

М. А. ТЕР-КАРАПЕТЯН, Т. Г. АРУТЮНЯН, Г. А. СЕМЕРДЖЯН

ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ СОДЕРЖИМОГО РУБЦА  
ЖВАЧНЫХ ЖИВОТНЫХ НА ЖИДКУЮ ФАЗУ  
(БЕСКЛЕТОЧНЫЙ ЦЕНТРИФУГАТ), СУММАРНУЮ  
БАКТЕРИАЛЬНУЮ И ИНFUЗОРНУЮ ФРАКЦИИ

Направленность и интенсивность переваривания кормов в пищеварительном тракте жвачных животных обусловлены участием разнообразной микрофлоры рубца, ее многосторонней деятельностью и взаимоотношениями (симбиоз, антагонизм) между представителями отдельных групп микроорганизмов (в основном бактерии и простейшие).

Методы изучения процессов пищеварения в рубце, в частности роли микроорганизмов, разделяются на две основные группы: синтетические и аналитические.

Синтетические методы изучают действие всей микрофлоры на отдельные корма или рационы как у интактного животного—носителя хронической фистулы (*in vivo*), так и путем инкубирования (*in vitro*) определенного объема содержимого рубца в специальных непроницаемых [5, 8, 13, 16, 19] или полупроницаемых [1, 2, 15] системах — «искусственный рубец», где созданы условия для контроля и регулирования основных факторов, определяющих направленность естественного процесса. При этом сопоставление данных химического и микробиологического анализов выявит имеющуюся коррелятивность между развитием микрофлоры в целом или отдельных ее представителей и химическими превращениями, происходящими в рубце.

Аналитические методы изучают действия групп [3, 4, 6, 9—12, 14, 17, 18, 24] или отдельных представителей [7, 20—23] микрофлоры, выделенных из содержимого рубца в виде «отмытых суспензий», в естественных средах (бесклеточный центрифугат содержимого рубца в чистом виде или в смеси с экстрактами кормовых растений) или в искусственных моделированных средах с субстратами определенного состава.

Последняя группа методов, которая является весьма ценной для изучения тонких механизмов, лежащих в основе метаболизма микроорганизмов рубца, не позволяет изучать процессы взаимоотношения как между отдельными представителями микрофлоры, так и микрофлоры в целом с животным-хозяином.

Исходя из вышеизложенного, при применении той или иной группы методов на практике возникает необходимость фракционировать целое содержимое рубца на жидкую фазу, содержащую все экстрактивные

части кормов, секреты животного (слюна и др.), продукты жизнедеятельности микроорганизмов и микрофлору (бактерии, простейшие, грибковые организмы). В свою очередь микрофлору целесообразно разделить на суммарные фракции бактерий и инфузорий, а при проведении более подробных исследований выделить из каждой фракции отдельные группы или представителей разных родов, видов и т. д.

Несмотря на важность вопроса комплексного изучения процессов пищеварения в рубце, методы для фракционирования его содержимого недостаточно разработаны.

Нами разработана доступная схема фракционирования, позволяющая разделить содержимое рубца на жидкую фазу (бесклеточный центрифугат), отдельные суммарные фракции бактерий и инфузорий. Отделение остатков кормов из содержимого рубца, как показала практика фракционирования, является довольно трудоемкой процедурой и связано с большими потерями. Поэтому для оценки прогресса пищеварительного процесса на данном этапе более удобно количество и химический состав непереваримых остатков кормов определять по разнице соответствующих показателей между твердыми остатками (корм + бактерии + инфузории /к+б+и/) и суммой бактерий и инфузорий.

Применение этой схемы позволяет изучить не только динамику превращения каждой фракции, но и представляет особый интерес для установления баланса реакций пищеварения в рубце и оценки эффективности синтеза инфузорного и бактериального белка, имеющего высокую биологическую ценность в питании жвачных животных.

**Постановка опыта.** Подопытными животными служили овцы 2—3-летнего возраста местной породы Арагац весом в среднем 30—40 кг. Было исследовано 10 голов овец, несущих хронические фистулы на рубце. Опыты проводились круглогодично, кроме летнего периода.

**Рацион.** В период опытов животные кормились люцерновым или луговым сеном лучшего качества, между опытами животные получали в сутки по 1 кг сена и 200—250 г комбикорма. За 10 дней до отбора опытных проб животные вновь кормились исключительно сеном. Условия кормления менялись в зависимости от цели опыта. При выделении одной фракции содержимого рубца одного срока животное скармливали нормально—два раза в сутки, при одновременном разделении составных частей содержимого рубца из одной пробы в разные сроки после кормления животное скармливали один раз люцерновым сеном в количестве 1 кг, а также один раз давалась вода (произвольно); через 3 ч. после скармливания остаток воды и корма удалялся.

**Порядок отбора проб.** Отбор проб производили через рубцовую фистулу длиной стеклянной трубкой диаметром в 10 мм путем всасывания содержимого рубца из разных мест и глубин. Пробы брались в суточной динамике: натошак и через 3, 6, 9 ч. после скармливания. Время от начала взятия проб и до приступления к обработке доводилось до минимума, с целью избежать возможные изменения в составе содержимого рубца. Это особенно необходимо при выделении инфузорной и



(к+б+и) и по 100 мл—для выделения бактерий, инфузорий и инфузорной фракции *Oligotricha*.

**Получение жидкой фазы и твердых компонентов.** Содержимое рубца (50 мл) сейчас же подвергалось центрифугированию с охлаждением при 16000 об/мин. При этом в осадке получали все твердые части—осколки кормов и микроорганизмов. Чистоту прозрачной жидкой фазы—надосадка—проверяли микроскопически на отсутствие клеточных элементов.

**Выделение бактериальной фракции.** Содержимое рубца (100 мл) пропускалось через 4-кратно сложенную марлю. Остаток на марле промывался физиологическим раствором (200—300 мл) при интенсивном перемешивании стеклянной палочкой. Отфильтрованную жидкость с промывными водами центрифугировали при 1—2000 об/мин в течение 3-х мин, отделяя мелкие осколки корма и инфузории. Оставшуюся в надосадке бактериальную суспензию центрифугировали при 16000 об/мин для осаждения бактериальной фракции. Полноту осаждения проверяли микроскопически. До анализа биомассу бактерий промывали 2—3 раза физиологическим раствором, затем дистиллированной водой и, доводя массу до определенного объема (10 мл), приступали к аналитическим исследованиям.

При таких условиях опыта не исключаются как потери бактерий, так и их загрязненность, что, по нашему мнению, составляет не более 5—8%.

**Выделение суммарной инфузорной фракции [12].** Содержимое рубца (100 мл) пропускалось через 4-кратно сложенную марлю. Микроскопические исследования показали, что на частицах корма при фильтрации остается огромное количество инфузорий. Для более или менее полного их отделения осадок на марле промывался ацетатным буфером (200—300 мл) с прибавлением глюкозы—4—5 г/л. Суспензия инфузорий в делительной воронке ставилась в термостат при 37°C в течение 1—2 ч. Прибавленная глюкоза способствовала активным ферментативным процессам, благодаря чему выделенные газы поднимали мелкие осколки корма, а инфузории белым слоем оседали на дно делительной воронки. После отделения осевших инфузорий верхняя часть жидкости с осколками корма тщательно встряхивалась и вновь помещалась в термостат для оседания оставшихся инфузорий. Отделение повторялось 2—3 раза. Собранный слой инфузорий 8—10 раз промывался ацетатным буфером декантацией. В результате таких промываний нам удалось получить слой, загрязненный осколками корма, что составляет 3—5%. Каждый раз проводилось микроскопическое исследование на отсутствие микроорганизмов в надосадочной жидкости. Нам кажется, что загрязненность бактериями более или менее исключается благодаря повторным промываниям. В отделенной таким способом инфузорной фракции нам удалось выделить не только роды *Isotricha*, *Dasytricha* из *Holotricha*, но и *Ophryoscolex*, *Metadinium*, *Entodinium* из *Oligotricha*.

**Выделение инфузорной фракции *Oligotricha* (малоресничные) [25].** Содержимое рубца (100 мл) пропускалось через 8-кратно сложенную марлю. Остаток на марле промывался фосфатным буфером (200—300 мл). Делительная воронка с фильтратом и промывными водами ставилась в термостат при 37°C в течение 1 час. За это время малоресничные, главным образом *Ophryoscolex* и *Metadinium*, оседали на дне делительной воронки серовато-белым слоем. Оседание малоресничных обусловлено большим удельным весом и малоподвижностью. Отделенная инфузорная фракция *Oligotricha* промывалась (5—6 раз) фосфатным буфером декантацией до очищения. В результате таких промываний нам удалось получить слой, загрязненный осколками корма, что составляет 8—10%.

Пробовалось также выделить малоресничные инфузории тем же буфером, но с добавлением мальтозы, которая хорошо усваивается *Oligotricha*. Усвоение мальтозы приводит к накоплению полисахарида в теле *Oligotricha*, в результате чего отяжелевшие клетки оседают на дно воронки, а выделившиеся газы способствуют поднятию осколков корма. Препарат частично загрязнен инфузориями *Isotricha*.

Результаты фракционирования, полученные при применении вышеуказанной схемы, выражены сухими весами отдельных фракций в 100 мл и в абсолютном сухом весе содержимого рубца. (табл. 1, 2).

В приведенной табл. 1 при сравнении данных целого содержимого рубца с таковыми, полученными суммированием сухих веществ отдельных фракций обнаруживается разница, которая в абсолютном значении колеблется в пределах  $\pm 7$ . Такая разница в условиях предложенной схемы, когда сочетается несколько приемов по фракционированию и многократные промывания, по нашему мнению, допустима.

Сухие веса суммарной инфузорной фракции и фракций малоресничных, равноресничных представлены в табл. 3. Фракция малоресничных составляет 49,1—65,1% (табл. 4, гр. 5), а равноресничные—34,9—50,9% (табл. 4, гр. 7) в суммарной инфузорной фракции.

Приведенные в табл. 2 и 4 данные выражают весовую долю микроорганизмов, жидкой фазы и остатков корма содержимого рубца: для бактерий между 3,2 и 6,0% (табл. 2, гр. 4), для суммарной инфузорной фракции между 4,5—6,1% (табл. 2, гр. 5) и 4,0—6,9% (табл. 4, гр. 3), а для малоресничных—*Oligotricha*—между 2,1—3,1% (табл. 4, гр. 4).

Данные табл. 1 показывают, что суммирование фракций, определенных в отдельности, дает количества сухих веществ, близкие к таковым, определенным прямым путем. Это обуславливает значительную достоверность метода фракционирования.

Вышеизложенная схема применяется в нашей лаборатории как способ для дальнейшего фракционирования бактерий и инфузорий на подфракции, содержащие отдельные роды.

Следующим этапом приведенной схемы является выделение фракции остатков кормов в чистом (от бактерий, инфузорий) виде для пря-

Таблица 1

Сухие вещества целого содержимого рубца и отдельных его фракций  
Данные выражены в г на 100 мл содержимого рубца

|   | Фракция содержимого рубца                                            | Время отбора проб |      |      |      |                    |      |      |      |                     |      |      |      |
|---|----------------------------------------------------------------------|-------------------|------|------|------|--------------------|------|------|------|---------------------|------|------|------|
|   |                                                                      | 28.V.1964, овца 4 |      |      |      | 26.XI.1964, овца 5 |      |      |      | 29.XII.1964, овца 5 |      |      |      |
|   |                                                                      | 9                 | 12   | 15   | 18   | 9                  | 12   | 15   | 18   | 9                   | 12   | 15   | 18   |
| 1 | Содержимое рубца . . . . .                                           | 8,4               | 4,6  | 5,2  | 6,2  | 5,9                | 5,7  | 4,9  | 4,3  | 6,0                 | 4,3  | 4,5  | 4,5  |
| 2 | Бесклеточный центрифугат (ц) . . . . .                               | 1,2               | 1,6  | 1,4  | 1,3  | 0,5                | 1,3  | 1,0  | 1,1  | 1,4                 | 1,8  | 1,7  | 1,3  |
| 3 | Твердые остатки содержимого рубца (к+б+и) . . . . .                  | 7,2               | 2,9  | 3,7  | 4,8  | 4,7                | 4,3  | 4,2  | 3,0  | 4,7                 | 2,4  | 3,0  | 3,2  |
| 4 | Бактериальная фракция (б) . . . . .                                  | 0,24              | 0,22 | 0,25 | 0,30 | 0,10               | 0,10 | 0,22 | 0,23 | 0,30                | 0,26 | 0,25 | 0,28 |
| 5 | Инфузорная фракция (и) . . . . .                                     | 0,30              | 0,23 | 0,28 | 0,29 | 0,18               | 0,19 | 0,27 | 0,26 | 0,43                | 0,33 | 0,34 | 0,38 |
| 6 | Остатки кормов (к), [з-(4+5)] . . . . .                              | 6,66              | 2,45 | 3,13 | 4,31 | 4,42               | 4,01 | 3,71 | 2,51 | 3,97                | 1,81 | 2,21 | 2,54 |
| 7 | Сумма к+б+и+ц . . . . .                                              | 8,4               | 4,5  | 5,1  | 6,2  | 5,2                | 5,6  | 5,2  | 4,1  | 6,1                 | 4,2  | 4,7  | 4,5  |
| 8 | Абс. разница между целым содержимым рубца и суммой к+б+и+ц . . . . . | 0                 | -0,1 | -0,1 | 0    | -0,7               | -0,1 | +0,3 | -0,2 | +0,1                | -0,1 | +0,2 | 0    |

Таблица 2

Доля сухих веществ отдельных фракций в сухих веществах содержимого рубца  
По средним данным табл. 1.

|   | Фракции содержимого рубца                                            | Время отбора проб |       |       |       |
|---|----------------------------------------------------------------------|-------------------|-------|-------|-------|
|   |                                                                      | 9                 | 12    | 15    | 18    |
| 1 | Содержимое рубца* . . . . .                                          | 6,52              | 4,66  | 4,78  | 4,74  |
| 2 | Бесклеточный центрифугат (ц) . . . . .                               | 16,8              | 32,7  | 28,8  | 25,3  |
| 3 | Твердые остатки содержимого рубца (к+б+и) . . . . .                  | 79,8              | 56,2  | 74,2  | 77,2  |
| 4 | Бактериальная фракция (б) . . . . .                                  | 3,2               | 4,5   | 5,0   | 6,0   |
| 5 | Инфузорная фракция (и) . . . . .                                     | 4,7               | 4,5   | 5,4   | 6,1   |
| 6 | Остатки кормов (к) [з-(4+5)] . . . . .                               | 71,7              | 47,2  | 63,6  | 65,0  |
| 7 | Сумма к+б+и+ц . . . . .                                              | 96,7              | 88,9  | 103,0 | 102,5 |
| 8 | Абс. разница между целым содержимым рубца и суммой к+б+и+ц . . . . . | -3,3              | -11,1 | +3,0  | +2,5  |

\* Приравнены к 100.

Таблица 3

Сухие вещества инфузорных фракций (суммарная, Oligotricha и Isotricha)  
Данные выражены в г на 100 мл содержимого рубца

| Дата и № животного   | Фракции инфузорий | Время отбора проб |       |       |       |
|----------------------|-------------------|-------------------|-------|-------|-------|
|                      |                   | 9                 | 12    | 15    | 18    |
| 25/III—1965<br>ов. 5 | суммарная         | 0,219             | 0,127 | 0,170 | 0,180 |
|                      | Oligotricha       | 0,160             | 0,103 | 0,084 | 0,084 |
|                      | *Isotricha        | 0,053             | 0,053 | 0,067 | 0,096 |
| 29/III—1967<br>ов. 6 | суммарная         | 0,310             | 0,261 | 0,253 | 0,456 |
|                      | Oligotricha       | 0,173             | 0,129 | 0,154 | 0,225 |
|                      | *Isotricha        | 0,137             | 0,132 | 0,099 | 0,231 |
| 12/IV—1967<br>ов. 6  | суммарная         | 0,373             | 0,277 | 0,264 | 0,541 |
|                      | Oligotricha       | 0,194             | 0,133 | 0,145 | 0,256 |
|                      | *Isotricha        | 0,179             | 0,144 | 0,119 | 0,285 |
| 27/IV—1967<br>ов. 7  | суммарная         | 0,247             | 0,246 | 0,242 | 0,371 |
|                      | Oligotricha       | 0,152             | 0,126 | 0,164 | 0,199 |
|                      | *Isotricha        | 0,095             | 0,120 | 0,078 | 0,178 |

\* Разность между суммарной фракцией и Oligotricha.

Таблица 4

Доля сухих веществ инфузорных фракций (суммарная, Oligotricha, Isotricha)  
в сухих веществах содержимого рубца  
По средним данным табл. 2

| Время отбора проб | Содержимое рубца | *Суммарная фракция | Фракции инфузорий         |                           |                           |                           |
|-------------------|------------------|--------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
|                   |                  |                    | Oligotricha               |                           | Isotricha                 |                           |
|                   |                  |                    | % в с/в содержимого рубца | % в с/в суммарной фракции | % в с/в содержимого рубца | % в с/в суммарной фракции |
| 1                 | 2                | 3                  | 4                         | 5                         | 6                         | 7                         |
| 9                 | 6,75             | 4,3                | 2,8                       | 65,1                      | 1,5                       | 34,9                      |
| 12                | 5,65             | 4,0                | 2,1                       | 52,5                      | 1,9                       | 47,5                      |
| 15                | 5,40             | 4,3                | 2,6                       | 60,5                      | 1,7                       | 39,5                      |
| 18                | 6,02             | 6,9                | 3,1                       | 49,1                      | 3,2                       | 50,9                      |

\* Приравнены к 100.

мого определения хода переваривания белков, углеводов и других компонентов кормов.

Ереванский государственный университет,  
кафедра биохимии

Поступило 23.V 1969 г.

Մ. Ա. ՏԵՐ-ԿԱՐԱՊԵՏՅԱՆ, Տ. Գ. ՀԱՐՈՒԹՅՈՒՆՅԱՆ, Հ. Հ. ՍԵՄԵՐՋՅԱՆ

**ՈՐՈՃՈՂ ԿԵՆԴԱՆԻՆԵՐԻ ԿՏՐԻՉԻ ՊԱՐՈՒՆԱԿՈՒԹՅԱՆ ԲԱԺԱՆՈՒՄԸ  
ԲԱԿՏԵՐԻԱԼ ԵՎ ԻՆՖՈՒԶՈՐ ԳՈՒՄԱՐԱՅԻՆ ՖՐԱԿՑԻԱՆԵՐԻ ՈՒ  
ՀԵՂՈՒԿ ՖԱՋԻ ԲՋՋԱԶՈՒՐԿ ՑԵՆՏՐԻՖՈՒԳԱՏԻ**

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Կտրիչում տեղի ունեցող մարսողության պրոցեսներն ուսումնասիրելու նպատակով մշակվել է մատչելի մի սխեմա, որը հնարավորություն է տալիս բաժանելու կտրիչի պարունակությունը հեղուկ ֆազի (բջջազուրկ ցենտրիֆուգատի) և բակտերիալ ու ինֆուզոր զոմարային ֆրակցիաների:

Այս սխեմայի կիրառումը հնարավորություն է տալիս ուսումնասիրելու կտրիչի պարունակության բաղադրամասերի փոխարկումները օրվա ընթացքում: Այն որոշակի հետաքրքրություն է ներկայացնում նաև կտրիչում նյութափոխանակության ռեակցիաների բալանսի հաստատման և որոճող կենդանու սննդառության գործում բարձր կենսաբանական արժեք ունեցող բակտերիալ և ինֆուզոր սպիրտակուցների սինթեզի էֆեկտիվության գնահատման համար:

**Л И Т Е Р А Т У Р А**

1. Бобылев А. К. Докл. Моск. с/х акад. им. К. А. Тимирязева, вып. 78, 1962.
2. Давэ́й Л. С/х за рубежом. Животноводство, 9, 1961.
3. Руководство по кормлению и обмену веществ с/х животных, т. III, М., 1937.
4. Blackburn T. H., Hobson P. N. J. Gen. Microbiol. **22**, 273, 1960.
5. Burroughs W., Latona A., de Paul P. & al. J. Anim. Sci. **10**, 3, 1951.
6. Coleman G. S. J. Gen. Microbiol. **22**, 555, 1960.
7. Clarke T. Y. J. Gen. Microbiol. **33**, 3, 1963.
8. Fine L. R., Keith C. L., Bartleu E. E., Hartman P. A., Jacobson N. J. Anim. Sci. **21**, 4, 1962.
9. Gutierrez J. Biochem. J. **60**, 3, 1955.
10. Heald P. J. Brit. J. Nutr. **5**, 84, 1951.
11. Heald P. J., Oxford A. E., Sugden B. Nature **169**, 1055, 1952.
12. Heald P. J., Oxford A. E. Biochem. J. **53**, 506, 1953.
13. Huhtanen C. N., Elliot R. F., J. Anim. Sci. **4**, 15, 1956.
14. Hungate R. E. Bact. Rev. **14**, 1, 1950.
15. Louw J. G., Harold H., Williams P., Maynard L. A. Science **110**, 7, 1949.
16. Marston H. R. Biochem. J. **42**, 564, 1948.
17. McNaught M. L., Smith J. A., Henry K. M., Kon S. K. Biochem. J. **46**, 32, 1950.
18. McNaught M. L., Owen E. C., Henry K. M., Kon S. K. Biochem. J. **56**, 1, 1954.
19. Pearson R. M., Smith J. A. Biochem. J. **37**, 148, 1943.
20. Purser D. B., Tompkin R. B. Life Sciences **4**, 1493, 1965.
21. Quinn L. J. Appl. Microbiol. **10**, 6, 1962.
22. Sugden B., Oxford A. E. J. Gen. Microbiol. **7**, 145, 1952.
23. Sugden B. J. Gen. Microbiol. **9**, 44, 1953.
24. Weller R. A. Austral. J. Biol. Sci. **10**, 3, 1957.
25. Williams P. P., Davis R. E., Doetsch R. N., Gutierrez J. Appl. Microbiol. **9**, 405, 1961.

