

**МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА И
ПРОДОВОЛЬСТВИЯ РБ**

УО «Гродненский государственный аграрный университет»

Кафедра акушерства и терапии

**МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИССЛЕДОВАНИЮ
СОДЕРЖИМОГО РУБЦА У КОРОВ**

для студентов 6 курса факультета ветеринарной медицины
(специальность I-74 03 02 «Ветеринарная медицина»)
заочной формы получения образования

Авторы: Сенько А.В., Воронов Д.В.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ СОДЕРЖИМОГО РУБЦА

Взятие содержимого рубца и подготовка для анализов. Содержимое рубца у интактных животных берут при помощи ротоглоточных и носоглоточных зондов; при необходимости его берут путем пункции вентрального мешка рубца. Экспериментально процессы пищеварения в преджелудках изучают на животных с фистулами. В последние годы сконструирован искусственный рубец, что дает возможность изучать ферментативные процессы *in vitro*. Зонд Черкасова предназначен для выведения газов и промывания рубца и малопригоден для получения его содержимого. У взрослого крупного рогатого скота содержимое рубца берут резиновыми или полихлорвиниловыми шлангами длиной 200—250 см и наружным диаметром 20—40 мм. На 15—20-сантиметровом отрезке переднего конца такого шланга делают небольшие отверстия на случай закупорки основного хода. В странах Западной Европы изготавливают ряд ротоглоточных зондов различной модификации, используемых для получения проб рубцового содержимого. Для зондирования рубца овец, коз и молодняка крупного рогатого скота можно использовать выпускаемые медицинской промышленностью желудочные зонды длиной 120—150 см, наружным диаметром около 15 мм.

Мягкой трубкой зондируют через деревянный зевник, отверстие которого несколько больше диаметра зонда. Нажимая пальцами на массетеры, зевник вставляют как можно ближе к углу рта и фиксируют его за рогами тесемками. Предварительно смазанный вазелиновым маслом рубцовый конец зонда вводят на корень языка и осторожно продвигают в пищевод, слегка двигая вперед и назад для того, чтобы вызвать у животного акт глотания. При попадании зонда в трахею животное беспокоится и кашляет. В этом случае зонд следует немного вытянуть и придать ему пищеводное направление. При попадании зонда в рубец ощущается запах содержимого или оно вытекает. Для лучшего извлечения рубцового содержимого голову животного необходимо максимально опустить вниз, массировать левую голодную ямку и подвигать зондом вперед и назад. Можно содержимое рубца откачивать с помощью вакуумного насоса Камовского в колбу Бунзена. У молодняка крупного и мелкого рогатого скота содержимое извлекают, присоединив к зонду шприц Жанэ.

При необходимости небольшое количество содержимого рубца можно получить путем пункции его вентрального мешка. Прокол делают на стоячем животном краниальнее левой коленной складки иглой для аортопункции. Жидкость отсасывают с помощью шприца.

У животных с фистулами рубца содержимое берут металлической трубкой длиной около 1 м и диаметром отверстия 0,5 см. Трубку вводят через фистулу в вентральный мешок рубца. Для отсасывания содержимого используют шприц Жанэ, присоединенный к трубке.

Для поддержания температуры и сохранения активности микрофлоры содержимого рубца его целесообразно отбирать в термос. Во время исследований содержимое рубца хранят при комнатной температуре (20—22 °С) не более 9 ч, а в холодильнике — не более 1 сут. При транспортировке из хозяйств пробы необходимо помещать в термос со льдом. Для предупреждения лизиса простейших и бактерий пробы консервируют 10%-ным раствором формалина (5—6 капель на 20 мл содержимого рубца). Для определения летучих жирных кислот, лактата, аминокислот, биогенных аминов, ионов (Cl^+ , Na^+ , K^+ и др.) рубцовое содержимое можно хранить в замороженном состоянии около 6 мес. Аммиак следует определять в свежем содержимом. Перед использованием пробы фильтруют через 2—4 слоя марли.

6.1. ОРГАНОЛЕПТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Органолептическое исследование содержимого рубца проводят сразу же после его получения непосредственно в хозяйстве. При этом определяют запах, цвет, осадок, флотацию.

Цвет. У здоровых животных цвет содержимого рубца зависит от потребляемого корма. В большинстве случаев оно от серо-зеленого до коричнево-зеленого цвета, во время выпаса или при кормлении сеном — бурого или коричнево-зеленого, при скармливании жома — серого, кукурузного силоса и соломы — желто-коричневого цвета. Темно-коричневый или темно-зеленый цвет свидетельствуют о застое или гниении содержимого рубца. При остром ацидозе рубца содержимое его молочно-серого, а при хроническом ацидозе — молочно-коричневого цвета.

Консистенция. Содержимое рубца слабовязкой (тягучей) консистенции, которая при нарушении пищеварения может становиться водянистой, пенистой или вязкой (густой). Водянистая консистенция указывает на понижение ферментативных процессов в преджелудках и развитие острого ацидоза. При тимпании содержимое рубца пенистое. Вязкая консистенция отмечается при хроническом ацидозе рубца, но может быть и вследствие попадания большого количества слюны в пробу содержимого.

Запах. У здоровых животных запах содержимого рубца специфический, ароматный и зависит от рациона. Резкий запах может быть при кормлении зеленой травой, свеклой, капустой, силосом. Запах тухлых яиц или аммиачный отмечают при гниении содержимого. Затхлый или иного рода неприятный запах — результат снижения активности микрофлоры и ферментативных процессов в рубце. Кисловатый запах характерен для хронического ацидоза рубца, а резко кислый — для острого ацидоза. Затхлый и кисловатый запахи возможны при попадании содержимого сычуга в преджелудки вследствие нарушения его проходимости и при антиперистальтике.

Осадок и флотация. Свежее содержимое рубца наливают в стеклянный цилиндр или стакан, отмечая время осаждения и флотации. В содержимом рубца здоровых животных значительная часть переваренного корма осаждается (осадок), а грубые непереваренные с пузырьками газа (брожение) компоненты поднимаются на поверхность и собираются в виде плавающей прослойки (флотация).

Оценивая образования осадка и флотации, необходимо отметить начало первой осадочной и флотационной фазы. При нормальном пищеварении в преджелудках и в зависимости от типа рациона и времени последнего кормления осаждение и флотация в большинстве случаев завершаются через 4—10 мин. В случаях нарушения пищеварения и водянистой консистенции содержимого ускоряется выпадение осадка, а флотация задерживается или отсутствует. Это наблюдают при инактивации микрофлоры, анорексии или недостаточном кормлении. Быстрый осадок без флотации характерен для ацидоза рубца, задержка осаждения и флотации — следствие застоя, гниения содержимого рубца и пенистой тимпаниии.

6.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ pH

Реакция среды рубца — важный показатель, который определяет состояние ферментативных процессов, образование метаболитов, их всасывание и использование в организме. Характеризуется реакция среды концентрацией ионов водорода, или водородным показателем. Величина pH — отрицательный логарифм концентрации ионов водорода. Это означает, что для 0,1 ммоль/л раствора какой-либо сильной кислоты pH равен 1, для чистой воды — 7, для 0,1 ммоль раствора сильной щелочи — 13. Соответственно кислая реакция определяется концентрацией ионов водорода H^+ , а щелочная — концентрацией ионов гидроксида OH^- ; при нейтральной реакции pH равен 7.

В растворах pH определяют двумя методами — колориметрическим и электрометрическим. Первый наиболее простой, но не совсем точный метод базируется на свойстве некоторых индикаторов изменять цвет в зависимости от реакции среды. Этим методом сложно определить pH в мутных и окрашенных растворах, в том числе и в содержимом рубца.

Электрометрический метод. Применяют при работе с окрашенными растворами и суспензиями, им довольно быстро можно определить рН с точностью до 0,05.

Принцип. Метод основывается на том, что при погружении электрода в раствор возникает разница потенциалов между ионами металла электрода и ионами этого же металла, который находится в растворе. Если в это же время погрузить еще и стандартный электрод с известным и стойким потенциалом, то электродвижущая сила гальванического элемента будет зависеть от концентрации ионов металла в растворе. Определяют электродвижущую силу при помощи рН-метра (ЛПУ-0,1; рН-метр-262, ОР-204/1; универсальный ионометр ЭВ-74).

Ход определения. Основной и вспомогательный электроды готовят к работе по инструкции к прибору. Прибор предварительно калибруют. При измерении рН необходимо учитывать температуру исследуемой жидкости. При определении рН содержимого рубца нажимают кнопку с диапазоном определения 4—9.

Содержимое рубца хорошо размешивают, выливают в стаканчик и погружают электроды, предварительно промытые дистиллированной водой и обсушенные фильтровальной бумагой. Фиксируют показатели на шкалах прибора. Для более точного измерения их учитывают через 1—3 мин, поскольку за это время наступает состояние равновесия между электродами и раствором. По окончании измерений прибор выключают, электроды тщательно промывают и погружают в стаканчик с дистиллированной водой.

Колебания рН содержимого рубца зависят главным образом от уровня в нем бикарбонатов, фосфатов и слабых органических кислот. У жвачных животных рН содержимого 6,5—7,2, у высокопродуктивных коров 6,3—6,8. Он поддерживается в рубце в результате: а) поступления щелочи в рубец со слюной и кормом (ежедневно в рубец со слюной попадает 370—520 г NaHCO_3); б) эвакуации из рубца кислот вследствие их всасывания в кровь и перехода с химусом в нижерасположенные отделы пищеварительного канала; в) буферных свойств содержимого рубца (бикарбонаты, фосфаты, белок и др.) и самих органических кислот.

В кислую сторону рН содержимого рубца (4,0—5,6) смещается при внезапном или чрезмерном поступлении в рубец с кормами легкоусвояемых углеводов (сахарная свекла, кукуруза молочно-восковой спелости, патока, яблоки, зерновые концентраты). В рубце интенсивно развивается молочнокислое брожение, что приводит к обильному образованию молочной кислоты, которая вызывает сдвиг рН в кислую сторону.

При повышенной кислотности отмечают признаки острого расстройства пищеварения, животные теряют аппетит, наступает атония или тимпания рубца, акт дефекации учащается, количество инфузорий уменьшается. У некоторых животных отмечают тремор мышц, брадикардию.

Под влиянием молочнокислых бактерий разрушаются некоторые аминокислоты, образуются вредные протеиногенные амины (гистамин, тирамин, кадаверин), которые всасываются в кровь и способствуют развитию ламинита и гипотонии преджелудков.

Смещение рН содержимого рубца в щелочную сторону (больше 7,2) называется алкалозом. Наблюдается при поедании большого количества травы бобовых растений и других высокобелковых кормов или небелковых азотистых продуктов. Щелочная реакция среды сопровождается гипотонией рубца, угнетением функции инфузорий, симбионтных бактерий и даже их гибелью, нарушением бродильных процессов в преджелудках. Интенсивно развиваются гнилостные микроорганизмы, которые используют белок и аминокислоты с образованием токсических соединений (фенол, крезол, индол, скатол и др.). Болезнь проявляется при повышении концентрации аммиака в содержимом рубца до 25 мг/100 мл и больше (в норме 6,5—20). Микрофлора не успевает использовать аммиак для синтеза микробного белка, а печень — превращать его в мочевины, поэтому аммиак всасывается в кровь и ликвор, вызывая интоксикацию.

6.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩЕГО КОЛИЧЕСТВА ЛЕТАЧИХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ (ЛЖК)

Принцип. Под воздействием пара происходит отгонка летучих жирных кислот рубцового содержимого с последующим определением их количества путем титрования раствором щелочи.

Реактивы: смесь насыщенного раствора магния сульфата в 2,5%-ном растворе H_2SO_4 . 25 мл концентрированной серной кислоты на 1 л насыщенного раствора магния сульфата;

0,1 н. раствор $NaOH$;

фенолфталеин (индикатор).

Оборудование: аппарат Маркгама; электроплита (нагреватель); штатив для титрования; лабораторная посуда.

Ход определения. Из общей пробы профильтрованного содержимого рубца отбирают в стаканчик 5 мл жидкости и добавляют 5 мл раствора магния сульфата. После этого 4 мл полученной смеси (эквивалент 2 мл жидкости рубца) переносят в аппарат Маркгама для отгонки (рис. 8). Пробу осторожно выливают во

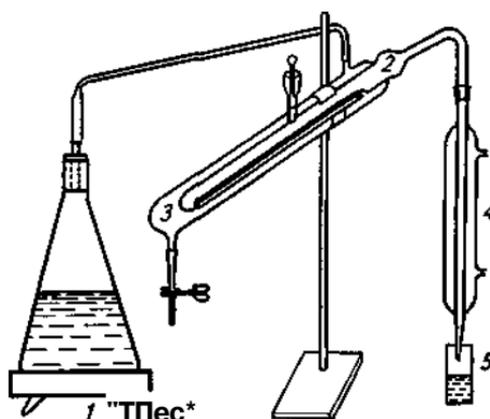


Рис. 8. Схема определения летучих жирных кислот в аппарате Маркгама:

1 — колба на нагревателе; 2 — внутренняя воронка; 3 — внешняя воронка; 4 — холодильник; 5 — стаканчик для сбора конденсата ЛЖК

внутреннюю трубку прибора через воронку. При этом водяной пар из паробразователя проходит между внутренней и внешней трубками аппарата, нагревает внутреннюю трубку, а затем через отверстие поступает во внутреннюю камеру. Под действием пара происходит отгонка ЛЖК, которые вместе с водяным паром попадают в холодильник, где они конденсируются. Отбирают в стаканчик 50 мл жидкости и титруют 0,1 н. раствором щелочи в присутствии индикатора фенолфталеина до появления слабо-розового цвета. Отмечают количество щелочи, пошедшее на титрование.

С целью контроля полного удаления ЛЖК из пробы рубцового содержимого необходимо продолжить дистилляцию и протитровать вторую порцию дистиллята (50 мл). В случае отсутствия ЛЖК во второй пробе жидкость в стаканчике после добавления нескольких капель щелочи сразу же становится розового цвета.

Отработанная проба из внутренней камеры после охлаждения паробразователя собирается в нижней части вместе с конденсатом водяного пара, откуда ее удаляют.

Расчет общего количества ЛЖК ведут по формуле

$$x = A \cdot 0,1 \cdot 1000/5, \text{ или } x = A \cdot 50,$$

где x — количество ЛЖК в 100 мл рубцовой жидкости, ммоль/л; A — количество 0,1 н. раствора NaOH, пошедшего на титрование, мл; 0,1 — показатель нормальности раствора; 1000 — пересчет концентрации ЛЖК на 1 л рубцовой жидкости; B — количество рубцовой жидкости, взятой для анализа (в данном случае 2 мл); 50 — стабильная величина.

В содержимом рубца коров общее количество ЛЖК в норме составляет 80—150 ммоль/л (в среднем 120 ммоль/л).

Клиническое значение. Общее количество ЛЖК в содержимом рубца жвачных животных зависит от состава рациона, вида и химического состава корма, технологии его приготовления, концентрации клетчатки (оптимальная 18—20 %) и крахмала (оптимальная 11—14 %) в сухом веществе рациона.

Уменьшается синтез ЛЖК при некоторых болезнях, например, при смещении сычуга у коров их количество составляет 60–70 ммоль/л (А. В. Чуб, 2002).

Источники: 29, 40.

6.4. ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЛЕТУЧИХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

Принцип. Под действием высокой температуры (210 °С) кислоты начинают выпариваться. Проходя через колонку, заполненную хромосорбом-101, они полностью отделяются одна от другой. Попадая в детектор, сгорают в пламени чистого водорода, образуя при этом определенный электрический потенциал, который регистрируется самописцем в виде пиков. Чем больше кислоты содержится в исследуемой пробе, тем выше будет высота пика.

Реактивы: стандарты летучих жирных кислот (уксусной, пропионовой, масляной, изомасляной, валериановой и др.) со степенью чистоты не менее 99 %;

сорбент хромосорб-101.

Оборудование: разовый хроматограф «Хром-5»; генератор водорода «Водень-1»; компрессор; баллон с азотом; стеклянная колонка длиной 1,5 м, заполненная хромосорбом-101; самописец; рулон бумаги с миллиметровыми отметками; карандаш для записи показателей; микрошприц; лабораторные весы ВЛР-200; навески не менее 2-го класса точности.

Ход определения. Перед исследованием готовят стандарты: смесь ЛЖК в таком соотношении, чтобы оно приблизительно соответствовало средним показателям содержания летучих жирных кислот, которые находятся в содержимом рубца. Прибор «Хром-5» перед работой прогревают в течение 1,5–2 ч. Показатель готовности прибора к работе — четкая нулевая линия на самописце. Исходные данные прибора: скорость движения азота 40 мл/мин (определяют пеноизмерителем); скорость движения водорода 40 мл/мин, воздуха — 400 мл/мин. Рабочая температура камеры введения исследуемой пробы составляет 170 °С, камеры с колонкой и детектором 210 °С.

Порядок включения и работы прибора. Открывают баллон с азотом. Включают «Хром-5», генератор водорода и компрессор. После этого выставляют на приборе необходимые параметры работы: скорость движения азота, водорода и воздуха. Выставляют температурный режим: камера введения пробы 170 °С, камера с колонкой и детектором 210 °С, поджигают водород и включают кнопку «Нагрев». Далее устанавливают карандаш и включают самописец. На протяжении 1,5–2 ч прибор прогревают при постоянном контроле температурного режима и самописца. Если через 2 ч самописец вычерчивает четкую нулевую (горизонтальную) линию, это значит, что прибор готов к работе. Затем в микрошприц набирают 3 мкл исследуемой пробы и вводят в камеру ввода, на самописце фиксируется полученный результат.

На протяжении всей работы прибора необходимо контролировать температурный режим.

Подсчет полученных результатов. С помощью миллиметровой линейки рассчитывают площадь каждой кислоты в отдельно взятой пробе и в стандартной смеси. Для этого измеряют высоту пика и умножают на ширину пика на середине высоты. Полученные результаты по каждой кислоте суммируют и подсчитывают общую площадь каждой пробы. Например, высота пика уксусной кислоты 40 мм, ширина на середине высоты 6 мм, площадь в этом случае составит $40 \cdot 6 = 240 \text{ мм}^2$. Таким образом подсчитывают площадь всех имеющихся кислот.

Расчет. Сумма площадей всех кислот 100 %, а площадь отдельно взятой кислоты x . После проведения необходимых математи-

ческих расчетов получают процентное содержание отдельно взятой кислоты. Например, общая площадь всех кислот 560 мм², а площадь уксусной кислоты 240 мм². Составляем пропорцию:

$$\begin{array}{l} 560 \text{ мм}^2 - 100\% \\ 240 \text{ мм}^2 - x, \end{array}$$

Умножив полученный результат на поправочный коэффициент для уксусной кислоты, который равен 1,125, узнаем относительное содержание уксусной кислоты: $42,85 \cdot 1,125 = 48,2 \%$.

Определение поправочных коэффициентов. С помощью микрошприца вводят 3 мкл стандарта в камеру ввода и записывают показатели на самописце. Подсчитывают полученные результаты и определяют поправочный коэффициент.

Например, в стандартной смеси содержится уксусной кислоты 60%, пропионовой 20, масляной 15, изовалериановой 2 и валериановой кислоты 3 %. Проведя подсчеты хроматограмм, получают следующие показатели: уксусной кислоты 52 %, пропионовой 18, масляной 23, изовалериановой 2,9 и валериановой кислоты 4,1 %.

Подсчитывают поправочный коэффициент для уксусной кислоты ($60 : 52 = 1,153$) и таким же способом для всех других кислот: пропионовой ($20 : 18 = 1,1$), масляной ($15 : 23 = 0,652$), изовалериановой ($2 : 2,3 = 0,689$) и валериановой ($3 : 3,1 = 9,731$).

Примечание. Для постоянного контроля работы прибора смесь стандартных кислот необходимо вводить перед началом исследований, а затем через каждые 8–10 проб.

Клиническое значение. Конечный продукт ферментации углеводов — ЛЖК. Среди них содержание уксусной, пропионовой и масляной кислот составляет около 95 %. Остальное количество приходится на валериановую, изовалериановую, изомаляную и капроновую кислоты. По данным А. В. Чуба (2002), в содержимом рубца клинически здоровых высокопродуктивных коров содержится 45–55 % ($52 \pm 1,3$) уксусной, 20–30 ($27 \pm 1,12$) пропионовой, 15–20% ($22 \pm 1,33$) масляной, $2,0 \pm 0,4$ % изовалериановой и $2,8 \pm 0,6$ % валериановой кислот. В. В. Влизло (1998) выявлял в содержимом рубца незначительное количество изомаляной кислоты.

Увеличение в рационе жвачных клетчатки приводит к возрастанию синтеза уксусной кислоты, крахмала — пропионовой, сахара — молочной, затем пропионовой кислоты. Уменьшается концентрация уксусной кислоты при низком содержании сена в рационе, а также у больных кетозом, гепатодистрофией коров и при смещении сычуга. Относительно увеличивается количество масляной кислоты при кетозе (в 1,4 раза), поэтому соотношение между про-

пионовой и масляной кислотами уменьшается у больных до $1,04 \pm 0,08$ по сравнению с $1,37 \pm 0,09$ у здоровых (А. В. Чуб, 2002).

При вторичной дистонии рубца увеличивается содержание изовалериановой и валериановой кислот. Особенно возрастает их концентрация при смещении сычуга ($4,2 + 0,1$ и $7,2 \pm 0,9$ % соответственно). Вероятно, это объясняется тем, что при снижении в рационе клетчатки бактерии рубца потребуют для своего роста добавки валериановой, изовалериановой и изомаляной кислот (В. Г. Янович, Л. И. Сологуб, 2000).

6.5. ЭКСПРЕСС-МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ МИКРОФЛОРЫ РУБЦА

Проба с метиленовым синим (по G. Dirksen). Принцип. Красящее вещество — метиленовый синий, введенное в содержимое рубца (*in vitro*), обесцвечивается, восстанавливаясь ферментами микроорганизмов.

Реактив: 0,03%-ный раствор метиленового синего.

Оборудование: водяная баня; пробирки или химические стаканчики; стеклянные палочки; секундомер или часы.

Ход определения. В пробирку или химический стаканчик на 20 мл наливают 10 мл свежезятого содержимого рубца, приливают 0,5 мл (в стаканчик 1 мл) 0,03%-ного раствора метиленового синего и перемешивают стеклянной палочкой. Параллельно ставят контрольную пробу без добавления метиленового синего. Пробирки (стаканчики) перемещают на водяную баню при температуре 38°C и контролируют время обесцвечивания красящего вещества, сравнивая опытную пробу с контрольной.

У здорового крупного рогатого скота при смешанном типе кормления обесцвечивание наступает за 3 мин. Если же обесцвечивание продолжается 15—17 мин, необходимо обратить внимание на кормление животных (качество корма и режим кормления). Увеличение времени обесцвечивания раствора метиленового синего до 30 мин и более свидетельствует о заболевании преджелудков.

Проба со сбраживанием глюкозы. Принцип. Легкопереваримые углеводы, поступающие с кормом в рубец, активно ферментируются микрофлорой до ЛЖК и газов (углекислый, метан, водород). Добавляя глюкозу к содержимому рубца (*in vitro*), фиксируют активность газообразования и таким образом делают выводы о ферментативной способности микроорганизмов.

Реактив: свежеприготовленный 16%-ный раствор глюкозы.

Оборудование: сахарометр или градуированные пробирки; термостат.

Ход определения. В сахарометре или градуированной пробирке смешивают 10 мл свежего содержимого рубца с 0,5 мл 16%-ного слегка подогретого раствора глюкозы и ставят в термостат при темпе-

ратуре 38 °С. Интенсивность ферментации глюкозы определяют через 30 и 60 мин по величине образованной прослойки газов.

В содержимом рубца здорового крупного рогатого скота при сбраживании глюкозы газовая прослойка толщиной 1 см образуется в течение 30 мин, а через 60 мин она достигает 2 см. При инaktivации микрофлоры (ацидоз, алкалоз) количество образовавшихся газов незначительно или их нет совсем. При тимпании рубца газообразование значительно возрастает.

Проба с восстановлением нитратов. Принцип. Внесение калия нитрата в содержимое рубца (*in vitro*) вызывает его восстановление микроорганизмами и использование азота, характеризующееся исчезновением красного цвета.

Реактивы: 0,025%-ный раствор калия нитрата (KNO_3);

реактив 1: 2,0 мл концентрированной серной кислоты смешивают с 200 мл 30%-ного раствора уксусной кислоты;

реактив 2. 0,6 мл ос-нафтилина, 16,0 мл концентрированной уксусной кислоты смешивают со 140 мл дистиллированной воды.

Оборудование: водяная баня; пробирки; пластина с ячейками.

Ход определения. В 3 пробирки наливают по 10 мл содержимого рубца. В первую пробирку вносят 0,2 мл, во вторую 0,5 мл и при необходимости в третью 0,7 мл 0,025%-ного раствора калия нитрата. Пробирки ставят в водяную баню при температуре 39 °С. Через 5 мин из каждой пробирки берут по 1 капле смеси и наносят на пластинку с ячейками. Затем добавляют по 2 капли реактивов 1 и 2. Если восстановление нитратов не наступило, то смесь окрашивается в красный цвет. В случае расщепления калия нитрата микрофлорой в течение 5 мин окрашивание не появляется. При появлении красного цвета продолжают контролировать время обесцвечивания поминутно.

В содержимом рубца здоровых животных KNO_3 восстанавливается через 5—10 мин в первой пробирке и через 20 и 30 мин соответственно во второй и третьей. При нарушении ферментативной активности микрофлоры (ацидоз, алкалоз, атонии, гипотонии) время восстановления затягивается или же восстановления вообще не происходит.

Определение целлюлолитической активности микрофлоры. Расщепление грубого корма у жвачных происходит ферментами целлюлолитических микроорганизмов, которые заселяют рубец во время поедания первых порций сена (примерно в двухнедельном возрасте). Уже в 2—3-месячном возрасте отмечают максимальную целлюлолитическую активность микроорганизмов. Расщепление клетчатки приводит к образованию ЛЖК — источника энергии животных. В преджелудках усваивается 60—70 % клетчатки.

Принцип базируется на способности целлюлолитической микрофлоры переваривать хлопчатобумажную нить (*in vitro*).

Реактив: 16%-ный раствор глюкозы.

Оборудование: термостат; пробирки; стеклянный шарик; натуральная хлопчатобумажная нить № 10 (искусственную или полусинтетическую не используют).

Ход определения. В пробирке смешивают 10 мл свежезятого содержимого рубца и 0,3 мл 16%-ного раствора глюкозы. К концу хлопчатобумажной нити привязывают стеклянный шарик и опускают на дно пробирки с содержимым рубца. Противоположный конец нити фиксируют вокруг внешнего края пробирки. Пробу помещают в термостат при 39 °С и через 12 ч проводят первый контроль. Содержимое рубца переваривает нить в течение 96 ч. Если за это время переваривание не произошло, целлюлолитическая активность считается отрицательной.

Определение амилалитической активности содержимого рубца.

Определение амилалитической активности содержимого рубца базируется на принципе расщепления крахмала микробной амилазой; фотоэлектроколориметрический анализ проводится по цветной реакции крахмала и йода.

Реактивы: 6,25%-ный раствор крахмала (готовится непосредственно перед использованием). В колбочку на 250 мл отвешивают 6,25 г водорастворимого крахмала и доливают 80 мл дистиллированной воды. После образования суспензии крахмала колбочку 10 мин выдерживают в кипящей водяной бане (до полного растворения крахмала), часто встряхивая. Раствор крахмала, охлажденный до комнатной температуры, переносят в мерную колбочку на 100 мл и доводят объем кипяченой дистиллированной водой до метки;

фосфатный буфер, рН 6,8;

2 н. раствор хлористоводородной кислоты (НС1);

раствор калия йод-йодистого. Растворяют 20 г калия йодида и 2 г кристаллического йода в 1 л дистиллированной воды.

Оборудование: фотоэлектроколориметр; водяная баня; мерные колбы на 50 мл.

Ход определения. В пробирке смешивают 1,6 мл 6,25%-ного раствора крахмального субстрата с 7,4 мл фосфатного буфера. После 10-минутного нагревания пробирки в водяной бане при 40 °С добавляют 1 мл жидкости рубца, процеженной через 2 слоя марли. Содержимое пробирки тщательно взбалтывают и сразу же пипеткой переносят 0,5 мл этой жидкости в мерную колбу на 50 мл с 2 мл 2 н. раствора НС1 для прекращения действия микробных ферментов. В колбу добавляют 2 мл раствора калия йод-йодистого и дистиллированной водой доводят объем до 50 мл (проба до инкубации). После этого пробирку выдерживают 1 ч в водяной бане при температуре 40 °С, периодически (через 10—15 мин) перемешивая содержимое пробирки встряхиванием. По завершении инкубации из пробирки отбирают пробу 0,5 мл и переносят в мерную колбочку на 50 мл с 2 мл 2 н. раствора НС1. Добавляют 2 мл калия йод-йодистого и дистиллированную воду до метки (проба после инкубации).

Полученные растворы проб до инкубации и через 1 ч после нее исследуют на ФЭКе в кюветах на 5 мм при красном светофильтре (620 нм) против дистиллированной воды.

Расчет. По калибровочной кривой определяют количество крахмала (мг) в растворах до инкубации и после нее. Разница между этими показателями дает количество крахмала, расщепленного микробной амилазой за 1 ч инкубации. Амилолитическая активность выражается формулой

$$x = (A - B) \cdot 20,$$

где x — количество крахмала, расщепленного 1 мл содержимого рубца за 1 ч, мг; A — количество крахмала в растворе до инкубации, мг; B — количество крахмала после инкубации, мг; 20 — коэффициент перерасчета на 1 мл содержимого рубца.

Определение активности α -амилазы. Принцип. Определяют количество редуцирующих Сахаров, которые образуются вследствие ферментативного расщепления крахмала. В основу метода положена цветная реакция с 3,5-динитросалициловой кислотой, которая в щелочной среде при наличии редуцирующих Сахаров превращается в 3-амино-5-нитросалициловую кислоту и образует раствор желто-померанцевого цвета.

Реактивы: раствор 3,5-динитросалициловой кислоты. 1 г 3,5-динитросалициловой кислоты и 30 г сегнетовой соли растворяют в 20 мл 2 н. раствора NaOH и доводят объем до 100 мл;

2 н. раствор NaOH;

калий-натрий виннокислый (сегнетовая соль);

мальтоза (для приготовления стандартного раствора);

1/15 М раствор натрия хлорида;

1%-ный раствор крахмала (субстрат).

Оборудование: фотоколориметр.

Ход определения. Жидкость рубца разводят дистиллированной водой в соотношении 1:5. В опытную пробирку наливают 1 мл 1%-ного раствора крахмала и ставят в водяную баню при 39 °С на 1–2 мин. Добавляют 1 мл разведенного содержимого рубца, инкубируют 20 мин. Добавляют 2 мл 3,5-динитросалициловой кислоты для прекращения реакции. В контрольную пробирку набирают 2 мл раствора 3,5-динитросалициловой кислоты, 1 мл разведенного содержимого рубца, а затем 1 мл 1%-ного раствора крахмала и перемешивают. Обе пробирки помещают в кипящую водяную баню на 5 мин, немедленно охлаждают в проточной воде и фотометрируют при 530 нм.

Активность α -амилазы высчитывают по разнице показателей ФЭК между опытными и контрольными пробами, а затем по калибровочному графику определяют количество мальтозы, которая освободилась вследствие ферментативной реакции, по формуле

где E — число единиц активности α -амилазы, выраженное в мг мальтозы; A — количество мальтозы, определенное по графику; P — величина разведения химуса (в 5 раз); 20 — время инкубации, мин.

Если параметры выдержаны, то $E = \frac{A-5}{5} = \frac{A}{5}$.

Примечание. Необходимо отработать кинетику фермента, т. е. продолжительность инкубации.

Определение протеиназной активности содержимого рубца.

Принцип. При pH больше 5,0 ос-аминокислоты реагируют с нингидрином с образованием углекислоты, альдегида и соединения, окрашенного в синий цвет, которое характеризуется максимальным поглощением при длине волны 597 нм. Интенсивность окрашивания прямо пропорциональна количеству аминокислот.

Реактивы: фосфатный буфер, pH 7,1;

цитратный буфер, pH 5,4;

2%-ный раствор казеина, приготовленный на 0,5%-ном растворе NaHCO_3 ;

0,5%-ный раствор натрия карбоната;

10%-ный раствор трихлоруксусной кислоты;

0,01 н. раствор кислоты хлористоводородной (HCl);

60%-ный раствор глицерина;

1%-ный раствор нингидрина (растворяют при подогревании в цитратном буфере; реактив темного цвета необходимо очищать);

раствор «С»: к 40 мл 60%-ного глицерина добавляют 100 мл 1% -нингидрина и 40 мл цитратного буфера (готовят перед анализом).

Ход определения. В одну пробирку (опыт) вносят 4 мл раствора казеина, 1 мл фосфатного буфера и помещают в водяную баню при температуре 30 °С. Через 10 мин добавляют 1 мл разведенного в 5 раз дистиллированной водой содержимого рубца (1 + 4), смешанного и инкубированного при 30 °С в течение 60 мин. Добавляют 4 мл 10%-ного раствора трихлоруксусной кислоты для прекращения реакции. Взбалтывают 10 мин, центрифугируют или фильтруют (фильтрат должен быть прозрачным).

Набирают 0,2 мл фильтрата или аликвота, добавляют 3,8 мл раствора «С», пробирки закрывают притертыми стеклянными пробками и ставят в кипящую водяную баню на 20 мин.

Пробы, окрашенные в синий цвет, охлаждают в проточной воде и фотометрируют через 10—15 мин на приборе с красным светофильтром в кювете на 10 мм. Интенсивность окраски сохраняется в течение 1 ч.

В контрольную пробирку вносят 1 мл разведенного содержимого рубца, 1 мл фосфатного буфера, 4 мл трихлоруксусной кислоты, выдерживают 10 мин в водяной бане при температуре 30°С. После этого вносят 4 мл раствора казеина, смешивают и фильтруют. Затем исследуют так же, как опытную пробу.

Количество свободного аминного азота определяют по калибровочному графику. Для его построения берут стандартные растворы тирозина или глицина и готовят ряд растворов, которые содержат различное количество этих аминокислот (мкмоль), и дальше реакцию проводят так же, как описано выше. Активность фермента выражают в микромолях аминного азота глицина или тирозина за 1 мин на 1 г ферментного препарата (содержимого рубца), что соответствует 1 ед. активности:

$$\frac{y}{x} = \frac{A-B}{T'}$$

где x — активность фермента, мкмоль/л; A — показатель стандартного графика; B — степень разведения (в 5 раз); T' — время инкубации (60 мин).

Источник: 1.

Определение липолитической активности содержимого рубца
Принцип. Содержимое инкубируют с приготовленной эмульсией подсолнечного масла. Показателем активности ферментов является количество освобожденных свободных жирных кислот.

Реактивы: подсолнечное масло;

0,6%-ный раствор цистеина солянокислого или аскорбиновой кислоты;

желчь;

20%-ный раствор фосфорновольфрамовой кислоты;

0,01 н. раствор NaOH;

раствор Рингера—Локка: 9 г NaCl, 0,2 г NaHCO₃, 0,2 г CaCl₂, 0,2 г KCl, 1 г глюкозы и воды дистиллированной до 1 л;

индикатор Таширо: 40 мл 0,1%-ного спиртового раствора метилового красного и 10 мл 0,1%-ного спиртового раствора метиленового синего.

Оборудование: термостат; холодильник; бюретка; колбочка на 100 мл с притертыми пробками.

Ход определения. Содержимое рубца хорошо перемешивают и готовят разведение 1:10. Готовят субстратную смесь: 3 мл подсолнечного масла, 3 мл раствора Рингера—Локка, 1 мл 0,6%-ного раствора цистеина солянокислого и 3 капли желчи.

В колбочки на 100 мл (2 опытные и 2 контрольные) с притертыми пробками набирают по 3 мл раствора Рингера—Локка и 1 мл содержимого рубца. Опытные пробы ставят в термостат при температуре 39 °С на 5 ч, контрольные — в холодильник. Через каждый час пробы встряхивают 5 мин. Через 5 ч добавляют в колбочки по 3 капли 20%-ного раствора фосфорновольфрамовой кислоты и опытные пробы помещают в холодильник. Содержимое колбочек фильтруют в пробирки, добавляют по 1 капле индикатора Таширо. Опытные и контрольные пробы тестируют 0,01 н. раствором NaOH до розового цвета.

Расчет липолитической активности содержимого рубца (ЛА) ведут по формуле

где x — липолитическая активность, ед. за 1 ч инкубации; A — количество 0,01 н. раствора NaOH, пошедшего на титрование опытных проб, мл; B — количество 0,01 н. раствора NaOH, пошедшего на титрование контрольных проб, мл; 5 — время инкубации, ч.

6.6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩЕЙ КИСЛОТНОСТИ СОДЕРЖИМОГО РУБЦА

Общую кислотность содержимого рубца определяют подобно кислотности содержимого желудка или сычуга.

Принцип. К содержимому рубца в присутствии индикатора прититровывают раствор щелочи, что вызывает смену цвета.

Реактивы: 0,1%-ный спиртовой раствор фенолфталеина. 1 г фенолфталеина вносят в колбочку на 100 мл и растворяют 96%-ным этиловым спиртом. Готовый реактив хранят при комнатной температуре;

0,1 н. раствор натрия гидроксида (NaOH). Готовят из фиксана-ла, перед применением его титр проверяют 0,1 н. раствором кислоты хлористоводородной (HCl).

Оборудование: микробюретки на 2 и 5 мл; колбы на 50 и 100 мл; стаканчики или конические колбочки; пипетки на 5 и 10 мл; капельница.

Ход определения. В стаканчик или коническую колбочку наливают 10 мл профильтрованного содержимого рубца и добавляют из капельницы 1–2 капли 1%-ного раствора фенолфталеина. В кислом растворе индикатор не изменяет цвета. При титровании из микробюретки 0,1 н. раствором натрия гидроксида цвет изменяется до розово-красного. Общая кислотность содержимого рубца определяется количеством миллилитров 0,1 н. раствора натрия гидроксида, необходимого для титрования 1 л (1000 мл) содержимого рубца (ед. титра). 1 ед. титра (ЕТ) соответствует концентрации кислот в 1 ммоль/л.

Расчет общей кислотности ведут по формуле

$$y = \frac{A \cdot 1000 \cdot 0,1}{C}$$

где x — общая кислотность, ммоль/л (ЕТ); A — количество 0,1 н. раствора NaOH, мл; 1000 — пересчет на 1 л; 0,1 — количество миллиграмм-эквивалентов щелочи в 1 мл 0,1 н. раствора, ммоль; C — объем содержимого рубца, взятого для исследования, мл.

У клинически здоровых коров с нормальной ферментацией содержимого общая кислотность составляет 8–25 ммоль/л (ЕТ). В гиперацидном состоянии (ацидоз, непроходимость сычуга, антиперистальтика) общая кислотность возрастает до 70 ммоль/л (ЕТ).

6.7. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АЗОТИСТЫХ ВЕЩЕСТВ В СОДЕРЖИМОМ РУБЦА

Определение общего азота в жидкости рубца. Для определения концентрации общего азота в рубцовой жидкости используют метод Кьельдаля.

Принцип. Метод базируется на способности органических соединений под воздействием кипящей серной кислоты окисляться до углекислоты и воды. Азот белковых и близких к ним соединений при этом гидролизуется, образуя в присутствии воды ионы аммония. Метод выполняют в три этапа: минерализации (сжигания) пробы, отгонки аммиака и его определения.

Реактивы: концентрированная H_2SO_4 ;

33%-ный раствор $NaOH$;

0,01 н. (0,01 моль/л) раствор $NaOH$;

0,01 н. (0,005 моль/л) $H_2S_0_4$;

индикатор Таширо;

катализатор, состоящий из $K_2S_0_4$ ($Na_2S_0_4$), меди сульфата и селена в соотношении 100:10:5.

Оборудование: колбы Кьельдаля на 100 мл; плитка для сжигания образцов; прибор Кьельдаля для перегонки пробы; пипетки; бюретки на 10 мл; индикаторная бумага.

Ход определения. В колбу Кьельдаля осторожно наливают 1 мл рубцового содержимого. Туда же приливают 5 мл H_2SO_4 (концентрированной) и 1 г катализатора. Колбы ставят под углом сначала на слабое, а потом на сильное пламя, не доводя до сильного кипения. Сжигание прекращают, когда жидкость в колбе станет прозрачной.

В перегонную колбу переносят всю сожженную пробу. В приемную колбочку наливают 10—20 мл 0,01 н. раствора серной кислоты и 3—4 капли индикатора Таширо, подставляют ее под стеклянную трубочку, соединенную с холодильником аппарата Кьельдаля, опуская конец трубки в раствор кислоты.

Отмеривают 30—40 мл 33%-ного раствора $NaOH$ и заливают его через воронку в перегонную колбу. Включают нагреватель и начинают отгонять пробы. Во время кипячения выделяется аммиак, который вместе с парами воды после прохождения через холодильник попадает в приемник и связывается с серной кислотой. Отгонку продолжают 15—30 мин до нейтральной реакции, проверяя индикаторной бумагой.

Содержимое приемной колбы титруют 0,01 н. раствором $NaOH$ до изменения малинового цвета на зеленый.

Расчет количества общего азота в пробе ведут по формуле

$$x = (A - B) \cdot 0,14 \cdot 100,$$

где x — количество общего азота в 100 мл рубцовой жидкости, мг; A — количество 0,01 н. раствора H_2SO_4 в приемнике, мл; B — количество 0,01 н. раствора $NaOH$, пошедшего на титрование, мл; 0,14 — количество азота, связываемое 1 мл 0,01 н. раствора серной кислоты, мг.

Расхождение результатов параллельных определений не должно превышать 2—3 %.

Концентрация общего азота, который представлен белком микроорганизмов, нераспавшимся протеином корма, конечными и промежуточными продуктами азотистого обмена (аммиак, свободные аминокислоты, пептиды и др.), в цельном содержимом рубца коров может составлять 100—300 мг/100 мл, в рубцовой жидкости — от 50 до 240 мг/100 мл, у овец — 120—350 и 60—250 мг/100 мл соответственно.

Источники: 25, 29.

Определение белкового и небелкового (остаточного) азота в жидкости рубца. *Определение небелкового азота.* Небелковый азот в рубцовой жидкости определяют методом Кьельдаля. Предварительно необходимо осадить белки. С этой целью используют соли тяжелых металлов, поскольку трихлоруксусная кислота недостаточно полно осаждает растительные белки и полипептиды.

Реактивы: 0,3 н. (0,15 моль/л) раствор Ва(ОН)₂;

5%-ный ZnSO₄;

фенолфталеин (индикатор);

остальные реактивы те же, что и при определении общего азота.

Оборудование: центрифуга; колбы Кьельдаля на 100 мл; прибор Кьельдаля для перегонки пробы; пипетки, бюретки; электроплитка.

Ход определения. Для осаждения белков в центрифужную пробирку наливают рубцовую жидкость определенного объема (например, 2 мл). Туда же добавляют такое же количество 0,3 н. раствора Ва(ОН)₂ и аналогичный объем 5%-ного раствора цинка сульфата. Реактивы предварительно должны быть оттитрованы, т. е. должны точно нейтрализовать друг друга по фенолфталеину (объем на объем). Смесь тщательно перемешивают и центрифугируют 15 мин при 3000—5000 мин⁻¹. 3 мл центрифугата, соответствующего 1 мл рубцовой жидкости, переносят в колбу Кьельдаля, заливают 3 мл концентрированной серной кислоты. Сжигание пробы и отгонку аммиака проводят так же, как и при определении общего азота. Учтите, что концентрация небелкового азота в содержимом рубца не превышает 60 мг/100 мл, в приемную колбу достаточно налить 10 мл 0,01 н. раствора серной кислоты.

Расчет содержания небелкового азота, как и общего азота, ведут по формуле

$$JС = (A - B) \cdot 0,14 \cdot 100,$$

где x — концентрация небелкового азота, мг/100 мл; A — количество 0,01 н. раствора H₂SO₄ в приемнике, мл; B — количество 0,01 н. раствора NaOH, пошедшего на титрование, мл.

Определение белкового азота. Белковый азот определяют по разнице общего и небелкового азота.

Количество небелкового азота в рубцовой жидкости крупного рогатого скота составляет 15—60 мг/100 мл, овец — 10—50 мг/100 мл, небелкового соответственно 35—200 и 40—240 мг/100 мл.

Определение аммиака (аммонийного азота) с реактивом Несслера. Реактивы: реактив Несслера; аммония сульфат.

Оборудование: спектрофотометр или фотоэлектроколориметр; центрифуга.

Ход определения. Микропипеткой отбирают 20 мкл отцентрифугированной жидкости рубца, переносят в пробирки, в которые предварительно набирают по 5 мл дистиллированной воды, перемешивают. Добавляют по 0,2 мл реактива Несслера и вновь перемешивают. Пробы, в которых цвет стал желтым, через 10 мин спектрофотометрируют при длине волны 410 нм. Оптическую плотность измеряют против контрольной пробы, в которую входят те же ингредиенты, но вместо рубцовой жидкости 20 мкл дистиллированной воды. Таким же образом обрабатывают 20 мкл стандартного раствора, используя с этой целью аммония сульфат. Готовят его из расчета 0,4716 г перекристаллизованного $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ на 1 л бидистиллированной воды. В 1 мл такого раствора содержится 100 мкг азота (в 20 мкл — 2 мкг).

Расчет количества аммиака в жидкости рубца ведут по формуле

$$x = E_n A / E_c$$

где x — количество аммиака в пробе, мкг; E_n — экстинкция пробы; A — количество аммиака в стандартном растворе, мл; E_c — экстинкция стандарта.

Источник: 53.

Определение аммиака микродиффузионным методом. Принцип. Метод заключается в вытеснении аммиака из аммонийных солей концентрированным раствором щелочи с последующим поглощением его титрованным раствором кислоты.

Реактивы: 0,02 н. (0,01 моль/л) раствор серной кислоты;

насыщенный раствор K_2CO_3 ;

0,01 н. (0,01 моль/л) раствор натрия гидроксида;

индикатор Таширо. Готовят два раствора: 1) 50 мг метиленового синего растворяют в 50 мл спирта; 2) 100 мг метиленового красного (метилрота) растворяют в 50 мл спирта. Затем оба раствора соединяют в равных объемах.

Оборудование: чашки Конвея; пипетки; бюретки на 2 мл.

Ход определения. Предварительно подготавливают чашку Конвея, наружный верхний край ее смазывают вазелином. Во внутреннюю камеру чашки Конвея заливают точно отмеренное количество 0,02 н. раствора серной кислоты. Исходя из предполагаемого уровня аммиака в пробе объем раствора может быть 2 или 3 мл. Туда же добавляют 3—4 капли индикатора Таширо. В наружную камеру чашки Конвея наливают 1 мл рубцовой жидкости и чашку закрывают крышкой. Затем, чуть приоткрыв крышку, в на-

ружную камеру осторожно с противоположной стороны от налитой рубцовой жидкости вливают 2 мл насыщенного раствора K_2CO_3 . Крышку быстро закрывают, проверяют герметичность камеры и осторожно смешивают исследуемую жидкость со щелочью.

Параллельно с опытными ставят контрольную («слепую») пробу, при этом в наружную камеру чашки вместо рубцовой жидкости наливают 1 мл дистиллированной воды. Остальные манипуляции такие же, как и с опытной пробой.

Затем чашки с опытными пробами и контрольную ставят на время, необходимое для полного вытеснения из анализируемого раствора аммиака и последующего поглощения его раствором серной кислоты. Обычно диффузия при комнатной температуре продолжается не менее 12 ч. Однако чаще всего ее проводят 20—24 ч. По окончании этого срока избыток кислоты оттитровывают 0,01 н. раствором натрия гидроксида до перехода малиновой окраски в зеленую.

Расчет ведут по формуле

$$x=(A-B) \cdot 0,17 \cdot 100,$$

где x — количество аммиака в 100 мл жидкости, мг; A — количество 0,01 н. раствора NaOH, пошедшего на титрование контрольной пробы, мл; B — количество 0,01 н. раствора NaOH, пошедшего на титрование опытной пробы, мл; 0,17 — количество аммиака, эквивалентное 1 мл 0,01 н. раствора NaOH или 1 мл 0,01 н. раствора H_2SO_4 , мл; 100 — коэффициент для перевода в мг/100 мл.

Следует отметить, что данный метод анализа позволяет улавливать не только свободный газообразный аммиак, но и аммиак рубцового содержимого, находящийся в связанном состоянии в виде аммония. Поэтому лучше рассчитывать содержание в рубцовой жидкости азота аммиака или аммонийного азота по формуле

$$x=(A-B) \cdot 0,14 \cdot 100,$$

где 0,14 — количество аммонийного азота, эквивалентное 1 мл 0,01 н. раствора NaOH или 1 мл 0,01 н. раствора H_2SO_4 , мл.

Пример: на титрование контрольной пробы пошло 4 мл 0,01 н. раствора NaOH; на титрование опытной пробы — 2,24 мл 0,01 н. раствора NaOH; $x = (4,00 - 2,24) \cdot 0,14 \cdot 100 = 24,64$ мг/100 мл. Следовательно, в 100 мл рубцовой жидкости содержится 24,64 мг азота аммиака или аммонийного азота.

Клиническое значение. Аммиак — конечный продукт превращения белковых и небелковых веществ корма. Количество его, образующееся в рубце, зависит в первую очередь от количества белка, соотношения легко- и тяжелорастворимого протеина в кормах рациона, азотсодержащих небелковых соединений, а также O^* /интенсивности его использования при синтезе микробного белка и всасывания в кровь. При обычных условиях кормления концентрация аммиака может составлять от 5 до 40 мг/100 мл (2,8—22 ммоль/л), но оптимальное количество 6,5—25 мг/100 мл.

Скорость образования аммиака и его концентрация в содержимом рубца определяются обеспеченностью рационов энергией и использованием аммиака рубцовой микрофлорой для синтеза белка. Установлено, что максимальная скорость синтеза белка микроорганизмами бывает при концентрации аммонийного азота в рубце в пределах от 5 до 20 мг/100 мл (от 2,8 до 11,0 ммоль/л). При концентрации выше 50 мг/100 мл (27,5 ммоль/л) аммиак начинает интенсивно всасываться в кровь. Большая часть его в печени превращается в мочевины (орнитиновый цикл), некоторое количество мочевины синтезируется из аммиака в почках (цикл Кребса—Генселяйта).

Увеличение образования аммиака в рубце наблюдается при нарушении соотношения в кормах рациона между легко- и труднорастворимым протеином (оптимальным является 50—60 % легкорастворимого протеина в начале лактации и 65—70 % в средней и последней трети лактации); при скармливании зеленой массы люцерны, клевера, озимой ржи; при повышенном уровне нитратов в кормах; использовании углеаммонийных солей, аммиачной воды; скармливании некачественного силоса и сенажа, в которых содержание аммонийного азота может составлять 35—50 % общего азота. Кроме того, в этих случаях рН содержимого рубца смещается в щелочную сторону, что увеличивает скорость всасывания аммиака в кровь.

Обезвреживание аммиака нарушается при патологии печени (гепатит, цирроз, гепатодистрофия) вследствие уменьшения синтеза мочевины. Количество его в крови увеличивается (*гипераммониемия*): в артериальной до 20—129 мкмоль/л, в венозной до 12—85 мкмоль/л (у здоровых коров 7,0—30,0 и 5,5—25 соответственно). Аммиак легко проникает через гематоэнцефалический барьер и его количество в ликворе может составить 40—64 мкмоль/л против 8,5 мкмоль/л у здоровых коров (В. В. Влизло, 1998). Соли аммония резко угнетают обмен ацетилхолина, и у животных развивается печеночная энцефалопатия и печеночная кома.

Накапливающийся в тканях аммиак блокирует цикл Кребса, что неминуемо ведет к нарушению окислительно-восстановительных процессов в организме, т. е. к состоянию гипоксии. Угнетение тканевого дыхания имеет следствием нарушение синтеза макроэргических соединений (АТФ, КФ). Полагают, что это может быть связано с блокированием ос-кетоглутаровой кислоты вследствие активирования процесса восстановительного аминирования или угнетения активности ферментов, участвующих в окислительном декарбоксилировании α -кетокислот (В. С. Калашников, 2000). Влияние аммонийного азота на организм моногастричных животных значительно сильнее вследствие отсутствия у них гепаторенальной системы обмена азота.

6.8. ОПРЕДЕЛЕНИЕ НИТРИТОВ В ЖИДКОСТИ РУБЦА

Принцип. Метод базируется на реакции Грисса, по которой при взаимодействии реактива Грисса с ионами NO_2 образуется окрашенный раствор; интенсивность окраски зависит от концентрации нитритов.

Реактивы: 0,3 н. раствор $\text{Ba}(\text{OH})_2$;

5%-ный раствор цинка сульфата;

фенолфталеин (индикатор);

5%-ный раствор аммиака;

0,1 н. раствор кислоты хлористоводородной (HCl);

96%-ный этиловый спирт;

сульфаниловая кислота;

ос-нафтиламин;

12%-ный раствор кислоты уксусной;

реактив Грисса. Состоит из равных объемов двух растворов;

а) 0,5 г сульфаниловой кислоты растворяют в 150 мл 12%-ного раствора уксусной кислоты; б) смешивают 180 мл 12%-ного раствора уксусной кислоты с фильтратом водного раствора а-нафтиламина, полученного при кипячении 0,2 г последнего в 20 мл дистиллированной воды. Хранят раствор в темном месте, а перед употреблением готовят необходимое количество раствора Грисса.

Оборудование: фотоэлектроколориметр или спектрофотометр; мерные колбочки на 100 мл.

Ход определения. Предварительно важно приготовить осадители. Оба раствора [0,3 н. $\text{Ba}(\text{OH})_2$ и 5%-ный раствор ZnSO_4] должны точно нейтрализовать друг друга по фенолфталеину (объем на объем). Затем осаждают белки рубцовой жидкости. Для этого в пробирки наливают по 2 мл рубцовой жидкости, добавляют такой же объем бария гидроксида и цинка сульфата. Смесь тщательно смешивают и центрифугируют 15 мин при 3000—5000 мин.

20 мл полученного центрифугата переносят в мерную колбу на 100 мл, куда последовательно добавляют 5 мл 5%-ного раствора аммиака, 10 мл 0,1 н. раствора кислоты хлористоводородной и доводят объем до метки дистиллированной водой. Из полученного раствора берут 15 мл и смешивают с 15 мл реактива Грисса. Через 15 мин определяют интенсивность окрашивания на электроколориметре при зеленом светофильтре в кювете на 20 мм. По показаниям экстинкции с помощью калибровочного графика вычисляют содержание нитритов в данном растворе.

Калибровочный график строят по стандартному раствору натрия нитрита (NaNO_2) с концентрацией нитрита от 0,1 до 1 мкг в 1 мл.

Расчет количества нитритов в 100 мл рубцовой жидкости ведут по формуле

$$y; =x \cdot 1500,$$

где x — количество нитритов в 100 мл рубцовой жидкости, мкг; E — показатель количества нитритов в 1 мл, соответствующих полученной экстинкции; 1500 — произведение $15 \cdot 100$, где 15 — число, на которое умножают количество рубцовой жидкости, содержащейся в 20 мл безбелкового фильтрата, чтобы привести к 100 мл рубцовой жидкости; 100 — число, на которое необходимо умножить количество нитритов, найденное по калибровочному графику (E), чтобы определить, сколько нитритов содержится в 20 мл безбелкового фильтрата.

Если показатель экстинкции выше диапазона калибровочной кривой, полученный безбелковый фильтрат разводят определенным количеством дистиллированной воды и при расчетах учитывают степень разведения (P) фильтрата. Количество нитритов в этом случае определяют по формуле

$$JC = JM500 \cdot P.$$

6.9. МЕТОДЫ ПОДСЧЕТА МИКРООРГАНИЗМОВ В СОДЕРЖИМОМ РУБЦА

В рубце жвачных существует множество различных микроорганизмов — бактерий и простейших. Благодаря их активной деятельности питательные вещества корма подвергаются сложным превращениям, вследствие чего образуются ЛЖК, аммиак, аминокислоты, используемые организмом в процессе обмена. Наряду с превращением составных частей корма в соединения, доступные для усвоения в преджелудках, происходит синтез жизненно важных аминокислот, витаминов. Поступая в нижерасположенные отделы пищеварительного канала, бактерии и простейшие перевариваются и обеспечивают организм жвачных полноценными белками.

Росту и развитию большого количества разнообразной по составу микрофлоры и микрофауны способствуют определенные благоприятные условия среды в рубце, в том числе pH содержимого, постоянный ионный состав, непрерывное снабжение микроорганизмов питательной средой (кормом), анаэробные условия.

Бактерии и простейшие очень тесно реагируют на изменения кормления и содержания животных. Например, количество инфузорий увеличивается при добавке к рациону достаточного количества сена, углеводистых кормов. Если же в рационе преобладает силос, количество простейших уменьшается, изменяется их видовой состав. Летом при кормлении зелеными кормами их, как правило, становится больше по сравнению с зимним рационом. Почти полностью они исчезают при голодании, патологическом состоянии преджелудков, атонии, тимпании рубца, травматическом ретикулоперитоните.

Определение количества инфузорий. В рубце у жвачных находится примерно 100 видов инфузорий. Преимущественно они представлены классом Ciliata, в который входят две большие группы: подкласс Holotricha и подкласс Spirotricha. Инфузории первой группы равнореснитчатые (вся их поверхность равномерно покры-

та ресничками). Подкласс Spirotricha (малореснитчатые) в рубце составляет 60—80 % общего количества инфузорий.

Наличие в рубце большого количества инфузорий свидетельствует о нормальном и эффективном течении ферментативных процессов. Наиболее чувствительны к изменениям среды рубца большие инфузории. При неблагоприятных условиях существования в рубце они исчезают в первую очередь и появляются при нормализации процессов последними.

Видовой состав простейших определяют только в свежем содержимом рубца. Для этого каплю его наносят на предметное стекло, накрывают покровным стеклом и рассматривают по микроскопом вначале при малом (окуляр $\times 7$, объектив $\times 10$), затем при большом (окуляр $\times 7$, объектив $\times 40$) увеличении в слегка затемненном поле зрения. Поскольку инфузории, особенно большие, при комнатной температуре быстро теряют подвижность, то можно пользоваться столиком с подогревом (температура 38—39 °С). Для более детального определения строения инфузорий препарат лучше покрасить раствором Люголя или приготовить мазок и рассматривать его при большом увеличении или под иммерсией.

Реактив: 0,85%-ный раствор NaCl, слегка окрашенный метиленовым синим.

Оборудование: микроскоп; счетная камера с сеткой Горяева; лейкоцитарный меланжер.

Ход определения. В пробирку отбирают 5 мл профильтрованного содержимого рубца (жидкую часть) и добавляют 0,1 мл 4%-ного раствора формалина для фиксации инфузорий. Это позволяет подсчитывать количество инфузорий в течение 20—24 ч после взятия содержимого рубца. Содержимое пробирки тщательно перемешивают, набирают жидкость в лейкоцитарный смеситель (меланжер) до метки 1, а до метки 11 — изотонический раствор натрия хлорида, предварительно окрашенный раствором метиленового синего. Встряхивают 1—2 мин и получают разведение пробы в 10 раз.

В камеру с сеткой Горяева под покровное стекло вносят 1 каплю жидкости (первую каплю выдувают на вату). Инфузии подсчитывают в 100 больших квадратах. Общее количество инфузорий в 1 мм^3 (1 мкл) определяют по формуле

$$x = AC/nSh, \text{ т. е. } x = A \cdot 25,$$

где x — количество инфузорий в 1 мм^3 (1 мкл); A — количество подсчитанных инфузорий; C — разведение пробы; n — количество квадратов, в которых подсчитывали инфузории (100); S — площадь одного квадрата (1/25); h — высота камеры (0,1).

Количество инфузорий в 1 мл содержимого рубца определяют по формуле $x = A \cdot 1000$, ибо $1 \text{ мл} = 1000 \text{ мкл}$.

В 1 мл жидкости рубца находится от 500 тыс. до 1,2 млн инфузорий. Количество их уменьшается при различных патологиях. Особенно мало инфузорий (70—100 тыс./мл) при смещении сычуга (А. В. Чуб, 2002).

Подсчет бактерий. Бактерии играют важную роль в процессах пищеварения жвачных животных. Они подвергают ферментному расщеплению целлюлозу (основной компонент грубых кормов), крахмал, моносахариды, кислоты (молочную, янтарную, муравьиновую), липиды, принимают участие в превращении азотистых соединений. Наряду с основными видами существует ряд бактерий, которые не имеют функционального значения в рубцовом пищеварении, а попадают в рубец с кормом и водой.

Чисто рубцовые бактерии должны отвечать определенным требованиям: 1) выделенные из рубца микроорганизмы должны быть анаэробными; 2) бактерии должны присутствовать в рубце в количестве не менее чем 1 млн в 1 мл содержимого; 3) по 10 штаммов данного вида бактерий должно быть выделено не менее чем от двух животных; 4) культуры данного вида бактерий должны присутствовать в рубце животных различных географических зон; 5) конечные продукты обмена веществ полученных культур микроорганизмов должны быть типичными Рубцовыми метаболитами.

В 1 мл рубцового содержимого присутствует 10^9 — 10^{10} бактерий.

Реактив: 0,85%-ный раствор NaCl.

Оборудование: микроскоп; микропипетки.

Ход определения. Содержимое рубца разводят стерильным изотоническим раствором натрия хлорида в соотношении 1:1000. Микропипеткой отбирают 0,01 мл этого разведения и профламбированной петлей размазывают его на предметном стекле на площади 1 см². Как правило, делают 3—4 мазка. Мазок высушивают над пламенем спиртовки и красят по Граму. Готовый мазок исследуют под иммерсией. Подсчитывают бактерии в определенном количестве типичных полей зрения. В связи с тем что мазок не всегда получается равномерным, поля зрения для подсчета необходимо брать по всему мазку, а лучше по диагонали. В каждом мазке подсчитывают не менее 10 полей зрения и выводят среднее значение для одного поля.

Чтобы определить общее количество бактерий всего мазка, уточняют площадь поля зрения микроскопа. Так как площадь круга составляет πr^2 , то необходимо измерить диаметр поля (в мм) с помощью объект-микрометра. Площадь мазка 100 мм², деленная на площадь поля зрения под микроскопом, равна количеству полей зрения в мазке. Поскольку мазок приготовлен из 0,01 мл жидкости, то количество полей зрения в мазке, умноженное на 100, дает количество полей зрения в 1 мл рубцовой жидкости, разведенной до 10^3 (1:1000). Все эти арифметические подсчеты можно объединить формулой $10\,000 : 3,1417 \cdot z^2$, где 3,1417 — коэффици-

ент, на который следует умножить среднее количество клеток в поле зрения микроскопа.

Таким образом, подсчитав необходимое количество полей зрения (по 10 в трех мазках), суммируют общее количество бактерий и вычисляют среднее количество бактерий в одном поле зрения. Полученное число умножают на коэффициент и степень разведения. Коэффициент остается постоянным до тех пор, пока объектив, положение тубуса и окуляр микроскопа не меняются.

Пример. Определяем коэффициент. Диаметр поля зрения микроскопа 0,132 мм, соответственно его радиус — 0,066 мм, а z составляет 0,004356:

$$\frac{0,000}{3,1417 \cdot 0,004356} = \frac{0,000}{0,0137}$$

Подсчитав 30 полей зрения (по 10 в трех мазках), определили, что в поле зрения в среднем находится 15 микробных клеток.

Соответственно $1^5 \cdot 1 \cdot 10^9 \cdot W00 = 10,9 \text{ млрд} = 1,09 \cdot 10^{10}$ микробных клеток в 1 мл рубцовой жидкости.

6.10. НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ ИССЛЕДОВАНИЯ СОДЕРЖИМОГО РУБЦА

Исследуя содержимое рубца, необходимо учитывать состав рациона, время взятия пробы после кормления и технику зондирования.

При кормлении грубоволокнистыми кормами состав содержимого рубца относительно постоянен в течение 1 ч после кормления. Введение в рацион богатых крахмалом комбикормов изменяет ферментативные процессы в рубце. В нем происходит интенсивное образование ЛЖК за счет пропионовой и масляной, появляется молочная кислота. Аналогичные изменения происходят при скармливании животным избыточного количества легкоусвояемых углеводов (сахарная и полусахарная свекла, патока), но в таком случае происходит образование молочной кислоты. Изменяется качественный и количественный состав микроорганизмов: уменьшается количество грамотрицательных бактерий, увеличивается количество грамположительных.

При анализе результатов исследований содержимого рубца следует учитывать время последнего кормления, поскольку в первые 2—3 ч после приема корма в преджелудках происходит активный гидролиз, что вызывает возрастание количества ЛЖК, аммиака, хлора, калия, соответственно величина водородного показателя (рН) и ионов натрия понижается. Позже, вследствие постепенного затухания ферментативных процессов в рубце и активного усвое-

ния продуктов гидролиза, происходит понижение концентрации ЛЖК (особенно пропионовой), аммиака, хлора, калия и повышение рН и содержания натрия. Поэтому при исследовании содержимого рубца пробы следует отбирать в одно и то же время после кормления. Вследствие зондирования животных для получения проб содержимого рубца раздражаются ротовая полость, глотка, кардиальный сфинктер, что вызывает усиленную саливацию. Известно, что слюна щелочной реакции (рН 8,7—9,2), поэтому ее примесь в содержимом рубца может стать причиной изменения рН и других показателей проб. Изменение рН в пробе с примесью слюны особенно показательны при ацидотическом состоянии рубца. Учитывая, что максимальное количество слюны поступает в пробу содержимого в начале зондирования, первые его порции (200 мл) для анализов использовать не следует.