валин, изолейцин. Поросятам 3-й группы содержание сырого протеина доводили до 17% за счет дополнительного введения соевого шрота. Содержание лимитирующих аминокислот в комбикормах соответствовало общепринятым нормам (Калашников и др., 2003).

В возрасте 130 суток проводили убой животных по 4 головы из каждой группы. Витамины А и Е определяли в крови (Скурихин и Двинская, 1989), в кормах, печени (Скурихин и Шабаетов, 1996). Витамин В<sub>1</sub> определяли в цельной крови, корме и моче. Для апробации теста обеспеченности свиней витамином В<sub>1</sub> дополнительно определяли пировиноградную кислоту в плазме и моче по соответствующим прописям (Петрунькина, 1961; Островский, 1979). В соответствии с этими источниками вели контроль обеспеченности рибофлавином.

В работе использовали ВЭЖ хроматографы «Милихром» (ПО «Научприбор», г. Орел) с УФ-спектрофотометрическим детектором с диапазоном

190-360 нм. Хроматографические колонки из стали, размером 120 x 2 мм, заполняли силасорбом-600 с диаметром частиц 6,0 мкм.

### Результаты и обсуждение

Анализ витаминного состава рациона позволяет считать его адекватным физиологическим потребностям в них (табл.1). Различия между группами выглядят явно незначительными.

*Таблица 1. Содержание витаминов в комбикорме*

| Группы | Тиамин,<br>мг/кг | Рибофлавин,<br>мг/кг | $\alpha$ -Токоферол,<br>мг/кг | Ретинол,<br>МЕ/кг |
|--------|------------------|----------------------|-------------------------------|-------------------|
| 1      | 1,96             | 8,1                  | 39,61                         | 17050             |
| 2      | 1,96             | 8,5                  | 41,25                         | 16780             |
| 3      | 2,11             | 9,4                  | 39,60                         | 17600             |

При этом весьма небольшими были различия в концентрации витаминов А и Е в плазме крови (табл. 2). Это можно объяснить отсутствием серьезного белкового дефицита между группами поросят.

*Таблица 2. Концентрация витаминов А и Е в плазме крови поросят в связи с разработкой способа использования в кормлении низкопротеиновых кормов*

| Группы | $\alpha$ -Токоферол, мкг/мл | Ретинол, МЕ/мл    |
|--------|-----------------------------|-------------------|
| 1      | 3,66 $\pm$ 0,078            | 0,415 $\pm$ 0,013 |
| 2      | 3,58 $\pm$ 0,039            | 0,412 $\pm$ 0,011 |
| 3      | 3,62 $\pm$ 0,114            | 0,410 $\pm$ 0,011 |

Помимо плазмы крови, мы исследовали на содержание витаминов А и Е целый ряд тканей (табл. 3). Различия в печени были, особенно в отношении тотального содержания витаминов, однако эти изменения оказались статистически недостоверными.

**Таблица 3. Содержание витаминов А и Е в тканях поросят в связи с разработкой способа использования в кормлении низкопротеиновых кормов**

| Группы                | α-Токоферол, мг/кг |             | Ретинол, МЕ/кг |              |
|-----------------------|--------------------|-------------|----------------|--------------|
|                       | Мкг/г              | Мг/ткань    | Мкг/г          | Мг/ткань     |
| <i>Печень</i>         |                    |             |                |              |
| 1                     | 17,91±0,376        | 14,34±0,607 | 290,01±9,76    | 231,73±4,66  |
| 2                     | 17,72±0,369        | 16,80±1,01  | 264,75±15,93   | 250,47±15,35 |
| 3                     | 16,19±1,12         | 16,79±1,02  | 289,57±10,3    | 303,98±33,76 |
| <i>Жировая ткань</i>  |                    |             |                |              |
| 1                     | 2,15±0,136         | 11,05±0,763 | 0,276±0,015    | 1,40±0,051   |
| 2                     | 2,08±0,090         | 10,41±0,959 | 0,278±0,003    | 1,38±0,070   |
| 3                     | 2,06±0,155         | 10,38±0,666 | 0,275±0,004    | 1,40±0,097   |
| <i>Мышечная ткань</i> |                    |             |                |              |
| 1                     | 1,14±0,017         | 15,27±0,926 | 0,072±0,002    | 0,961±0,034  |
| 2                     | 1,08±0,048         | 22,11±2,62  | 0,070±0,005    | 1,47±0,272   |
| 3                     | 1,11±0,055         | 21,82±1,42* | 0,074±0,003    | 1,46±0,112*  |

Примечание: \*P<0,02

Еще меньшие различия отмечались в отношении жировой ткани. Лишь в мышечной ткани мы обнаружили достоверное увеличение тотального содержания α-токоферола и ретинола у поросят, получавших комбикорм с повышенным уровнем соевого протеина.

Более контрастные изменения мы отметили для тиамин и рибофлавина, т.е. для витаминов, очень чувствительных к белковому питанию животных. Для тиамин был воспроизведен отработанный нами тест контроля обеспеченности поросят этим витамином (отношение концентраций пирувата и свободного тиамин). При этом были обнаружены достоверные различия между группами 1 и 3 по концентрации свободного тиамин и тестового отношения, что позволяет заключить, что в отношении тиаминового питания гораздо лучше скармливать рационы с более высоким, чем в контроле, уровнем протеина (рационы групп 2 и 3).

Направленность изменений в концентрации в цельной крови рибофлавина совпадает с таковой тиамин, но различия оказались недостоверными из-за больших разбросов индивидуальных значений (табл. 4). В целом необходимо отметить очень высокое отношение пирувата к тиамину во всех группах,

что позволяет характеризовать ситуацию в отношении тиаминового питания как не совсем благоприятную.

**Таблица 4. Концентрация пирувата, тиамин и рибофлавина в цельной крови поросят в связи с разработкой способа использования в кормлении низкопротеиновых кормов**

| Группы | Пируват цельной крови, мкг/мл | Тиамин цельной крови, мкг/г | Пируват / тиамин | Рибофлавин цельной крови, мкг/г |
|--------|-------------------------------|-----------------------------|------------------|---------------------------------|
| 1      | 25,98±0,93                    | 0,117±0,003                 | 222,44±11,84     | 0,192±0,008                     |
| 2      | 25,60±0,55                    | 0,121±0,008                 | 214,08±18,32     | 0,232±0,027                     |
| 3      | 24,59±0,38                    | 0,131±0,002*                | 188,22±2,67*     | 0,230±0,013                     |

Примечание: \*  $P_{3 \text{ vs } 1} = 0,0093$  и  $0,0479$

Это подтверждают данные по результатам анализа мочи (табл. 5). Здесь также наблюдалось достоверно повышенное отношение пирувата к тиамину у поросят контрольной группы. Наконец (табл. 6) исследование окисления тиамин в тиохром в желудочно-кишечном тракте выявило статистически достоверно более высокое образование тиохрома в желудочно-кишечном тракте у поросят контрольной группы и это не могло являться следствием действия бактериальных тиаминаз, ибо там образуются другие продукты. Однако речь все же может идти о каком-то ином проявлении микробиального действия, вызванного пониженным уровнем протеина в рационе. От групп с лучшим обеспечением протеином состав микроорганизмов желудочно-кишечного тракта контрольных поросят мог отличаться.

**Таблица 5. Выделение тиамин и пируват с мочой поросят в связи с разработкой способа использования в кормлении низкопротеиновых кормов**

| Группы | Пируват мочи, мкг/мл | Тиамин мочи, мкг/г | Пируват / тиамин |
|--------|----------------------|--------------------|------------------|
| 1      | 5,63±0,54            | 0,189±0,029        | 30,72±4,07       |
| 2      | 4,84±0,65            | 0,309±0,047        | 17,57±4,75       |
| 3      | 4,64±0,39            | 0,276±0,032        | 17,16±2,11*      |

Примечание: \* $P = 0,0417$

*Таблица 6. Окисление тиамина в тиохром в желудочно-кишечном тракте поросят в связи с разработкой способа использования в кормлении низкопротеиновых кормов*

| Группы | Тиамин кала, мкг/г<br>Нативное вещество | Тиохром кала, мкг/г<br>Нативное вещество | Тиохром кала / тиа-<br>мин кала, % |
|--------|-----------------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------|
| 1      | 300,47±25,6                             | 42,53±2,56                               | 14,5±2,12                          |
| 2      | 347,17±22,39                            | 28,96±1,67                               | 8,7±0,72*                          |
| 3      | 327,53±32,56                            | 25,13±0,96                               | 7,87±1,08                          |

Примечание: \*P=0,0381

### **Заключение**

При испытании комбикормов с низким фоном протеина, улучшенного путем добавок синтетических аминокислот или добавок соевого шрота, обнаружено увеличение тотального содержания витаминов А и Е в мышечной ткани у поросят, получавших добавки соевого шрота. Во всех остальных случаях изменения в содержании этих витаминов были незначительными. Применение отработанного нами ранее теста контроля обеспеченности витамином В<sub>1</sub>, основанного на измерении отношения концентраций пирувата и свободного тиамина в цельной крови, показало, что поросята, получавшие контрольный рацион, имели достоверно более низкий уровень тиамина в крови и существенно более высокое отношение пирувата к тиамину в цельной крови и моче. Помимо этого у контрольных поросят в желудочно-кишечном тракте было повышено окисление тиамина в тиохром. Добавки синтетических аминокислот приводили к более высокому разбросу индивидуальных значений показателей, в связи с чем практически при равных значениях с группой, получавшей дополнительные добавки соевого шрота, достоверные различия обнаруживались именно с поросятами группы с повышенным уровнем соевого шрота. В целом, проработка концепции нормирования питания свиней на принципах идеального протеина, с балансировкой аминокислотного состава рациона за счет синтетических их препаратов, требует обязательного тестирования обеспеченности животных витаминами, особенно тиамином.

### **ЛИТЕРАТУРА**

1. Калашников А.П. Нормы и рационы кормления с.-х. животных. Москва. 2003: 455с.

2. Петрунькина А.И. Практическая биохимия. Л: Медгиз, 1961.
3. Скурихин В.Н., Двинская Л.М. Определение альфа-токоферола и ретинола в плазме крови сельскохозяйственных животных методом ВЭЖХ. Сельскохозяйственная биология, 1989, 4: 127-129.
4. Скурихин В.Н., Шабаетов С.В. Методы анализа витаминов А, Е, Д и каротина в кормах, биологических объектах и продуктах животноводства. М: Химия, 1996.
5. Островский Ю.М., Коновалова Л.В. Фолатин. Сб. Экспериментальная витаминология, 1979: 345-384.

## ВНЕШНЕСЕКРЕТОРНЫЕ ФУНКЦИИ ПЕЧЕНИ И ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И СПЕРМОПРОДУКЦИЯ У БЫКОВ- ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ КОРМЛЕНИЯ

А.А. Алиев, З.М. Алиева  
Лаборатория межуточного обмена

*На быках-производителях с внешними анастомозами протоков желчи и поджелудочного сока испытано пять рационов с различными уровнями протеина и соотношениями протеина и энергии, а также с добавлением соапстока и куколок шелкопряда. На всех рационах выявлены координированные соотношения секреции желчи, поджелудочного сока и спермопродукции. Наивысший эффект по всем исследуемым процессам получен при добавлении к рациону соапстока, особенно в сочетании его с куколками шелкопряда.*

### Введение

Особенности пищеварения и различные аспекты обмена веществ у быков-производителей в достаточной мере не исследованы, что, несомненно, сдерживает разработку систем их рационального питания, следовательно, и эксплуатации. Вполне можно согласиться с А.П.Калашниковым (1978) в том, что кормление быков-производителей - наименее разработанный раздел зоотехнической науки. Особенно недостаточно изучена проблема их липидного питания. В практике станций искусственного осеменения основное внимание уделяется нормированию протеинового питания, в частности, применяется повышенный уровень протеина в рационах быков-производителей в предслуч-

ной и случной периоды, а что касается уровня липидов, то, как правило, считают достаточным содержание сырого жира на уровне 4% от сухого вещества рациона. В наших исследованиях, проведенных на крупном рогатом скоте и буйволицах, было выявлено благоприятное действие скармливания соапстока и куколок шелкопряда на внешнесекреторные функции печени и поджелудочной железы (Алиев, Кафаров, 1971; Алиев, Искендеров, Мирзоев, 1976).

Задачей настоящего исследования было изучение влияния различного уровня протеина в сочетании со скармливанием соапстока и куколок шелкопряда на внешнесекреторные функции печени, поджелудочной железы, а также на качество спермопродукции у быков-производителей.

### **Материал и методы**

Были прооперированы 4 быка в возрасте 3 лет с наложением внешних анастомозов на протоки желчи и поджелудочного сока (Алиев, 1998), на которых были испытаны 5 рационов:

I – типовой (контрольный), рекомендуемый для быков-производителей по нормам ВИЖа. В нем на 1 кормовую единицу (к.е.) приходилось 114 г переваримого протеина; II – опытный – на 1 к.е. приходилось 96 г переваримого протеина, что на 15% ниже, чем в контрольном рационе; III – опытный – на 1 к.е. 134 г переваримого протеина, что на 15% больше, чем в контрольном; IV – опытный - к составу III рациона добавляли соапсток, увеличивая таким образом уровень сырого жира в сухом веществе рациона на 15%; V – опытный - к составу IV рациона добавляли, наряду с соапстоком, еще куколки шелкопряда.

Куколки шелкопряда получали из опытного хозяйства Азербайджанского НИИ шелководства и включали их в рацион в смеси с комбикормом, применяя их как комплекс биологически активных веществ. Рационы с соапстоком, а также с куколками шелкопряда быки съедали охотно.

Опыты в виварии института на быках-производителях проводили по системе латинского квадрата в пяти периодах. Продолжительность каждого периода - 30 дней. Количество желчи и поджелудочного сока учитывали по 8 часов в течение трех суток по скользящему графику с охватом всех часов суток. Для анализа брали 5% от суточного объема желчи и поджелудочного сока. Измерение их и возврат в двенадцатиперстную кишку проводили ежечасно. В желчи и поджелудочном соке определяли сухое вещество, формы азота (общий, белковый и остаточный), амилалитическую и липолитическую активности, а в соке – еще и протеолитическую активность.

Сперму брали от каждого быка через 15, 20 и 30 дней от начала опыта общепринятым способом. В эякулятах определяли объем, густоту, подвижность и жизнеспособность (живучесть) сперматозоидов.

### Результаты обсуждения

*Внешнесекреторная функция печени.* Среднесуточная секреция желчи у подопытных быков-производителей колебалась в пределах 581,5-757,2 мл. При этом максимальный уровень наблюдался при скормлинии V рациона, а минимальный - III рациона с высоким уровнем протеина. В связи с характером рациона также изменялась и ферментативная активность желчи, выраженная в ферментных единицах/24 час (ф.ед/24 час). Амилолитическая активность желчи составляла от 59 до 89 ф.ед/час. Минимальная амилолитическая активность также наблюдалась на III-ем рационе, а максимальная - на V-м. Липолитическая активность колебалась от 542 до 794 ф.ед./час. По интенсивности секреции желчи, а также ее ферментативной активности оптимальную позицию занимал рацион, который отличался от контрольного по содержанию как соапстока, так и куколок шелкопряда.

Избыток протеина в рационе угнетал уровень секреции желчи и ее ферментативную активность, а добавление к такому рациону соапстока способствовало повышению этих показателей (табл.1).

Суточный уровень печеночно-кишечного транспорта сухого вещества и форм азота в составе желчи представлен в табл. 2. Снижение уровня протеина в рационе на 15% без снижения уровня кормовых единиц сопровождалось усилением печеночно-кишечного транспорта как сухого вещества, так и его азотистых компонентов, а избыток протеина, наоборот, ослаблял его.

**Таблица 1. Суточный уровень секреции желчи и ее ферментативная активность**

| Периоды<br>(рационы) | Объем желчи<br>(мл/24 час) | Активность желчи, ф.ед/24 час |                |
|----------------------|----------------------------|-------------------------------|----------------|
|                      |                            | амилолитическая               | липолитическая |
| I                    | 15062±109                  | 1464±12                       | 14736±39       |
| II                   | 15700±98                   | 1632±10                       | 15912±41       |
| III                  | 13957±136                  | 1416±8                        | 13008±23       |
| IV                   | 16579±183                  | 1752±15                       | 17112±52       |
| V                    | 18173±171                  | 2136±17                       | 19056±81       |

Таблица 2. Печеночно-кишечный транспорт сухого вещества и форм азота в составе желчи (г/24 час)

| Периоды<br>(рационы) | Сухое вещество | Азот     |          |            |
|----------------------|----------------|----------|----------|------------|
|                      |                | общий    | белковый | остаточный |
| I                    | 386,49±6,5     | 20,2±0,3 | 16,6±0,4 | 3,6±0,3    |
| II                   | 417,84±4,4     | 26,3±1,0 | 19,2±1,0 | 7,1±0,3    |
| III                  | 321,21±7,4     | 14,8±0,5 | 12,1±0,5 | 2,7±0,3    |
| IV                   | 525,20±17      | 34,2±1,1 | 24,5±0,3 | 9,7±0,6    |
| V                    | 511,89±8,3     | 30,2±0,7 | 21,6±0,6 | 8,6±0,6    |

Увеличение уровня протеина и энергии в рационе при добавлении в него соапстока усиливало печеночно-кишечный транспорт как сухого вещества, так и его азотистых компонентов, особенно белкового азота. Добавление к данному рациону, наряду с соапстоком, еще и куколок шелкопряда положительно отражалось на указанных показателях печеночно-кишечно транспорта.

*Внешнесекреторная функция поджелудочной железы.* Из наших предыдущих исследований, выполненных на молодняке крупного рогатого скота и на коровах, было показано, что секреторные функции печени и поджелудочной железы строго взаимосвязаны между собой. На 1 мл сока поджелудочной железы выбрасывает в дуодениум 3-3,7 мл желчи (Алиева, 1974; Алиев, Бахрамова, 1977 и др.). В данных экспериментах, выполненных на быках-производителях, соотношение суточного объема секретируемых сока и желчи выражалось как 3,5:1. Влияние рациона на это соотношение в ту и другую сторону происходило параллельно как по отношению к секреторной функции печени, так и поджелудочной железе. Например, на I рационе секреция желчи равнялась 15062 мл/сутки, а секреция поджелудочного сока – 4538 мл/сутки. Соотношение их равнялось 3,3:1. Или на V рационе секретировалось желчи 18173 мл/сутки, сока – 5419 мл/сутки, а соотношение их равнялось 3,4:1 и т.д.

Низкий уровень секреции сока наблюдался на рационе с избытком протеина, а высокий – с куколками шелкопряда (табл. 3). Протеолитическая активность сока колебалась от 338,4 тыс.ф.ед/24 часа до 542,4 тыс.ф.ед/24 часа. Минимальная протеолитическая активность наблюдалась при содержании животных на III рационе, а максимальная на V. Избыток протеина в рационе угнетал протеолитическую активность сока.

Если увеличение уровня протеина в рационе сопровождалось и увеличением энергии (в данном случае за счет соапстока), то происходило усиление протеолитической активности панкреатического сока.

*Таблица 3. Суточная секреция сока поджелудочной железы и его ферментативная активность*

| Периоды<br>(рационы) | Объем<br>мл/24 часа | Активность, тыс.ф.ед./24 час. |                 |                  |
|----------------------|---------------------|-------------------------------|-----------------|------------------|
|                      |                     | липолитическая                | амилолитическая | протеолитическая |
| I                    | 4538±54             | 2192,2±15,2                   | 804,0±6,4       | 338,4±3,2        |
| II                   | 5032±79             | 2643,0±18,4                   | 931,2±5,7       | 391,2±3,8        |
| III                  | 3969±11,7           | 1622,4±11,7                   | 722,4±3,5       | 273,6±2,1        |
| IV                   | 5257±42             | 3088,8±20,3                   | 1084,8±6,3      | 475,2±4,3        |
| V                    | 5419,67             | 3564,0±17,6                   | 1005,6±8,2      | 542,4±3,7        |

Примечание: Различия были достоверны во всех приведенных в таблицах сравнениях.

В зависимости от скармливаемого рациона существенно изменялась также липолитическая активность поджелудочного сока. Различие между минимальной липолитической активностью, определяемой в период содержания быков на III рационе с избытком протеина и максимальной активностью, наблюдаемой на V рационе, отличавшимся от III рациона содержанием куколок шелкопряда, составляло 220%. В период скармливания IV рациона, содержащего soapсток, по сравнению с III рационом, липолитическая активность сока возрастала в 2 раза, хотя и не достигала уровня V рациона.

Изменения амилолитической активности поджелудочного сока в принципе повторяли ту же закономерность, которая была описана по отношению к липолитической активности.

*Поджелудочно-кишечный транспорт сухого вещества и его азотистых компонентов.* Концентрация сухого вещества в поджелудочном соке колебалась от 1,49 (III рацион) до 2,16% (V рацион). По данному показателю V рацион с куколками шелкопряда уступал рациону с высоким уровнем как протеина, так и энергии (табл. 4). Величина суточного панкрео-интестинального транспорта сухого вещества рационов между собой колебалась в значительных пределах, составляя от 59,5 г/24 часа (III рацион) до 106,7 г/24 часа (V рацион). Наряду с уровнем секреции снижение уровня протеина в рационе стимулировало и панкрео-интестинальный транспорт сухого вещества. Избыток протеина, наоборот, угнетал эти процессы, а избыток протеина+soapсток их восстанавливал.

*Таблица 4. Суточное количество сухого вещества, общего, белкового и остаточного азота, транспортируемого в составе сока поджелудочной железы в дуоденум, г/24 часа*

| Периоды<br>(рационы) | Сухое<br>вещество | Азот      |          |            | Соотношение<br>белкового и<br>небелкового<br>азота |
|----------------------|-------------------|-----------|----------|------------|----------------------------------------------------|
|                      |                   | общий     | белковый | небелковый |                                                    |
| I                    | 77,14±3,7         | 6,04±0,3  | 4,67±0,2 | 1,37±0,2   | 3,41:1                                             |
| II                   | 90,51±3,1         | 7,78±0,5  | 5,21±0,3 | 2,57±0,3   | 2,03:1                                             |
| III                  | 59,53±2,7         | 4,51±0,2  | 3,66±0,3 | 0,85±0,02  | 4,30:1                                             |
| IV                   | 92,36±3,8         | 9,48±0,5  | 7,46±0,5 | 2,03±0,3   | 3,67:1                                             |
| V                    | 106,70±3,8        | 11,31±0,6 | 8,81±0,5 | 2,50±0,3   | 3,52:1                                             |

По панкрео-интестинальному транспорту общего азота различие между III и V рационами в пользу V-го составляло около 300%. Панкрео-интестинальный транспорт азота был наиболее высоким при скормливании V рациона.

По белковому азоту минимальная величина панкрео-интестинального транспорта отмечена при скормливании III рациона, максимальная – V-го. В период скормливания II рациона по сравнению с I панкрео-интестинальный транспорт белкового азота вырос на 11%, а небелкового – на 87,9%. Скормливание III рациона сопровождалось уменьшением панкрео-интестинального транспорта обеих форм азота, в то время как скормливание IV рациона увеличивало его по белковому азоту на 59,7 %, по небелковому – на 48,2 %.

В поджелудочном соке нами впервые было обнаружено и наличие свободных аминокислот (САК), концентрация которых колебалась от 40 до 79 мг/100мл, а средняя величина - от 173 до 422 г. Концентрация САК в поджелудочном соке в период содержания животных на I, II, III рационах между собой практически не отличалась. Максимальной она была на V рационе (табл. 5).

Основную массу САК поджелудочного сока составляют заменимые аминокислоты, меньшую – незаменимые. Относительно большое количество незаменимых аминокислот отмечено на V рационе.

**Таблица 5. Суточная концентрация и суточное количество свободных аминокислот в поджелудочном соке**

| Периоды<br>(рационы) | Аминокислоты                |                            |             |           |      |
|----------------------|-----------------------------|----------------------------|-------------|-----------|------|
|                      | концентрация<br>(мг/100 мл) | количество<br>(мг/24 часа) | незаменимые | заменимые | АИ   |
| I                    | 40,86±0,96                  | 1740,1±152                 | 672,0       | 1068,1    | 0,63 |
| II                   | 38,97±0,41                  | 1960,0±189                 | 716,5       | 1243,5    | 0,58 |
| III                  | 40,70±0,97                  | 1705,7±195                 | 635,0       | 1080,7    | 0,58 |
| IV                   | 77,89±0,60                  | 4149,2±555                 | 1544,7      | 2604,5    | 0,59 |
| V                    | 66,01±1,10                  | 1929,2±187                 | 833,0       | 1091,2    | 0,77 |

Примечание: АИ – аминокислотный индекс – незаменимые : заменимые

Спермопродукция у быков-производителей в зависимости от характера скормливаемых рационов. Эксперименты на быках-производителях показали, что характер рациона достаточно четко отражается как на объеме спермопродукции, так и на качестве спермы (табл. 6).

**Таблица 6. Физиологические показатели спермы быков по периодам опыта**

| Периоды<br>(рационы) | Объем<br>спермы,<br>мл | Концентрация<br>сперматозоидов,<br>млрд/мл | Подвижность<br>сперматозоидов | Жизнеспособность<br>сперматозоидов<br>(в тыс.) |
|----------------------|------------------------|--------------------------------------------|-------------------------------|------------------------------------------------|
| I                    | 4,8±0,63               | 1,06±0,12                                  | 0,80±0,03                     | 20,0±1,2                                       |
| II                   | 4,6±0,30               | 1,07±0,01                                  | 0,76±0,04                     | 21,0±1,2                                       |
| III                  | 5,4±0,89               | 1,26±0,1                                   | 0,86±0,04                     | 26,0±1,2                                       |
| IV                   | 6,4±0,43               | 1,30±0,06                                  | 0,86±0,05                     | 28,0±1,2                                       |
| V                    | 7,0±0,21               | 1,40±0,12                                  | 0,90±0,03                     | 30,0±1,8                                       |

В период скормливания II рациона с дефицитом по протеину наблюдалась тенденция к снижению спермопродукции в среднем на 0,2 мл в одном эякуляте, а в период скормливания III рациона – с высоким уровнем протеина, как и ожидали, наблюдалось повышение количества спермы на 0,6 мл в одном эякуляте или на 12,5%. Высокий уровень протеина в сочетании с соапстоком оказал положительный эффект на объем спермы, увеличив его на 1,6 мл, или на 33,3% в одном эякуляте. Еще более значительное увеличение спермопродукции у быков-производителей констатировали в период скормливания им соапстока и кулоков шелкопряда, когда объем одного эякулята спермы достигал 7 мл, что было больше контрольного на 2,2 мл, или на 45,8% (P<0,01).

По концентрации сперматозоидов в одном эякуляте между контрольным и II рационами различий не обнаружили, зато на III рационе наблюдалась тенденция к росту ее на 0,2 млрд/мл или на 18,8%. Концентрация сперматозоидов в одном эякуляте продолжала расти в период содержания животных на IV рационе с высоким уровнем протеина и с включением соапстока, и она достигала пика на V рационе, содержащем еще и куколок шелкопряда. Когда концентрация сперматозоидов в одном эякуляте достигла 1,40 млрд/мл она была выше контрольного рациона на 0,34 млрд/мл ( $P < 0,01$ ). По подвижности сперматозоидов превосходство оставалось лишь за V рационом, а между четырьмя предыдущими достоверных различий не было.

По жизнеспособности (живучести) сперматозоидов при оценке по пятибалльной системе рационы могли бы расположиться в обратной нумерации, т.е. первое место занимал бы V рацион, второе – IV-й, третье – III-й.

Таким образом, обобщая результаты экспериментов, можно отметить, что снижение уровня протеина на 15% (II рацион) против рекомендуемого (I рацион) сопровождалось усилением внешнесекреторных функций печени и поджелудочной железы. Повышение уровня протеина на 15% (III рацион) от контроля (I) в рационах быков вызвало снижение объема секреции желчи и ее липолитической активности, а амилалитическая активность оставалась без изменения, при этом заметно снижалась концентрация в желчи и печеночно-кишечный транспорт сухого вещества, общего азота и его компонентов.

В период содержания животных на III рационе также происходило уменьшение секреции панкреатического сока и всех форм его ферментативной активности. Поджелудочно-кишечный транспорт САК также снижался. Добавление к III рациону (с избытком протеина) соапстока (IV рацион) положительно влияло на внешнесекреторные функции как печени, так и поджелудочной железы, а также на спермопродукцию быков-производителей. При включении в IV рацион еще куколок шелкопряда (V рацион) все исследуемые процессы еще более активизировались.

В общем итоге следует отметить, что характер изменения внешнесекреторных функций печени и поджелудочной железы, а также спермопродукция и качество спермы в связи со скормливаемыми рационами строго взаимосвязаны и координированы между собой.

В предслучной и случной сезоны быкам-производителям, наряду с повышением уровня протеина в рационе, необходимо соответственно повышать и уровень энергии. В этих целях довольно эффективной добавкой может служить соапсток. Что касается куколок шелкопряда, то впервые применивший их в рационах быков-производителей В.К.Милованов (1962) остался сверхдово-

лен. Высокая эффективность влияния соапстока на спермопродукцию и качество спермы была четко показана и в наших экспериментах.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Алиев А.А. Экспериментальная хирургия (Учебное пособие). М.: «Инженер», 1998.
2. Алиев А.А., Алиева З.М. Выведение канюль из общего желчного и панкреатического протоков у крупного рогатого скота. Физиологический журнал СССР, 1972, 53 (II): 1736-1737.
3. Алиев А.А., Кафаров М.Ш. Влияние подкормки соапстока на пищеварение и молочную продуктивность буйволиц и коров. Материалы IV симпозиума по физиологии и биохимии лактации. Баку, 1974: 10-11.
4. Алиев А.А., Искендеров Б.Ф., Мирзоев Э.Т. Влияние разного уровня жира в рационе на секреторную функцию печени и поджелудочной железы у молодняка крупного рогатого скота. Бюллетень ВНИИФБиП с.-х. животных, 1975, 3(38): 50-52.
5. Калашников А.П. Кормление молочного скота. М. «Колос», 1978.
6. Милованов В.К. Биология воспроизведения и искусственного осеменения животных. М., 1962.

#### ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ КАТАЛАЗЫ ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ ДЛЯ ДОКЛИНИЧЕСКОГО ТЕСТИРОВАНИЯ ЗДОРОВЬЯ СВИНЕЙ

С.В. Грищук, В.И. Дудин  
Лаборатория БАВ и сертификации кормов

*В работе представлены материалы по обнаруженной нами зависимости активности каталазы в цельной крови от состояния здоровья свиней ( $r=0,85$ ). Обнаружена её слабая взаимосвязь с концентрацией альфа-токоферола в плазме крови ( $r=0,24$ ). В опытах *in vitro* при непосредственном контакте альфа-токоферола с перекисью водорода в спиртовой или водной среде не обнаружено существенного увеличения образования альфа-токоферилхинона. Сделано предположение о ферментативном окислении альфа-токоферола в крови животных за счет пероксида водорода. Само определение активности каталазы с малым количеством перекиси водорода*

*может быть использовано для широкой апробации в производстве в качестве доклинического теста состояния здоровья свиней, других видов животных или человека.*

### **Введение**

Каталаза разрушает перекись водорода путем диспропорционирования двух молекул субстрата с образованием двух молекул воды и одной молекулы кислорода. При определении активности каталазы существуют большие трудности при довольно простой прописи её анализа. Дело в том, что перекись водорода чрезвычайно агрессивна по отношению к ферментному белку каталазы. В качестве одного из путей преодоления этой методической погрешности было предложено сократить время контакта перекиси с образцом гемолизированной крови до 1 или 15 секунд (Крайнев, 1962). Концентрации перекиси водорода, добавляемые в реакционную среду, как правило, очень большие. В классическом методе Баха и Зубковой (1937) она составляет 1% (2мл x 10 мг/мл = 20 мг/ анализ), в методах Крайнева – 0,85% (5мл x 8,5 мг/мл = 42,5 мг/анализ). В то же время в животном организме каталаза действует не как каталаза, а как пероксидаза, ввиду того, что концентрация перекиси водорода в тканях весьма невысока (Уайт и др., 1981). В методе Дудина (1988), в котором предусмотрено колориметрическое определение перекиси водорода с реактивом Фолина, перекись водорода используется в концентрации 1,5 мМ/л (1мл x 51 мкг/мл = 51мкг/анализ). В этом случае можно не без основания полагать, что определяется активность каталазы как пероксидазы. В реакционную среду восстановители не добавляются, в качестве восстановителя может выступать другая молекула перекиси водорода, фенолы или гидрохиноны, такие как альфа-токоферилгидрохинон. При этом активностями истинных пероксидаз, как малыми величинами, можно пренебречь. Этим методом (Дудин, 1988) мы и воспользовались при анализе гемолизированной крови поросят, получавших различные дозы витамина Е (D, Альфа-токоферолаацетат), примененные в целях противодействия послеотъемному стрессу.

### **Материал и методы**

Целью эксперимента было определить возможность и целесообразность применения иммуностимулирующих уровней витамина Е при использовании в качестве основных критериев выбраковку поросят по состоянию здоровья ветеринарной службой Кузнецовского комплекса (Московская об-

ласть), где проводили опыт. В опыте с 28-ми до 50-суточного возраста участвовало 5 групп по 52 головы в каждой группе. Комфортность содержания поросят падала от 1-й группы к 5-й. Было зимнее время и положение поросят 5-й группы, располагавшейся у бетонной стены с окнами, более других предрасполагало к простудным заболеваниям. Имея в виду испытание иммуноактивных свойств витамина Е, в наиболее комфортные условия поместили поросят контрольной группы, получавшей комбикорма СК-3 и СК-4 без добавок витамина Е. Остальные группы получали D, L альфа-токоферолаацетат в количестве 100 (группа 2), 247 (3), 433 (4), 712 (5) мг на 1 кг корма. Значения приведены в соответствии с результатами непосредственного анализа. Кровь для анализа брали из хвостовой артерии в 50-суточном возрасте. В плазме крови определяли концентрацию альфа-токоферола с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (хроматограф Милихром, стальная колонка 120 x 2 мм, адсорбент «силасорб-600», с зернением 6,0 мкм, элюент – смесь гексан/серный эфир/ метанол – 89/10/1. Эту же технику использовали при анализе альфа-токоферола (Дудин, 2004). Активность каталазы в цельной крови определяли в постановке Дудина (1988).

### **Результаты и обсуждение**

В период послеотъемного стресса среднесуточные приросты живой массы поросят были без существенных различий между группами (рис.1), за исключением животных, получавших максимальную дозу витамина Е (712 мг D, L альфа-токоферолаацетата). Их среднесуточный прирост живой массы оказался статистически достоверно более низким ( $P < 0.001$ ) по сравнению с поросятами 4-й группы. Это свидетельствовало в пользу отсутствия предполагаемого положительного эффекта витамина Е в отношении преодоления послеотъемного стресса у поросят, одним из признаков которого является торможение роста молодняка. В этом случае проявилась заданная нами некомфортность содержания, а супердоза витамина Е никакого иммуноактивного действия не оказала.

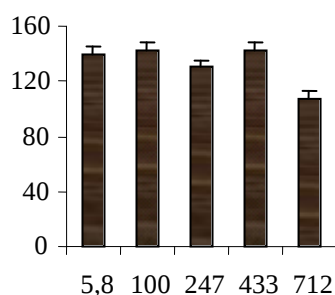


Рис. 1. Среднесуточный прирост живой массы поросят между 28-ю и 50-ю сутками жизни ( $x$  – доза витамина E в рационе, мг/кг;  $y$  – прирост живой массы, г)

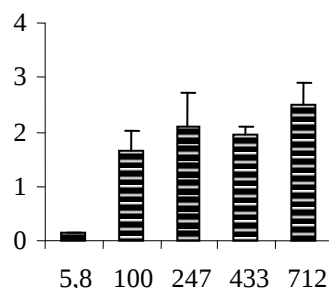


Рис. 2. Концентрация альфа-токоферола в плазме крови поросят 50-ти суточного возраста ( $x$  – доза витамина E в рационе мг/кг;  $y$  – концентрация альфа-токоферола, мкг/мл)

Мы исследовали концентрацию альфа-токоферола в плазме крови поросят (рис. 2). Резкие изменения проявились только при добавке 100 мг D, L альфа-токоферилацетата на 1 кг корма у поросят 2-й группы, по сравнению с группой 1 ( $P < 0.02$ ). В этом случае разница между группами по содержанию витамина E в корме была 17-кратной (корм поросят 1-й группы содержал только фоновое количество природного альфа-токоферола – 5,8 мг/кг корма). Дальнейшее увеличение не приводило к столь заметному увеличению концентрации альфа-токоферола в плазме крови поросят, но даже максимальная доза не обеспечила уровень альфа-токоферола в плазме в значениях, которые считаются иммуноактивными – 3 мкг/мл (Jensen, 1989). Причиной этого, несомненно, явилась невысокая поедаемость кормов в период послеотъем-

ного стресса, а также, возможно, ограниченные возможности поросят раннего возраста метаболизировать эстерифицированную форму витамина Е.

Каталаза относится к гемсодержащим ферментам, несущим трехвалентное железо. Она включает четыре гемовых группы на молекулу фермента. Каталаза относится к числу ферментов с очень высоким числом оборотов. Одна молекула фермента способна разложить 44000 молекул перекиси водорода в секунду. В нашем опыте наименьшую активность каталазы проявили поросята с добавкой 100 мг D,Альфа-токоферолаацетата (рис.3). Дальнейшее повышение дозы витамина Е приводило к статистически достоверному увеличению активности каталазы в крови ( $P_{гр.4 \text{ vs } гр.1} = 0,0037$ ;  $P_{гр.5 \text{ vs } гр.1} < 0,0001$ ;  $P_{гр.4 \text{ vs } гр.2} = 0,0017$ ;  $P_{гр.5 \text{ vs } гр.2} = 0,0001$ ;  $P_{гр.4 \text{ vs } гр.3} = 0,0236$ ;  $P_{гр.5 \text{ vs } гр.3} = 0,0015$ ). D,Альфа-токоферолаацетат поросятам группы 1 мы в корм не добавляли, а фон естественного альфа-токоферола был очень небольшим (5,8 мг/ кг корма), поэтому рацион контрольной группы был явно дефицитным по витамину Е. Дефицит витамина Е, как качественно иное состояние, мог послужить причиной повышения активности каталазы в крови поросят этой группы.

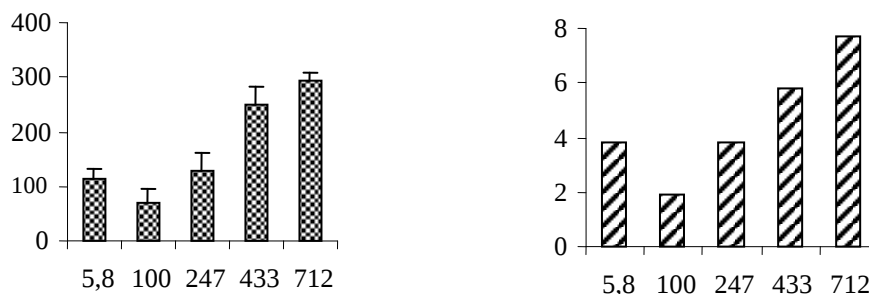


Рис. 3. Активность каталазы в гемолизированной крови 50-суточных поросят (слева); (х – доза витамина Е в рационе, мг/кг; у – активность каталазы, мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/мин х мл крови). Выборка по состоянию здоровья, % (справа).

На рис. 3 представлено 2 графика: один по активности каталазы, другой по выбраковке поросят по здоровью. Как видно из рисунка, приведенные на нем графики в тенденции очень точно повторяют друг друга. Между выбраковкой поросят по здоровью и активностью каталазы существует тесная коррелятивная связь ( $r=0,85$ ). Судя по этим материалам, ухудшению здоровья поросят сопутствует повышение активности каталазы (рис. 4). В то же время,

с выбраковкой поросят гораздо хуже коррелирует концентрация альфа-токоферола в плазме их крови ( $r=0,24$ ). В конечном итоге зависимость между концентрацией альфа-токоферола в плазме и активностью каталазы в гемолизированной крови весьма незначительна ( $r=0,31$ ). В то же время крайне интересно, что доза витамина Е в рационе статистически достоверно сказывалась на активности каталазы гемолизированной крови, увеличивая ее (см. выше). Здесь не исключено участие в проявлении активности каталазы альфа-токоферилхинона.

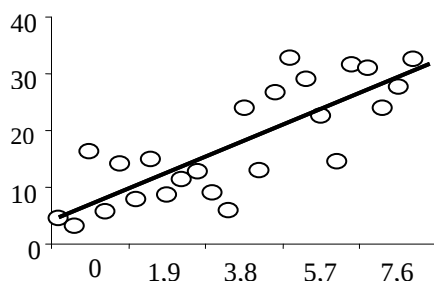


Рис. 4. Зависимость активности каталазы в гемолизированной крови поросят от их выбраковки по здоровью (% выбраковки; у-активность каталазы)

Мы проводили определение активности каталазы в постановке Дудина (1988) не только в гемолизированной крови, но также в гомогенатах печени в опыте, посвященном испытанию новых препаратов витамина Е (одна и та же доза, но в различных физических формах) и проведенном в виварии института. При этом выяснилось (рис.5), что между показателями существует заметная обратная зависимость ( $r= - 0,67$ ). Между кровью и печенью скорее всего имеет место обмен регуляторными биохимическими стимулами. Возможно, что это перекись водорода, которая легко проходит через мембранные образования и может служить индуктором каталазной активности. В то же время активность каталазы столь велика, что трудно себе представить, чтобы какие-то заметные количества перекиси водорода могли появиться в тканях. Возможно, что таким регулирующим моментом служит альфа-токоферилхинон.

В связи с тем, что основным симптомом выбраковки поросят являлись легочные заболевания, можно предполагать усиление в легких воспалительных процессов, усиливающих свободнорадикальные процессы, а следо-

вательно, ведущих к появлению активных форм кислорода, в том числе перекиси водорода, а также к повышению концентрации альфа-токоферилхинона.

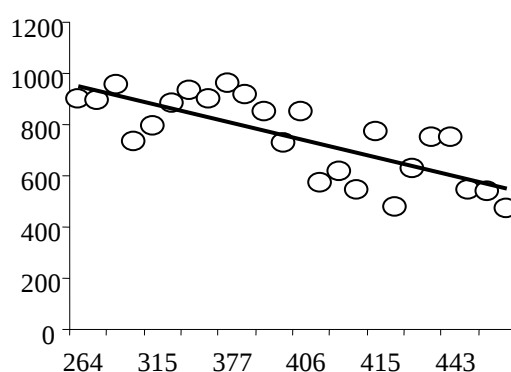


Рис.5. Взаимосвязь между активностью каталазы крови (x) и печени (y) у поросят в период выращивания ( $\mu\text{M H}_2\text{O}_2 / \text{мин} \times 1 \text{ мл}$  или г)

В литературе присутствуют сведения о взаимосвязи между уровнем перекиси водорода и концентрацией в крови альфа-токоферола (Szabo et al., 1968). Как оказалось, добавление в кровь перекиси водорода приводит к исчезновению альфа-токоферола из нее. Каталаза, добавленная по времени до перекиси водорода, устраняет этот эффект, добавленная после – на исчезновение альфа-токоферола в крови не влияет. Добавленная в кровь перекись водорода может вступать в реакцию Фентона с образованием очень токсичного продукта – гидроксидного радикала  $\text{OH}^\bullet$ , способного атаковать любое соединение, в том числе альфа-токоферол. Помимо каталазы мы определяли концентрацию альфа-токоферола в плазме крови. Вполне возможно, что нелинейный ответ концентрации альфа-токоферола на величину дозы D, L альфа-токоферил-ацетата в рационе зависит именно от образования активных форм кислорода. Перекись водорода, в отличие от супероксиданиона, способна легко проникать через мембраны, тем она и опасна. Она примечательна еще тем, что способна как к окислительным, так и восстановительным реакциям (Самуилов и др., 1999). Это обстоятельство позволяет перекиси водорода участвовать в качестве кофактора в пероксидазных реакциях. При этом в реальных условиях живых тканей, при очень невысокой концентрации перекиси водорода и избытии других доноров, каталаза действует исключительно как перок-

сидаза. В связи с этим исчезновение альфа-токоферола в крови при ее инкубировании с перекисью водорода можно связать с тем, что она участвует в окислении альфа-токоферола в альфа-токоферилхинон, который, восстанавливаясь в дыхательной цепи, может быть специфическим кофактором каталазы в пероксидазной реакции. Активные формы кислорода (супероксид анион) являются катализаторами окисления альфа-токоферола молекулярным кислородом (Дудин, 2004). Процесс этот многостадийный и, в частности, ведет к образованию альфа-токоферилхинона. В то же время механизм действия перекиси водорода мог быть иным из-за образования при ее распаде чрезвычайно активного гидроксильного радикала. Еще в 1972 году американский исследователь Tarpeil предложил схему окисления в свободнорадикальных процессах альфа-токоферола в альфа-токоферилхинон через стадию хинон-метина.

В одном из наших экспериментов альфа-токоферол (6 мг) солюбилизировали в 25 мл перекиси водорода (3%) путем добавления силикагеля (1,5 г) с высаженным на нем альфа-токоферолом. Через 12 часов помешивания липидную часть экстрагировали бензолом, который упаривали, а остаток растворяли в гексане для ВЭЖ хроматографирования. Как оказалось, перекись водорода в водной среде мало влияет на количество альфа-токоферола в смеси, но приводит к заметному увеличению в смеси альфа-токоферилхинона (с 0 до 5%).

Контакт альфа-токоферола с перекисью водорода мы проводили не только в водной среде, но также в среде этанола. Альфа-токоферол (6 мг) растворяли в этаноле (18 мл) и приливали 2 мл 3% раствора перекиси водорода в воде. Через 10 часов, как и через 1 и 10 суток контакта, мы не заметили каких-либо изменений по сравнению с исходным образцом. Не было их и в отношении образования альфа-токоферилхинона (0,25-0,3%). Вывод, вытекающий из этих результатов таков, что окисление альфа-токоферола за счет перекиси водорода практически не происходит. Разница между средами окисления состоит лишь в меньшем образовании альфа-токоферилхинона в спиртовой среде, ибо спиртовый гидроксил является хорошим тушителем свободных радикалов. На рис. 6 представлены УФ-спектры продуктов, обнаруженных после контакта альфа-токоферола с перекисью водорода в спиртовой и водной среде.

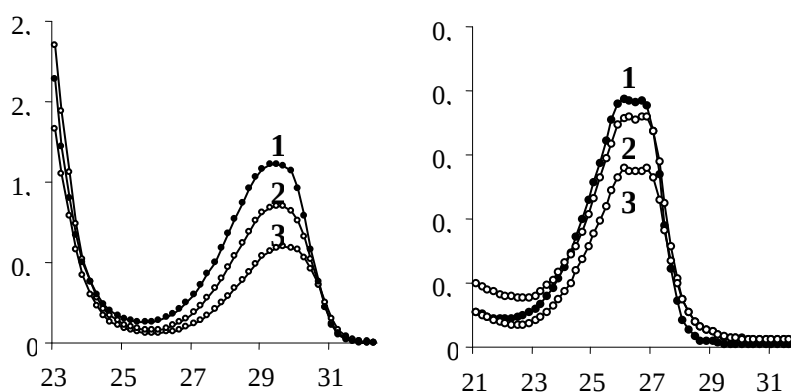


Рис.6. УФ-спектры альфа-токоферола (слева) и альфа-токоферилхинона (справа) (1) и веществ (2, 3), обнаруженных в результате контакта альфа-токоферола с перекисью водорода в спиртовой (2) или водной (3) среде (х-длина волны, нм; у-абсорбция)

### Заключение

Проведенные исследования позволяют заключить, что прижизненное определение активности каталазы в крови свиней в постановке, использующей малые количества субстрата, может служить хорошим субклиническим показателем состояния здоровья свиней. В то же время, перекись водорода *in vitro* не ведет к заметному окислению альфа-токоферола, независимо от примененных сред. В этой связи исчезновение альфа-токоферола в крови под влиянием перекиси водорода скорее всего протекает ферментативным путем, что усиливает интерес к затронутой нами теме. Дальнейшие работы связаны с поиском ферментной системы, окисляющей альфа-токоферол в альфа-токоферилхинон. В случае обнаружения такой системы возникнет необходимость расшифровки смысла этой реакции. На этот счет существуют сведения о независимом синтезе в организме высших растений и животных альфа-токоферилхинона, однако не было продемонстрировано, что указанный процесс носит обширный характер. В этой связи весьма привлекательным может оказаться существование

ферментативного окисления альфа-токоферола в альфа-токоферилхинон. Учитывая, что последний способен восстанавливаться в дыхательной цепи в альфа-токоферил-гидрохинон, являющийся лучшим, чем альфа-токоферол антиокислителем, можно полагать, что альфа-токоферилгидрохинон является, в качестве кофактора, участником каталазной пероксидазной системы, обезвреживающей избытки активных форм кислорода, образующихся в процессе работы дыхательной цепи.

#### ЛИТЕРАТУРА

- 1 Бах А.Н., Зубкова С.Р. В кн. А.Н. Баха: Сборник избранных трудов. Л., 1937: 411.
- 2 Дудин В.И. Способ определения каталазы крови а.с. СССР № 1399682 от 01.02.1988.
- 3 Дудин В.И. Биохимия витамина Е и связанных с ним биологически активных веществ. М: РАСХН, 2004.
- 4 Крайнев С.И. Определение каталазной активности гемолизированной крови при однократном и пятнадцатисекундном сроках реакции с перекисью водорода. Лабораторное дело, 1962: 13-18.
- 5 Самуилов В.Д., Безряднов Д.В., Гусев М.В., Каташов А.В., Федоренко Т.А.  $H_2O_2$  ингибирует рост цианобактерий. Биохимия, 1999, 64, 1: 60-67 .
- 6 А.Уайт, Ф.Хендлер, Э.Смит, Р.Хилл, и.Леман. Основы биохимии, М: Мир, 1981, 1 .
- 7 Jensen M. Vitamin E and the growing pig. Uppsala: Swed. Univ. Agr. Sci., 1989, 150.
- 8 Szabo S.J., Mengel C.E. Effect of Diet and in Vivo Hyperoxia on Plasma Tocopherol Levels. The American J. of the Medical Sciences, 1968, 255: 132-136.
- 9 Tappel A.L. Vitamin E and Free Radical Peroxidation of Lipids. N.Y. Acad. Sci., 1972, 203: 12.

## **ЗАКОНОМЕРНОСТИ ИЗМЕНЕНИЯ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА У КОРОВ ПРИ ПОВЫШЕНИИ УРОВНЯ ПИТАНИЯ И МОЛОЧНОЙ ПРОДУКТИВНОСТИ**

*В.Б. Решетов*

Лаборатория энергетического питания

*Установлено, что при повышении уровня кормления и молочной продуктивности коров в исследованном интервале достоверно снижалась «видимая» переваримость органического вещества, БЭВ, сырого протеина и сырой клетчатки рационов. Переваримость сырого жира снижалась недостоверно. При увеличении содержания в сухом веществе рациона сырой клетчатки достоверно повышалась переваримость самой клетчатки, а переваримость остальных питательных веществ достоверно снижалась. При высокой продуктивности наблюдалось увеличение прироста затрат энергии в тканях организма на единицу прироста удоя. Поскольку это явление не могло быть объяснено с точки зрения потерь энергии в желудочно-кишечном тракте и затратами ее в реакциях биосинтеза компонентов молока, в качестве основной причины, вероятно, выступает рост затрат на поддержание как биохимического, так и теплового гомеостаза организма.*

### **Введение**

В настоящее время, в связи со значительно возросшими техническими возможностями, основная масса исследований по физиологии и биохимии лактации направлена на изучение обеспеченности процессов биосинтеза компонентов молока необходимыми метаболитами-предшественниками. При этом ставятся вопросы выявления факторов, лимитирующих процессы биосинтеза. Значительно меньшее внимание уделяется изучению физиологии лактирующего организма в целом. Между тем адекватное обеспечение обменной энергией организма высокопродуктивной коровы в целом также имеет первостепенное значение. Спектр питательных веществ, необходимых для удовлетворения потребностей организма, безусловно, имеет важное значение, но взаимозаменяемость веществ-источников энергии может в значительной степени размыть границы составляющих этого спектра. Несмотря на кажущуюся простоту вопроса об обеспечении организма высокопродуктивных коров энергией, многие его аспекты остаются неизученными, а некоторые известные факты в принципе замалчиваются или игнорируются, поскольку соз-

дают значительные трудности (иногда однозначно непреодолимые) при создании систем питания или норм.

В число таких недостаточно изученных вопросов входит феномен снижения (в дифференциальном аспекте) эффективности использования обменной энергии с ростом молочной продуктивности. По-видимому, механизмы указанного явления могут иметь как частную метаболическую, так и общебиологическую природу. В связи с накоплением большого массива первичных данных об энергетическом обмене у коров разного уровня продуктивности и появлением новой информации по частным вопросам обмена веществ у коров появилась возможность провести поисковую работу по уточнению его причин этого феномена с использованием новых эффективных средств обработки и статистического анализа данной информации.

Поэтому целью исследований было проведение статистического анализа большого массива данных для выявления общебиологических закономерностей изменения затрат энергии у коров в зависимости от уровня питания и молочной продуктивности.

Задачи исследований состояли в следующем:

- 1) систематизация имеющихся материалов по переваримости основных групп питательных веществ во всем пищеварительном тракте в зависимости от уровня кормления коров;
- 2) систематизация материалов по теплообразованию в организме коров при разном уровне молочной продуктивности;
- 3) проведение в дифференциальном аспекте статистического анализа экспериментальных данных для выявления общебиологических закономерностей изменения затрат энергии организмом коров при разных уровнях молочной продуктивности;
- 4) конечная задача состояла в сопоставлении, по возможности, выявленных закономерностей изменений энергетического обмена с изменениями субстратно-метаболической ситуации в организме.

### **Материалы и методы**

В многолетних исследованиях лаборатории энергетического питания были получены материалы, составившие массив данных об энергетическом статусе организма коров и использованию ими энергии рационов и резервов организма при разном физиологическом состоянии и уровне молочной продуктивности (Решетов, Надальяк, 1982; Решетов, 1998). В данной работе использованы материалы обменных опытов, проведенных автором на лакти-

рующих коровах, а также первичные материалы обменных опытов, содержащиеся в монографиях Емельянова (1969) и Денисова (1960, 1973). Материалы Денисова по теплообразованию у коров имели особую ценность, так как они были получены косвенным путем с помощью респирационных камер, что позволило сравнить их с величинами, полученными автором статьи на аналогичных коровах методом непрямой калориметрии по газообмену, измеряемому с помощью масок.

Кормление коров проводили по действующим на период проведения опытов нормам. В опытах определяли: молочную продуктивность и параметры кормления (содержание в потребленных кормах энергии и реальную общую переваримость энергии рационов и важнейших групп питательных веществ, содержащих доступную энергию). Определяли также показатели энергетического обмена: количество энергии в удое и экскретах, в выделенном метане, общую теплопродукцию по газообмену, рассчитывали величину и направленность (с плюсом или минусом) баланса энергии в организме.

Содержание основных питательных веществ в кормах определяли с помощью традиционных методов зооанализа. Калорийность кормов, кала, мочи, молока определяли с помощью адиабатического калориметра. Теплопродукцию в тканях всего организма рассчитывали по газообмену организма, определяемому масочным методом. Химический анализ газов проводили с помощью аппарата Холдена. Закономерности выделения коровами метана рассчитывали, используя данные Денисова (1960, 1973) и Решетова (1998).

### **Результаты и обсуждение**

В существующих системах нормирования питания энергетическая питательность конкретного корма в таблицах питательности кормов обычно характеризуется одним числом (средняя для данного корма номинальная питательность). Однако при создании норм энергетического питания обязательно встает вопрос о зависимости количества энергии, получаемой животным из корма, от состава рациона и уровня питания. При создании норм кормления расхождение первоначальных расчетов на основе «табличной» номинальной питательности кормов с ожидаемой реальной картиной корректируется с учетом наличия достаточно четкой тенденции изменения переваримости питательных веществ корма в зависимости от уровня питания (Нормы и рационы..., 1969, 1985). Например, согласно нормам 1969 года (Томмэ и др., 1969) увеличение молочной продуктивности на 1 л/сут требует увеличения пита-

тельности рациона при низких удоях на 0,45-0,50, а при высоких удоях и, соответственно, более высоком уровне кормления – на 0,65 кормовой единицы.

В отечественной литературе физиологический аспект данного вопроса не привлекал необходимого внимания. Нередко без достаточного учета разницы в составе рационов у коров разного уровня продуктивности делался вывод об отсутствии существенных изменений переваримости или даже ее повышении при высокой продуктивности (Груздев и др. 1995; Демченко, 1972; Денисов и Мельникова, 1973; Зборовский и Богатноу, 1996). По нашим данным, полученным на основании анализа результатов обменных опытов на 88 интактных коровах, основная масса величин переваримости энергии находилась в интервале 65-75 %. Между тем, при повышении продуктивности в рационах коров увеличивается доля кормов с высоким содержанием обменной энергии – зерновых концентратов, корнеклубнеплодов, измельченных травяных кормов искусственной сушки, имеющих более высокую общую переваримость, чем основные грубые корма. При этом соответственно снижается концентрация сырой клетчатки в сухом веществе рационов. Поэтому изменение переваримости питательных веществ и энергии по мере повышения уровня кормления маскируется вследствие изменения состава рационов.

Для оценки влияния уровня кормления и состава рационов на переваримость питательных веществ был проведен анализ зависимости переваримости питательных веществ смешанных рационов от уровня кормления с помощью разработанного нами методического подхода. Дополнительные данные по данному вопросу нужны при создании норм энергетического питания для уточнения количественных параметров системы поправок, компенсирующих отклонение реальной питательности кормов от номинальной (табличной) при повышении уровня питания. Для анализа использованы собственные материалы и данные из научной литературы по фактической переваримости питательных веществ смешанных рационов, главным образом данные Емельянова (1969).

Использованный нами методический подход состоит в следующем. В опытах было использовано 12 традиционных кормов. Известна средняя «табличная» переваримость содержащихся в них питательных веществ (Переваримость..., 1970), которую мы приняли за референтную. По каждому использованному рациону вычисляли реальную переваримость фактически потребленных питательных веществ. Затем группировали материалы по классам (табл. 1) и ранговым методом вычисляли коэффициенты корреляции между фактической переваримостью отдельных групп питательных веществ и потреблением животными сухого вещества кормов (кг/сут). Количество сухого

вещества в рационах отражало уровень кормления коров. В результате определены коэффициенты корреляции по всем оценивавшимся парам показателей и проведена оценка их достоверности (табл. 2). Для всех пар коэффициенты корреляции были отрицательными, при этом только для пары “переваримость сырого жира – потребление сухого вещества” коэффициент был недостоверным.

Аналогично проведен анализ коррелятивной зависимости переваримости питательных веществ рациона от содержания в сухом веществе рационов сырой клетчатки в интервале 15-28 %, который охватывал условия всех опытов. Анализ показал следующее (табл. 3). Повышение содержания сырой клетчатки оказывало достоверное понижающее влияние на видимую переваримость органического вещества, БЭВ, сырого протеина и сырого жира. Но переваримость самой клетчатки при этом достоверно увеличивалась.

*Таблица 1. Переваримость групп питательных веществ рациона (%) в зависимости от потребления сухого вещества (кг/сут)*

| Потребление<br>сухого вещества,<br>кг/сут | Переваримость, %         |      |                    |                  |              |
|-------------------------------------------|--------------------------|------|--------------------|------------------|--------------|
|                                           | органическое<br>вещество | БЭВ  | сырая<br>клетчатка | сырой<br>протеин | сырой<br>жир |
| 7.1–8.5                                   | 77.4                     | 79.3 | 77.6               |                  | 66.4         |
| 8.6– 10.0                                 | 78.3                     | 81.9 | 73.3               | 81.0             | 66.1         |
| 10.1–11.5                                 | 77.7                     | 82.2 | 69.1               | 77.8             | 66.1         |
| 11.6–13.0                                 | 75.2                     | 80.1 | 64.5               | 75.3             | 64.7         |
| 13.1–14.5                                 | 71.1                     | 77.4 | 62.6               | 74.0             | 64.1         |
| 14.6–16.0                                 | 71.9                     | 76.0 | 62.0               | 73.4             | 61.9         |
| 16.1–17.5                                 | 71.5                     | 75.9 | 60.9               | 74.5             | 60.3         |
| 17.6–19.0                                 | 70.8                     | 76.2 | 58.7               | 73.8             | 58.2         |
| 19.1–20.5                                 | 69.3                     | 76.1 | 54.6               | 75.1             | 57.9         |
| 20.6–22.0                                 | 67.3                     | 75.5 | 50.4               | 76.6             | 57.9         |

Очевидно, что реальная доступность для переваривания большинства групп питательных веществ с увеличением содержания клетчатки в сухом веществе рационов уменьшается. Повышение же переваримости самой клетчатки связано, по-видимому, с увеличением времени задержки длинноволокнистой клетчатки в преджелудках и более благоприятными при этом условиями для деятельности целлюлозолитической микрофлоры.

*Таблица 2. Зависимость переваримости питательных веществ рациона от потребления сухого вещества корма (кг/сут)*

| Питательные вещества                | Коэффициент корреляции | Р            |
|-------------------------------------|------------------------|--------------|
| Органическое вещество               | -0.37                  | < 0.01       |
| Безазотистые экстрактивные вещества | -0.27                  | < 0.05       |
| Сырой протеин                       | -0.49                  | < 0.01       |
| Сырая клетчатка                     | -0.28                  | < 0.05       |
| Сырой жир                           | -0.20                  | недостоверно |

*Таблица 3. Зависимость переваримости питательных веществ рациона от содержания сырой клетчатки в сухом веществе рациона с интервале от 15 до 28 %*

| Питательные вещества                | Коэффициент корреляции | Р      |
|-------------------------------------|------------------------|--------|
| Органическое вещество               | -0.47                  | < 0.01 |
| Безазотистые экстрактивные вещества | -0.58                  | < 0.01 |
| Сырой протеин                       | -0.30                  | < 0.05 |
| Сырая клетчатка                     | +0.26                  | < 0.05 |
| Сырой жир                           | -0.44                  | < 0.05 |

Кроме того, по материалам первичных данных тех же балансовых опытов (Денисов, 1960,1973) о количестве метана, выделяющегося из организма коров при разных условиях кормления, были проведены расчеты по выявлению зависимостей между количеством образовавшегося метана и некоторыми условиями кормления. Это было необходимо сделать для дополнения картины зависимости переваримости питательных веществ от уровня питания. В выбранном аспекте связи эти до сих пор глубоко не анализировались.

В связи с использованием при построении системы питания жвачных на основе обменной энергии понятия “видимо переваренная энергия” мы проанализировали зависимость между энергией выделенного метана и энергией видимо переваренных веществ (МДж/сут). Оказалось, что между величиной “видимо” переваренной энергии и долей от нее, приходящейся на метан, имеется обратная зависимость. Иными словами, с увеличением количества пере-

варенной энергии доля, приходящаяся на метан, уменьшается. Максимальная величина доли энергии метана от переваренной энергии, во всем диапазоне условий опытов была близка к 14 %, а минимальная – к 6,5 %. Зависимость хорошо описывается уравнением

$Y = 15,81 - 0,03X$ , где:  $Y$  – доля энергии метана от переваримой энергии (в %), а  $X$  – переваримая энергия.

Абсолютная же величина энергии, содержащейся в выделенном за сутки метане, в диапазоне величин переваренной энергии от 100 до 250 МДж, достигала плато при приближении к 200 МДж. Иными словами, объем метанообразования при более высоких уровнях кормления становился относительно постоянным.

На следующем этапе анализа оценивали эффективность затрат энергии при разных уровнях молочной продуктивности. Расчеты были проведены в дифференциальном режиме: определяли изменения теплообразования в организме при повышении энергии удоя на условную единицу (шаг между классами сгруппированных показателей). Нами проанализирован большой массив экспериментальных данных по состоянию энергетического обмена у коров разного уровня продуктивности. Путем статистического анализа материала более 80 обменных опытов на коровах оказалось возможным получить количественную характеристику прироста затрат энергии (соответствует приросту общей теплопродукции организма) на единицу прироста энергии молока (табл. 4). Эти затраты включают в себя как теплоту, образовавшуюся при окислении органических веществ до этапа образования макроэргических связей (первичная теплота), так и теплоту, образовавшуюся при использовании энергии макроэргических связей АТФ (вторичная теплота) для осуществления требующего затрат энергии биосинтеза и других процессов жизнедеятельности организма. Очевидно, что общий прирост затрат энергии происходит во всем организме, но особенно в органах, обеспечивающих снабжение молочной железы предшественниками компонентов молока (желудочно-кишечный тракт, печень, сердечно-сосудистая система).

Оценка динамики роста затрат энергии (прироста теплопродукции при разной молочной продуктивности) на единицу энергии удоя осложняется тем, что одновременно могло изменяться количество энергии в теле животных. Этот фактор является важнейшим в плане отклонения величины теплопродукции от “идеального” значения, характеризующего корову с относительно постоянным содержанием энергии в теле. При одновременном анализе зависимости величины и направленности (положительный или отрицательный) баланса энергии у коров установлено, что баланс энергии находится в досто-

верно отрицательной связи с величиной энергии суточного удоя. Однако вариабельность связи была довольно высокой. При энергии удоя до 60 МДж/сут среднее для всех классов животное имело положительный баланс энергии.

**Таблица 4. Увеличение затрат энергии в тканях всего организма на теплообразование в расчете на единицу прироста энергии удоя**

| Энергия удоя, МДж/сут | Разность (P <sub>1</sub> ) между классами |      | Теплопродукция в тканях, МДж/сут | Разность (P <sub>2</sub> ) между классами |      | Соотношение P <sub>2</sub> /P <sub>1</sub> |      |
|-----------------------|-------------------------------------------|------|----------------------------------|-------------------------------------------|------|--------------------------------------------|------|
| 0                     | —                                         | 37.7 | 54.8                             |                                           | 25.6 |                                            | 0.68 |
| 37.7                  | 8.3                                       |      | 80.4                             | 2.5                                       |      | 0.30                                       |      |
| 46.0                  |                                           | 8.4  | 82.9                             |                                           | 2.9  |                                            | 0.34 |
| 54.4                  | 8.4                                       |      | 85.8                             | 2.9                                       |      | 0.34                                       |      |
| 62.8                  |                                           | 8.3  | 88.7                             |                                           | 2.5  |                                            | 0.30 |
| 71.1                  | 8.4                                       |      | 91.2                             | 1.7                                       |      | 0.20                                       |      |
| 79.5                  |                                           | 8.4  | 92.9                             |                                           | 3.1  |                                            | 0.37 |
| 87.9                  | 8.3                                       |      | 95.8                             | 4.2                                       |      | 0.51                                       |      |
| 96,2                  |                                           | 8.4  | 100.0                            |                                           | 5.5  |                                            | 0.58 |
| 104.6                 |                                           |      | 105.5                            |                                           |      |                                            |      |

Уже при удое 15 кг/сут (при жирности молока 4 %) встречались животные с отрицательным балансом энергии. Поэтому прирост теплопродукции на единицу прироста энергии удоя был выше и в первых классах, и в последних. В первом случае это объясняется сравнительно высокими, по сравнению с затратами на синтез молока, затратами энергии на отложение. Увеличение отношения (прирост теплопродукции)/(прирост энергии удоя) до 0.37 → 0.51 → 0.58 при высоких удоях, по сравнению с меньшими (в интервале 0.34 - 0.20) при средних удоях, не может быть объяснено тем же механизмом. Более того, синтез липидов молока за счет мобилизованных из тканевых депо жирных кислот с длинной углеродной цепью происходит с большей энергетической эффективностью, чем первичный синтез жирных кислот молока из ацетата и β-оксибутирата (табл. 5).

*Таблица 5. Затраты энергии на конечном этапе синтеза компонентов молока (в расчете на 1 г)*

| Компоненты                                                 | Расход АТФ, моль | Расход НАДФ Н <sub>2</sub> , моль | Теплообразование при синтезе и использовании АТФ, кДж |
|------------------------------------------------------------|------------------|-----------------------------------|-------------------------------------------------------|
| Лактоза                                                    | 0.006            | —                                 | 0.61                                                  |
| Белок (казеин)                                             | 0.025            | —                                 | 2.62                                                  |
| Жир молока (триглицериды в среднем)                        | 0.020            | 0.023                             | 2,09                                                  |
| Синтезированные из ацетата и β-оксibuтирата жирные кислоты | 0.024            | 0.046                             | 2.51                                                  |

Исходя из сказанного можно предполагать, что причиной увеличения затрат энергии организмом на единицу прироста энергии удоя при высоком уровне продуктивности может быть необходимость поддержания химического гомеостаза в организме. Считается, что затраты на поддержание градиентов концентрации многих метаболитов и ионов составляют до половины всех затрат энергии. Поэтому можно ожидать, что при увеличении потоков и концентрации многих метаболитов в связи с ростом уровня кормления возрастут и затраты на сохранение физиологически приемлемой разности концентраций веществ по обеим сторонам биологических мембран (снаружи и внутри клетки). Кроме того, рядом исследователей было установлено, что при повышении концентрации в жидкостях организма неэстерифицированных жирных кислот происходит модификация свойств мембран, в том числе и мембран митохондрий. В результате снижается сопряженность процессов окисления и фосфорилирования и, как следствие, увеличение образования тепла при генерации того же количества АТФ.

Еще одним возможным механизмом увеличения затрат энергии при росте уровня кормления и продуктивности может быть рост затрат энергии на выведение из организма избыточного тепла. Такое предположение подкрепляют имеющиеся в литературе наблюдения о меньшей распространенности кетоза у высокопродуктивных коров при оптимально низкой температуре среды.

### **Заключение**

При повышении уровня кормления, оцениваемого по количеству потребленного сухого вещества кормов, во всем исследованном интервале достоверно значительно снижалась "видимая" переваримость органического вещества, БЭВ, сырого протеина и сырой клетчатки рационов. Переваримость сырого жира имела тенденцию к снижению. При увеличении содержания в сухом веществе рациона сырой клетчатки достоверно повышалась переваримость самой клетчатки, а переваримость остальных питательных веществ достоверно снижалась. Статистический анализ большого массива данных по теплообразованию в тканях организма коров (определяемому по показателям газообмена организма) позволил при дифференциальном подходе выявить повышение прироста затрат энергии на единицу прироста удоя при высоком уровне продуктивности. Поскольку уменьшение энергетической эффективности синтеза дополнительных количеств молока не могло быть объяснено с точки зрения потерь энергии в желудочно-кишечном тракте и энергетики реакций биосинтеза компонентов молока, в качестве основной причины, вероятно, выступает рост затрат на поддержание гомеостаза организма как биохимического, так и теплового.

### **Выводы**

1. Выявлена достоверная отрицательная коррелятивная зависимость между потреблением лактирующими коровами сухого вещества рациона (потребление сухого вещества кормов увеличивалось соответственно росту молочной продуктивности) и переваримостью органического вещества, БЭВ, сырого протеина и сырой клетчатки.
2. Между содержанием сырой клетчатки в сухом веществе рациона и переваримостью тех же питательных веществ, кроме сырой клетчатки, связь также достоверно отрицательная. Переваримость сырой клетчатки с ростом ее концентрации, напротив, повышается.
3. Доля энергии метана от видимо переваренной энергии рациона при повышении уровня кормления достоверно уменьшается.
4. Дифференциальная величина прироста теплопродукции в организме на условную единицу прироста энергии удоя не является постоянной. Она минимальна при средних удоях, когда содержание энергии в организме относительно постоянно. При меньших удоях в связи с частым положительным балансом энергии она выше. Также закономерно повышалась ве-

личина прироста теплопродукции на единицу прироста энергии удоя при высоких удоях, когда баланс энергии часто бывает отрицательным. Причиной этого, по-видимому, является повышение затрат на поддержание гомеостаза организма как биохимического, так и теплового.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Блекстер К. Дальнейшее развитие системы кормления жвачных животных на основе обменной энергии. Новейшие достижения в исследовании питания жвачных животных. М.: Колос, 1982: 107-164.
2. Груздев Н.В. и др. Использование энергии и питательных веществ из рационов молочными коровами разного уровня продуктивности. Актуальные проблемы развития животноводства. Труды ВИЖ. Дубровицы, 1995, 57, ч. 2: 30-37.
3. Демченко П.В. Биологические закономерности повышения продуктивности животных. М.: Колос, 1972: 295 с.
4. Денисов Н.И. Научные основы кормления коров. М.: Сельхозгиз, 1960: 440 с.
5. Денисов Н.И., Мельникова Т.С. Нормированное кормление коров. М.: Колос, 1973: 208 с.
6. Зборовский Л.В., Богатноу Н.П. Особенности обмена веществ у холмогор-голландских коров. Зоотехния, 1996, 4: 14-17.
7. Емельянов А.С. Нормы и рационы кормления молочных коров. Вологда: Сев.-Зап. изд-во, 1969: 533 с.
8. Надальяк Е.А. и др. Изучение обмена энергии и энергетического питания у сельскохозяйственных животных. Метод. указания. Боровск, 1986: 58 с.
9. Нормы и рационы кормления сельскохозяйственных животных. Под ред. Томмэ М.Ф. М.: Колос, 1969: 360 с.
10. Нормы и рационы кормления сельскохозяйственных животных. Справочное пособие. Под ред. Калашникова А.П. и Клейменова Н.И. М.: Агропромиздат, 1985: 352 с.
11. Нормы и рационы кормления сельскохозяйственных животных. Справочное пособие. Под ред. Калашникова А.П. и Клейменова Н.И. М.: Агропромиздат, 2005: 456 с.
12. Переваримость кормов. Составитель Томмэ М.Ф. и др. М.: Колос, 1970: 464 с.
13. Потребность жвачных в питательных веществах и энергии Пер. с англ. под ред. А.П. Дмитроченко. М.: Колос, 1968: С. 306-412.

14. Решетов В.Б. Энергетический обмен у коров в связи с физиологическим состоянием и условиями питания. Дисс...д.б.н., Боровск, 1998: 441 с.
15. Решетов В.Б., Надальяк Е.А. Потребность в энергии у коров в первой половине лактации. Тр. ВНИИФБиП, Боровск, 1982: 25-31.
16. Рядчиков В.Г. Нормы кормления сельскохозяйственных животных. Методология, ошибки, перспективы. Сельскохозяйственная биология. 2006, 4: 68-81.
17. Martin O., Sauvant D. Metaanalysis of input/output kinetics in lactating dairy cows. J. Dairy Sci., 2002, 85, 12: 3363-3381.

#### **ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФОНДА СУБСТРАТОВ В СБАЛАНСИРОВАННЫХ РАЦИОНАХ ДЛЯ ОБЕСПЕЧЕНИЯ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА И СИНТЕЗА КОМПОНЕНТОВ МОЛОКА У ЛАКТИРУЮЩИХ КОРОВ**

*В.И. Агафонов, В.Б. Решетов, Р.А. Волобуева, В.В. Михайлов*

*Приведены экспериментальные данные по использованию в рационах лактирующих коров энергетических и белковых кормовых добавок с целью повышения обеспеченности энергией и обменным белком биосинтеза компонентов молока и снижения уровня мобилизации энергии и аминокислот из тканевых резервов организма в период раздоя.*

Материалы последнего издания детализированных норм кормления сельскохозяйственных животных дают основу для ориентировочного разделения норм потребности лактирующих коров в обменной энергии на ее составляющие: энергию продукции и теплопродукцию. Зная потребность в ОЭ на образование определенного количества молока и принимая калорийность молока за 3 МДж/кг, можно рассчитать величину суточной теплопродукции по формуле:  $ТП = ОЭ - ЭП$ . Хотя такой приём является крайне условным, но он даёт представление об основных составляющих обменной энергии, об эффективности молокообразования у коров по месяцам лактации. В целом детализированные нормы кормления молочных коров позволяют прогнозировать уровень молочной продуктивности с учётом содержания процента жира в молоке (Нормы и рационы..., 2003).

Для дальнейшего совершенствования системы нормированного питания лактирующих коров предложены дополнительные показатели, характери-

зующие субстратный спектр обменной энергии, что позволяет прогнозировать величину не только суточного удоя, но и контролировать качественные показатели молока. Принципиальным аспектом проведенных исследований является оценка баланса субстратов у лактирующих коров (Медведев, 1978; Sutton, 1985; Sporndly, 1990; Овчаренко, 1991; Honing, 1998; Агафонов, 1995, 2004; Харитонов, 2001, 2006). Следующим этапом в этих исследованиях может быть переход от изучения физиологических закономерностей использования обменной энергии и субстратов у коров к поиску путей регулирования производства молока с заданными свойствами (Харитонов, Агафонов и др., 2001, 2006). В наших исследованиях была поставлена задача попытаться смягчить спад удоя, обычно наблюдающийся у первотелок, путем балансирования рациона по субстратному принципу с учётом динамики живой массы, величины и продолжительности мобилизации энергетических и белковых ресурсов организма.

#### **Материал и методы**

Эксперимент проведен в условиях вивария института методом групп-периодов в опытах на 6 коровах-первотёлках (средняя живая масса 400 кг, среднесуточный удой 20 кг) в период 15-115 дней лактации.

Были сформированы две группы коров по 3 головы, сходные по срокам отёла. До 15-го дня лактации коровы обеих групп получали одинаковые рационы на основе грубых кормов и концентратов, содержащие легкораспадаемые в рубце углеводы и протеин по нормам ВНИИФБиП (Физиологические потребности..., 2001). Коровам первой группы (n=3) с 15-го дня лактации была повышена общая питательность рациона за счёт включения в состав комбикормов "защищённых" сухих жиров (Бергафат) производства Германии и увеличения уровня обеспечения глюкозой за счёт частичной замены в составе комбикорма зерна ячменя кукурузой (табл.1 и 2). На этом фоне коровы получали рацион, обеспеченный обменным белком на 100% потребности за счёт подсолнечного и соевого шротов. Дополнительное обеспечение коров обменным белком осуществляли с 30 дней лактации за счёт белкового продукта "Сойпрот" производства Голландии в количестве 150 и 300г на голову в день. В период 55-60 дней лактации был проведён балансовый опыт с измерением лёгочного газообмена. Учёт молочной продуктивности проводили ежедневно. Коровам второй группы в период раздоя скармливали пропиленгликоль в количестве 400 г/сутки на голову.

*Таблица 1. Рационы кормления лактирующих коров и субстратная оценка рационов (по фактическому потреблению корма)*

| Корма, показатели пита-<br>тельности   | Ед.<br>измер. | Фазы лактации      |                    |                    |                     |        |
|----------------------------------------|---------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|--------|
|                                        |               | 30дней<br>лактации | 60дней<br>лактации | 90дней<br>лактации | 115дней<br>лактации |        |
| Сено зл.-боб.мн.трав                   | кг            | 2,7                | 2,7                | 2,8                | 2,75                |        |
| Силос зл.-боб.мн.трав                  | кг            | 17                 | 17                 | 17                 | 20                  |        |
| Комбикорм                              | кг            | 8                  | 8                  | 8                  | 8                   |        |
| Корм.добавка "Бергафат"                | кг            | 0,125              | 0,125              | -                  | -                   |        |
| Корм.добавка "Сойпрот"                 | кг            | 0,150              | 0,300              | -                  | -                   |        |
| Конъюгированная лино-<br>левая кислота | кг            |                    |                    | 0,04               | 0,08                |        |
| В рационах содержалось:                |               |                    |                    |                    |                     |        |
| Обменная энергия                       | МДж           | 134,8              | 137,5              | 134,9              | 135,6               | 136,4  |
| Сухое вещество                         | кг            | 13,81              | 14,09              | 15,374             | 15,489              | 15,883 |
|                                        |               | 4                  | 4                  |                    |                     |        |
| Сырой протеин                          | г             | 1735               | 1770               | 1930               | 1940                | 1995   |
| Распадаемый протеин                    | г             | 990                | 1010               | 1100               | 1110                | 1135   |
| Нераспадаемый протеин                  | г             | 745                | 760                | 830                | 830                 | 860    |
| Сырая клетчатка                        | г             | 3100               | 3160               | 3450               | 3475                | 3565   |
| Крахмал                                | г             | 3870               | 3950               | 4300               | 3870                | 4445   |
| Сахар                                  | г             | 440                | 450                | 490                | 495                 | 508    |
| Сырой жир                              | г             | 360                | 366                | 400                | 403                 | 413    |
| Субстратная оценка рационов            |               |                    |                    |                    |                     |        |
| Сумма аминокислот                      | г             | 1076               | 1098               | 1197               | 1203                | 1238   |
| Ацетат                                 | г             | 2800               | 3040               | 3015               | 2840                | 2920   |
| Пропионат                              | г             | 1275               | 1285               | 1210               | 1290                | 1330   |
| Бутират                                | г             | 695                | 666                | 650                | 702                 | 726    |
| Сумма ВМЖК                             | г             | 280                | 285                | 312                | 314                 | 322    |
| Глюкоза                                | г             | 1215               | 1130               | 950                | 355                 | 960    |

Экспериментальные рационы были рассчитаны по периодам опыта с учетом обеспеченности обменной энергией и доступными для усвоения субстратами для поддержания высокого уровня молочной продуктивности.

*Таблица 2. Состав комбикормов, % по массе*

| Корма             | 1-й период (15-60) | 2-й период (60-90) |
|-------------------|--------------------|--------------------|
| Кукуруза          | 15                 | 20                 |
| Ячмень            | 39,75              | 30                 |
| Пшеница           | 18                 | 17                 |
| Соевый шрот       | 15                 | 22                 |
| Подсолнечный шрот | 7                  | 7                  |
| Жир (Бергафат)    | 1,25               | -                  |
| Премикс           | 1                  | 1                  |
| Соль поваренная   | 1,5                | 1,5                |
| Трикальций фосфат | 1,5                | 1,5                |

*Первый период – 15-60 дней лактации.* Субстратную оценку рационов проводили по методике, описанной ранее (Агафонов и др., 1995, 2004), в которой оценивали образование следующих конечных продуктов переваривания, доступных для всасывания:

- сумму аминокислот – по содержанию в рационах распадаемого и не-распадаемого в рубце протеина;
- количество ацетата, пропионата и бутирата – по их соотношению в рубцовой жидкости;
- количество высокомолекулярных жирных кислот – по содержанию их в рационе и переваримости липидов корма в желудочнокишечном тракте, с учётом дополнительного синтеза липидов микроорганизмами в преджелудках;
- количество глюкозы – по энергетическому эквиваленту глюкозы относительно остатка обменной энергии в рационе.

*Второй период – 60-90 дней лактации.* После проведения балансового опыта (с 60-го дня лактации) коровы получали в рационе обменный белок согласно уровню молочной продуктивности (100% обеспеченности, в основном за счёт подсолнечного и соевого шрота). При этом из рациона убрали добавку "защищенных жиров". Коровы получали ежедневно дополнительно к рациону 9-цис-11-транс-линолевую кислоту в количестве 40 и 80 г/гол/сутки.

Рационы коров в периоды 30, 60, 90 и 115 дней лактации содержали питательные вещества в соответствии с физиологическими потребностями. Субстратную оценку рационов проводили по разработанному расчётному методу (Агафонов, 2004). При этом решалась задача регулирования уровня мо-

билизации энергетических резервов и белка у коров в начальный период лактации при использовании кормовых добавок, восполняющих временный дефицит в рационах энергии, обменного белка, углеводов (Физиологические потребности..., 2001).

Балансовые опыты провели на коровах в периоды 55-60 и 85-90 дней лактации по методике Надальяка и соавт. (1986), респираторные исследования – масочным методом. Газоанализ в аппарате Холдена (ПАГ-4) и прямую калориметрию на калориметре ВА-08.

### **Результаты и обсуждение**

Одной из особенностей коров первого отёла является более длительная адаптация к потреблению необходимого количества корма. Если принять за исходную величину потребление сухого вещества корма в период 30 дней лактации, то к 60 дню лактации потребление возросло на 10,18% (табл. 1). Фактическое потребление валовой энергии корма у коров первой группы в период с 60 до 90 дней лактации возросло на 6,77%. Обменная энергия в используемых в эти периоды рационах оставалась на одном уровне, на фоне снижения уровня энергии в суточном удое к 90-дневному периоду – на 22,84% и одновременного повышения уровня теплопродукции – на 14,06% (табл. 3).

Лишь через 3 месяца лактации баланс энергии приближался к нулевому значению на фоне снижения калорийности суточного удоя (табл.3). Ввиду этих особенностей у новотельных коров-первотёлок резко снижается упитанность, вследствие значительной мобилизации резервного жира и белка. Поэтому были использованы различные кормовые добавки, снижающие мобилизацию резервного жира и белка у коров в период до 90 дней лактации. Для поддержания уровня молочной продуктивности в состав комбикорма вводили защищённый жир "Бергафат" в количестве 1,25% в первые 60 дней после отёла и белковую добавку "Сойпрот" в количестве 300 г/сутки, содержащую 140 г обменного белка. Таким образом, для поддержания удоя молока последовательно использовали энергетические, протеиновые и глюкогенные добавки, снижающие дефицит обменной энергии, протеина и глюкозы в начальный период лактации, когда животные не могут восполнить дефицит данных веществ за счёт традиционных кормовых средств, входящих в рационы (табл. 4).

**Таблица 3. Балансы энергии у лактирующих коров, МДж/сутки (n=3)**

| №№<br>коров      | Валвая<br>энергия<br>корма | Содер-<br>жалось<br>энергии<br>в кале | Энергия<br>переваримых<br>питательных<br>веществ | Энергия<br>метана и<br>теплота<br>фермен-<br>тации | Содер-<br>жалось<br>энергии<br>в моче | Обмен-<br>ная энер-<br>гия | Энергия<br>суточного<br>удоя | Тепло-<br>продукция | Баланс<br>энергии |
|------------------|----------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------------------|----------------------------------------------------|---------------------------------------|----------------------------|------------------------------|---------------------|-------------------|
| 60 дней лактации |                            |                                       |                                                  |                                                    |                                       |                            |                              |                     |                   |
| 2                | 325,6                      | 111,5                                 | 214,1                                            | 38,2                                               | 7,8                                   | 168,1                      | 60,2                         | 110                 | -2,1              |
| 3                | 269,5                      | 99,0                                  | 170,5                                            | 29,0                                               | 6,6                                   | 134,9                      | 58,9                         | 78,4                | -2,4              |
| 12               | 246,7                      | 73,8                                  | 172,9                                            | 29,4                                               | 6,0                                   | 137,5                      | 54,4                         | 82,7                | -9,6              |
| Сред-<br>нее     | 280,6±<br>16,2             | 94,8±<br>11,3                         | 185,8±<br>14,5                                   | 32,2±<br>1,1                                       | 6,8±<br>0,8                           | 146,8±<br>10,7             | 57,8±<br>1,8                 | 90,3±<br>9,8        | -4,7              |
| 90 дней лактации |                            |                                       |                                                  |                                                    |                                       |                            |                              |                     |                   |
| 2                | 337,2                      | 126,8                                 | 210,5                                            | 36,2                                               | 12,5                                  | 161,8                      | 45,3                         | 120,7               | -4,2              |
| 3                | 294,5                      | 122,5                                 | 172,0                                            | 29,2                                               | 11,0                                  | 132                        | 44,5                         | 86,6                | +0,9              |
| 12               | 266,9                      | 86,7                                  | 180,2                                            | 30,2                                               | 9,4                                   | 140,6                      | 43,9                         | 101,6               | -4,8              |
| Сред-<br>нее     | 299,6 ±<br>20,5            | 112,0<br>±<br>12,7                    | 187,6±<br>11,7                                   | 31,8±<br>2,2                                       | 10,9±<br>0,9                          | 144,9±<br>8,8              | 44,6±<br>0,7                 | 103,0±<br>9,9       | -2,7              |

Таблица 5. *Использование обменной энергии и субстратов в энергетическом обмене и на биосинтез*

| Показатели                                          | Ед.<br>изм.                     | Коровы по фазам<br>лактации |       |       | Влияние кормовых добавок |       |                      |       |                                           |       |
|-----------------------------------------------------|---------------------------------|-----------------------------|-------|-------|--------------------------|-------|----------------------|-------|-------------------------------------------|-------|
|                                                     |                                 | 30дн.                       | 60дн. | 90дн. | Сойпрот                  |       | Пропиленгли-<br>коль |       | 9-цис, 11-транс<br>линолевая ки-<br>слота |       |
|                                                     |                                 |                             |       |       | 150г                     | 300г  | 200г                 | 400г  | 40г                                       | 80г   |
| 1. Использование субстратов в энергетическом обмене |                                 |                             |       |       |                          |       |                      |       |                                           |       |
| Теплопродукция                                      | МДЖ                             | 73,3                        | 78,4  | 73,3  | 95,3                     | 85,4  | 91,6                 | 97,0  | 87,0                                      | 111,2 |
| Дыхательный<br>коэффициент                          | CO <sub>2</sub> /O <sub>2</sub> | 0,724                       | 0,798 | 0,820 | 0,903                    | 0,954 | 0,784                | 0,921 | 0,888                                     | 0,920 |
| Аминокислоты                                        | г                               | 475                         | 452   | 487   | 590                      | 686   | 750                  | 650   | 1000                                      | 1040  |
| Ацетат и глюкоза                                    | г                               | 385                         | 1473  | 1640  | 3660                     | 3895  | 1290                 | 4000  | 2470                                      | 4520  |
| ВМЖК и кетоно-<br>вые тела                          | г                               | 1450                        | 1197  | 974   | 692                      | 280   | 1430                 | 563   | 642                                       | 650   |
| 2. Субстратный фонд рационов                        |                                 |                             |       |       |                          |       |                      |       |                                           |       |
| Аминокислоты                                        | г                               | 1098                        | 1197  | 1203  | 1280                     | 1357  | 1203                 | 1250  | 1488                                      | 1240  |
| Ацетат                                              | г                               | 3040                        | 3015  | 2840  | 2800                     | 2850  | 3600                 | 3680  | 2920                                      | 2890  |
| ВМЖК                                                | г                               | 280                         | 312   | 315   | 320                      | 350   | 374                  | 388   | 322                                       | 308   |
| Глюкоза                                             | г                               | 1130                        | 900   | 950   | 800                      | 850   | 900                  | 950   | 770                                       | 960   |
| Пропионат                                           | г                               | 1285                        | 1210  | 1210  | 1290                     | 1290  | 1300                 | 1350  | 1520                                      | 1330  |
| Бутират                                             | г                               | 666                         | 650   | 655   | 650                      | 650   | 700                  | 705   | 980                                       | 726   |
| 3.Исползовалось на биосинтез                        |                                 |                             |       |       |                          |       |                      |       |                                           |       |
| Аминокислоты                                        | г                               | 623                         | 745   | 716   | 690                      | 671   | 453                  | 600   | 488                                       | 200   |
| Обменная энергия                                    | МДж                             | 61,5                        | 59,1  | 61,6  | 72,8                     | 72,8  | 70,2                 | 64,8  | 49,4                                      | 25,2  |

*Таблица 4. Величина суточного удоя и калорийность молока при включении в рацион кормовых добавок*

| Показатели                    | Кормовые добавки                                              |                                                                |                                                           |
|-------------------------------|---------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
|                               | 15-60 дн.лакт.,<br>"Бергафат" в составе комб., 1,25% по массе | 30-60 дн.лакт.,<br>"Бергафат"+<br>"Сойпрот" 300г с комбикормом | 60-90 дн.лакт.,<br>пропиленгликоль<br>400 г с комбикормом |
| Суточный удой, кг             | 19,0±0,6                                                      | 18,1±0,3                                                       | 17,8±0,5                                                  |
| Калорийность 1 кг молока, МДж | 2,936±0,030                                                   | 2,813±0,070                                                    | 2,935±0,107                                               |

Исходя из анализа данных табл. 5, в период до 2 месяцев лактации у коровы №2 при суточном удое 22,25кг молока синтез белка молока за счёт аминокислот корма не должен превышать 2,77% и, вероятно, в этот период лактации продолжалась мобилизация тканевых аминокислот на синтез белка молока. У коров №3 и №12 при суточном удое 20,1кг и 18,6кг молока поступление аминокислот с кормом полностью обеспечивало синтез молочного белка. Введение белковой добавки "Сойпрот" в комбикорм приводило к полному обеспечению синтеза белка молока за счёт протеина корма. Использование препарата пропиленгликоля для нормализации обмена веществ у лактирующих коров сопровождалось снижением обеспеченности синтеза белка молока за счёт обменного белка корма до 60-50% от потребности, что неизбежно повышало мобилизацию обменного белка из тканей организма.

Затраты энергии на биосинтез белка и других компонентов молока включены в общий показатель теплопродукции тканевого метаболизма. Однако для аминокислот, использованных в энергетическом обмене, фактическая калорийность была ниже на 25% по сравнению с аминокислотами, включёнными в белок молока, ввиду особенностей биологического окисления (группы  $\text{NH}_2$  не окисляются, а выводятся с мочой в виде мочевины). Поэтому при оценке содержания обменной энергии в аминокислотах необходимо по возможности дифференцировать их конечное использование (на энергетические нужды или на биосинтез).

Исходного количества всасывающихся пропионата и глюкозы было достаточно для синтеза лактозы, если учесть, что в энергетическом обмене глюкоза используется в ограниченном количестве (до 8-10% от суточной теплопродукции).

Примерно 50% калорийности молока связано с содержанием жира. Механизмы его синтеза с участием неэтерифицированных жирных кислот

крови (НЭЖК), а также ацетата,  $\beta$ -оксибутирата и других жирных кислот с короткой и средней углеродной цепью в настоящее время достаточно хорошо изучены (Медведев, 1978; Овчаренко, 1991). Однако сложность заключается в оценке фактической субстратной обеспеченности синтеза молочного жира и прогнозировании его качества. Так, на 30 дне лактации (корова №2) при удое 22,25 кг молока потребность на синтез жира молока складывалась из потребности на общий синтез жира молока, составляющей 800 г/сутки и потребности за счёт ВМЖК – 400 г/сутки. Потребность в коротко- и среднецепочечных жирных кислотах (ацетате,  $\beta$ -оксибутирате и других) для синтеза 400 г молочного жира оценить достаточно трудно. Исходя из фактического содержания в рационе ВМЖК – 280 г, при потребности 400 г обеспеченность синтеза составляла 70%, что компенсировалось за счёт мобилизации из жировых депо 120 г НЭЖК. Для синтеза остальных 400 г молочного жира было избыточное количество ацетата, бутирата и глюкозы.

Кормовая добавка "Сойпрот" уже в период 60-75 дней лактации снижала напряжённость в синтезе молочного жира, ограничивая мобилизацию резервного жира на синтез жира молока до 80 г/сутки. Существенно снижалась мобилизация резервного жира на энергетические цели. Однако при этом практически весь ацетат использовался в энергетическом обмене, что создало предпосылки для снижения синтеза жира молока в молочной железе за счёт ацетата,  $\beta$ -оксибутирата и других жирных кислот с короткой и средней длиной углеродной цепи – до  $C_{10}$ - $C_{14}$ .

Следует обратить внимание на обоснование способов расчёта баланса субстратов у лактирующих коров. Имеющихся шести показателей оценки субстратного фонда рационов недостаточно для объективного их распределения в общем балансе на уровне целостного организма. Если в энергетическом обмене субстраты используются в универсальных циклах (гликолиз, цикл Кребса), что облегчает их количественный учёт, то в процессах биосинтеза компонентов молока (молочного жира, лактозы, белков молока и др.) исходные субстраты многократно трансформируются и уже в виде метаболитов включаются в сложные молекулы белка и жира молока. В настоящее время нет единого мнения по количественной оценке синтеза компонентов молока. Наиболее приемлемой оказалась точка зрения, что на синтез 1 г белка молока требуется исходных 1,7-2,3 г аминокислот, а на синтез 1 г молочного жира требуется в 1,3-1,5 больше исходных метаболитов в виде ацетата, НЭЖК и глюкозы (Медведев, 1978; Овчаренко, 1991). Более понятной представлена потребность в глюкозе на синтез лактозы при условии, если известна доля глюкозы, образующейся из пропионата (Davis, 1985; Sutton, 1985).

В табл. 5 представлены расчетные данные по затратам субстратов в энергетическом обмене. В первые 2 месяца лактации минимальный уровень энергозатрат обеспечивается использованием для этих целей резервного жира (ВМЖК и кетонных тел). Использование в рационах протеиновой добавки (300г "Сойпрота") приводило к существенному снижению включения ВМЖК в энергетический обмен на фоне максимального использования ацетата и аминокислот. Пропиленгликоль в дозе 400г/сутки по механизму действия на энергетический обмен не отличался от "Сойпрота". Линолевая кислота вызывала максимальное включение аминокислот, ацетата и ВМЖК в энергетический обмен на фоне снижения уровня молочной продуктивности коров и калорийности единицы молочной продукции.

Таким образом, сопоставляя затраты обменной энергии и вклад окисления отдельных групп субстратов в теплопродукцию с объемами всасывания конечных продуктов переваривания, мы выходим на оценку составляющих обеспеченности синтеза компонентов молока у коров:

- при высоком уровне использования в энергетическом обмене высокомолекулярных жирных кислот можно прогнозировать снижение содержания жира в молоке, что наблюдалось у коров №2, 3 и 12; введение в состав комбикорма энергетической добавки "Бергафат" решает проблему снижения мобилизации резервного жира, что предотвращает резкое понижение содержания жира в молоке;
- сочетание энергетической добавки "Бергафат" с протеиновой добавкой "Сойпрот" позволяет удерживать уровень молочной продуктивности коров и качество молока по содержанию молочного жира, белка и энергии;
- продуктивное действие пропиленгликоля на молочную продуктивность не является первичным. Нормализация обмена веществ сопровождалась повышенным использованием в энергетическом обмене аминокислот, что осложняет синтез белка молока и может сопровождаться снижением его содержания в молоке;
- механизм действия 9-цис-11транс линолевой кислоты связан с изменением синтеза жирных кислот молока непосредственно в молочной железе. Продуктивным положительным эффектом данный изомер линолевой кислоты не обладает. Её применение в составе комбикорма сопровождается существенным обеднением возможности синтеза белка молока и, вероятно, лактозы.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Агафонов В. И. Нормирование энергии у жвачных животных по принципу субстратной обеспеченности метаболизма. Докл. II Межд. конф. (5-8 сентября 1995г), Боровск, 1995: 36-44.
2. Агафонов В. И., Решетов В.Б., Лазаренко В.П. и др. Обоснование норм потребности коров в энергетических субстратах. Труды ВНИИФБиП с.-х. жив. Боровск, 2004, 43: 92-103.
3. Медведев И. К. О биосинтезе и секреции белков и жира молока у жвачных животных. Дисс.... д.б.н., Боровск, 1978: 47с.
4. Методы исследования питания сельскохозяйственных животных. Боровск, ВНИИФБиП, 1998: 405 с.
5. Надаляк Е.А., Агафонов В.И., Решетов В.Б. и др. Изучение обмена энергии и энергетического питания у сельскохозяйственных животных. Методические указания. Боровск, 1986: 56 с.
6. Нормы и рационы кормления сельскохозяйственных животных. Справочное руководство. Под ред. акад. А.П. Калашникова, В.И. Фисинина, проф. В.В Щеглова. М., 2003: 456 с.
7. Овчаренко Э.В. Физиологические основы питания и молокообразования у коров в рвний период лактации в связи с уровнем и качеством энергии и протеина в рационе. Дисс... д.б.н., Боровск, 1991: 48 с.
8. Физиологические потребности в питательных веществах и нормирование питания молочных коров. Под редакцией д.б.н. Харитонов Е.Л. Боровск, ВНИИФБиП, 2001: 126 с.
9. Харитонов Е.Л., Агафонов В.И., Харитонов Л.В., Матвеев В.А. Практическая проверка усовершенствованных норм питания лактирующих коров. Труды ВНИИФБиП. Боровск, 2006, 45: 19-32.
10. Davis S.R. Collier R.Y. Mammary blood flow and regulation of substrate supply for milk synthesis. J. Dairy Sci., 1985, 68, 54: 1041-1058.
11. Honing Y .van. Perspectives of future feed information based on energy and nutrients availability. Energ. Feed Evaluation and energy Metabolism in Farm Animals. Int. Symp. Rostok, 1998: 15.
12. Spordly R. Aspects on ration formulation based on a substrate system \ Norweg. I. Agric. Ski. 1990. 5: 83-87.
13. Sutton I.D. Digestion and absorption of energy substrates in the lactating cows. Dairy Sci., 1985, 68, 12: 3376 – 3393.

**Труды Всероссийского научно-исследовательского института физиологии,  
биохимии и питания сельскохозяйственных животных.**  
Сборник экспериментальных статей. Боровск, 2007, т.46, 180с

*Утверждено к печати Ученым советом ВНИИ физиологии,  
биохимии и питания с.-х. животных.*

|                            |                 |
|----------------------------|-----------------|
| Редактор издания           | В.Д. Кальницкая |
| Компьютерная верстка       | Л.Л. Полякова   |
| Полиграфическое исполнение | А.В. Бочаров    |

Издательство ВНИИ физиологии, биохимии и питания  
сельскохозяйственных животных.  
Формат 60х90/16 Объем 15,0 п. л. Тираж 100 экз.

---

249013 Калужская обл., г. Боровск, ВНИИФБиП с.-х. животных  
тел. 996-34-15