

УКРАЇНСЬКА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК
ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ І БІОХІМІЇ ТВАРИН

На правах рукопису

ХІРІВСЬКИЙ
Петро Романович

УДК 576.8.095+636.2:591.132+
546.173+612.015.33

ЗАКОНОМІРНОСТІ ПЕРЕТВОРЕННЯ НІТРАТІВ В ПЕРЕДШЛУНКАХ
ТА ВИДІЛЕННЯ ІХ З ОРГАНІЗМУ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

03.00.13 - фізіологія людини і тварин

Автореферат
дисертація на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Львів - 1994



00778661 (Z)

Робота виконана в лабораторії біохімії тварин Української академії аграрних наук.

Науковий керівник: доктор біологічних наук ПУПІН І.Г.

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук ТРЕТЕВИЧ В.І.,
доктор медичних наук, професор ШОСТАКОВСЬКА І.В..

Ведуча організація: Львівська академія ветеринарної медицини.

Захист дисертації відбудеться «21» серпня 1994 р.
в 10⁰⁰ годин на засіданні спеціалізованої ради Д.020.І4.01 в
Інституті фізіології і біохімії тварин Української академії аграрних наук.

Адреса інституту: 290034, м. Львів, вул. В.Стуса, 38.

З дисертацією можна ознайомитись в бібліотеці Інституту фізіології і біохімії тварин Української академії аграрних наук.

Автореферат розісланий «20» серпня 1994 р.

Вчений секретар
спеціалізованої ради
кандидат біологічних наук

КИРИЛІВ Я.І.

ЛНБ ім. В. Стефаника
АН України

АВ - 30.253

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Важлива роль у збільшенні виробництва кормових і продовольчих культур відводиться хімізації землеробства. Інтенсивність використання азотних добрив набуває все більшого практичного значення, оскільки сприяє зростанню врожаю, підвищенню вмісту в кормах сирого протеїну, каротину, тощо і відповідно збільшенню продуктивності тварин (Зейналов Ю.В., 1981, Гончаренко В.Е., 1990).

Одночасно з цим застосування високих доз азотних добрив, недотримання технології внесення їх в ґрунт під рослини, супроводжується появою надмірної кількості нітратів у кормах, згодовування яких нерідко викликає токсикози у тварин, а також обумовлює присутність їх в одержуваній тваринницькій продукції (Костина В.Ф., 1977, Pristas J., 1982, та інші).

На сьогодні наявна значна кількість праць, що свідчать про негативний вплив нітратів і їх похідних на життєво важливі функції і продуктивність тварин (Лейтес Л.Я., 1979, Хмельницький Г.А., 1980, Dumitrescu J., 1984, Вракин В.Ф., 1984 і інші).

Велика небезпека полягає і в тому, що переходячи у тваринницьку продукцію нітрат-нітриди є шкідливими і для людей (Бурякова А., 1980, Bielak F., 1980, Щидловская В.П. 1990 і інші).

Механізм токсичної дії нітрат-нітритів пояснюють насамперед здатністю нітриду утворювати метгемоглобін (Николов И., 1981, Вовк Д.М. 1983, Косака Н. 1987 і інші). В останні десятиріччя значна увага приділяється нітрат-нітридом, як попередникам утворення канцерогенних N-нітрозамінів (Brookhoven L.M., 1978, Рубенчик Б.Л., Хмельницький Г.А., 1988, Боговский П.А., 1990).

Проте накопичені дані і розкриті механізми не в стані пояснити негативного впливу нітрат-нітритів на життєві функції організму тварин, а також людини. Вони мають більш широкий спектр. Недостатньо також вивчені механізми метаболізму нітрат-нітритного азоту в організмі тварин.

Гостро стоїть питання одержання екологічно чистих продуктів тваринництва (особливо молока для дієтичного харчування). Недостатньо вивчено умови, при яких можна отримувати вільними від забруднення нітрат-нітридами продукти.

Отже, актуальність з'ясування цих питань зумовлена недостатнім вивченням закономірностей перетворення нітрат-нітритів в пе-

редшлунках жуйних та їх токсичної дії на організм тварин. Недостатньо також досліджена динаміка та шляхи виведення нітрат-нітритного азоту з організму тварин.

Тому існує потреба продовження досліджень фізіолого-біохімічних основ з цих питань і одержання нових даних про закономірності метаболізму нітрат-нітритних форм азоту в шлунково-кишковому тракті жуйних, умов їх накопичення і виведення з організму худоби.

Мета і завдання досліджень. У зв'язку з вищесказаним метов нашої роботи було - дослідження можливих шляхів перетворення нітратів у травному тракті, а також закономірностей їх виведення з організму великої рогатої худоби.

Завдання, на які були спрямовані наші дослідження, зводилися до вивчення:

- можливості альтернативного перетворення нітратів у складному шлунку (рубці, сичузї) великої рогатої худоби;
- інтенсивності перетворення нітрат-нітритів у сичузї жуйних з утворенням аміаку;
- динаміки вмісту нітрат-нітритів у шлунково-кишковому тракті, крові, сечі та молоці худоби при разовому і тривалому надходженні нітрату в організм у підвищених кількостях;
- умов одержання екологічно чистої від нітрат-нітритів тваринницької продукції (молока, м'яса).

Наукова новизна. В результаті проведеної роботи виявлена альтернативність метаболізму нітрату у складному шлунку жуйних. Поряд з перетворенням нітрат-нітритів до аміаку також встановлено їх розщеплення з утворенням газоподібних (легких) азотовмісних продуктів (окислів азоту). Експериментально доведено відновлення нітрату і нітриту до аміаку в хімусі сичуга великої рогатої худоби.

Одержані нові і додаткові дані щодо динаміки вмісту нітрат-нітритних форм азоту в травному тракті, крові і виведення їх з організму тварин з сечею, калом і молоком, з також накопичення цих сполук в тканинах окремих функціонально різних органів при нітратних навантаженнях. Показана фізіологічна роль жовчі в процесах обміну нітрат-нітритів в організмі худоби.

Встановлено, що з сечею виводиться основна частка неметаболізованих нітрат-нітритів, що може служити тестом при діагностиці ступеня нітрат-нітритних токсикозів.

У дослідженнях на коровах показано, що з молоком виводиться

тільки незначна частка із тієї кількості нітрат--нітритів, яка надходить з кормами раціону. Але в молоці виявляються нітрити, які можуть бути попередниками N-нітрососполук. Визначені мінімальні рівні нітратів у кормах, при яких у молоці ці сполуки не реструктуряться. Встановлено, що молоко ранішнього удою містить менше нітрат-нітритів у порівнянні з молоком обіднього і вечірнього удоїв.

Науково-практичне значення роботи. На основі одержаних даних показано, що дисиміляційне відновлення нітратів у складному шлунку жуйних призводить до утворення окислів азоту, що є можливою однією з причин нітратного отруєння.

Рекомендується використання визначення нітрат-нітрит-іонів у сечі тварин, як тестового показника при нітрат-нітритному отруєнні.

Для дієтичного харчування пропонується використовувати молоко ранішніх удоїв, як екологічно чистіше в порівнянні з обіднім чи вечірнім.

Апробація роботи. Результати роботи доповідалися на VII Всесоюзному симпозіумі "Канцерогенные N-нитросоединения и их предшественники - образование и определение в окружающей среде" - (Таллін, 1990 р.), Республіканській науковій конференції "Біотехнологічні дослідження і перспективи їх розвитку" - (Львів, 1990 р.), Всесоюзній координаційній нараді "Итоги научно-исследовательских работ по зоогигиене за 1986-1990 годы и задачи НИР на период 1991-1995 годы" - (Львів, 1990 р.), Республіканській конференції "Проблема нитратов в животноводстве и ветеринарии" - (Київ, 1990 р.), конференції молодих науковців Українського НДІ фізіології і біохімії сільськогосподарських тварин - (Львів, 1992 р.).

Публікації. За результатами досліджень опубліковано 10 наукових робіт у вигляді статей і тез.

Структура і обсяг роботи. Дисертація містить 145 сторінок машинописного тексту і складається із вступу, огляду літератури, обговорення одержаних даних, висновків і практичних пропозицій, списку цитованої літератури (242 джерела). Експериментальні дані представлені 6 малюнками та 31 таблицями.

Матеріал і методи досліджень. Дослідження проводилися *in vitro*, методом інкубацій, і *in vivo* - безпосередньо на коровах чи бичках, з добре сформованим рубцевим травленням. Матеріалом для досліджень служили кров, вміст рубця, хімус сичуга та дванадцяти-

палої і голодної кишок, молоко, сеча та кал. Проведено дванадцять дослідів.

Вивчення можливості перебігу альтернативного дисимілятивного перетворення нітрату у вмісті складного шлунку великої рогатої худоби, з утворенням газоподібних азотемісних продуктів, проводили як методом інкубацій, так і безпосередньо на бичках з фістулами рубця.

Для вловлювання вказаних продуктів, які виділялися при інкубації вмісту рубця чи хімусу сичуга використовували систему пасток з лужним і кислим середовищем, сполучених послідовно. Мічений нітрат натрію вносили в інкубовані проби з розрахунку 7,5 мкмоль на 1 мл інкубату. Збагачення азоту нітрату у всіх дослідах важким ізотопом [^{15}N] становило - 96,4 ат.%. Підкислення вмісту рубця до рН 6,0 проводили молочною кислотою. Показник рН середовища досліджуваного матеріалу визначали іонометром ЭВ-74. Тривалість інкубації складала дві години.

В дослідах, які проводили безпосередньо на бичках, рубцеві фістули з'єднували з такими ж пастками, як в інкубаційних дослідженнях. Пастки щогодини забирали для аналізу, замінюючи їх новими протягом шести годин. Дослідні тварини окрім нітратів кормів раціону, одержували нітрат натрію (по 0,2 г на кг маси тіла), який задавали через фістулу рубця. Наступні досліди по вивченню інтенсивності утворення газоподібних азотемісних продуктів у рубці, в залежності від складу раціону, проводили на бичках з постійною фістулою рубця з використанням вже вказаних пасток, а в деяких випадках застосовували пастку з реактивом Грісса. Виділювані азотемісні гази із рубця проходили через пастки впродовж двох годин, а в частині дослідів проводили ще дві зміни пасток (на другій і четвертій годині). Кількість азоту газоподібних азотемісних продуктів, уловлюваних пастками, у всіх наведених вище дослідженнях визначували титриметричним методом після його відділення у вигляді амонію із лужного середовища пароводною дистиляцією за пониженого тиску, і використання, як відновника гранул металічного цинку.

Інтенсивність перетворення нітрату і нітриту у хімусі сичуга і тонкого кишечника з відновленням до аміаку вивчали методом інкубацій. Мічений нітрат і нітрит вносили з розрахунку 7,5 мкмоль на 1 мл хімусу. Тривалість інкубації складала дві години з відбором контрольних проб на 0,5-1 хв і дослідних - через 2 години. Аміак визначали методом мікродифузної відгонки з використанням

парафінових чашок типу Конвея (за прописом Кондрахіна І.П., 1985).

У всіх інкубаційних дослідженнях, де використовувалися мічені нітрат чи нітрит натрію в якості субстратів, після кількісного визначення вмісту азоту визначуваних продуктів їх піддавали аналізу на ізотопний склад з допомогою маспектрометра ММ-2101В (Бронников В.И., 1968).

З метою одержання експериментальних даних щодо переміщення нітрат-нітритів із переддільників великої рогатої худоби у тонкий відділ кишечника, дослідження проводили на поліфістульному бичку з анастомозами на двенадцятипалій і голодній кишках, якому вживали з водним розчином нітрат натрію по 0,1 і 0,2 г на 1 кг маси тварини. Зразки хімусу ІЗ-палої і голодної кишок, крові та сечі відбирали впродовж 6-ти годин через кожні дві години після згодовування кормів раціону і навантаження нітратом, і визначали в них рівні нітрат-нітритів.

Вивчення динаміки концентрації нітрату і нітриту у вмісті рубця і крові та виділення їх з сечею при разовому навантаженні нітратом проводили на шести бичках з фістулами рубця. Відбирали зразки крові, вмісту рубця і сечі, в яких визначали вміст нітрат-нітритів. Крім цього, в пробах крові визначали вміст метгемоглобіну (за Кушаковским М.С., 1968).

Для з'ясування закономірностей впливу короткочасного нітратного навантаження на рівень нітрату і нітриту в окремих органах та динаміку його виділення з молоком і сечею проведено два досліді: перший - на 4, а другий - на 8 коровах, вибракуваних і призначених для реалізації на м'ясо. Дослідним коровом егодувували у першому випадку протягом десяти діб з кормами раціону добавку по 0,2 г, а у другому - на протязі 6 діб по 0,3 г - нітрату натрію на 1 кг живої маси тіла. В першому досліді від тварин кожного дня впродовж 10 діб відбирали зразки молока (обіднього, вечірнього і ранішнього надоя), та сечі і калу при ранішній годівлі. Після забою тварин як у першому, так і у другому досліді у них відбирали зразки тканин. У всіх пробах визначали вміст нітрат-нітритних форм азоту.

При вивченні впливу нітратного навантаження на фізіолого-біохімічний статус і інтенсивність росту (продуктивність) бичків, утримуваних на сечовинномісному раціоні, проведено дослід (тривалістю понад два місяці. Тварини усіх п'яти груп утримувалися в однакових умовах за винятком того, що в основний раціон другої-

п'ятої груп бичків вносили нітрат натрію (0,2 г на 1 кг живої маси). Бичкам четвертої і п'ятої груп у раціон вводили сечовину (0,21 г/кг живої маси), а третьої і п'ятої ще додавали по 200 г на голову в день бурякової меляси. Зважування тварин проводили при формуванні груп і на 79 день досліду. Зразки крові і сечі від п'яти із дев'яти тварин кожної групи брали для досліджень у підготовчий період і на 22 та 62-й дні дослідного періоду. В крові визначали вміст нітрат-нітритів, сечовини (Ceriotti C., 1963), у сечі нітратів, нітритів і сечовини.

При вивченні динаміки зв'язку між рівнем нітрат-нітритного азоту в кормах раціону корів, у крові, молоці та сечі було проведено два досліди: один на семи коровах при зимово-стійловому їх утриманні, другий - на десяти коровах при весняно-літньому утриманні.

Зразки молока (обіднього, вечірнього, ранішнього удоїв), сечі і крові, а також кормів раціону відбиралися один-два рази у місяць, і в них визначували кількість нітрат-нітритів. Перед кожним відбором зразків молока проводився контрольний удій.

У всіх наведених вище дослідженнях визначення нітрату (NO_3^-), і нітриту (NO_2^-) проводили фотокolorиметричним методом з використанням реакції типу Грісса (за прописом Кондрахіна І.П., 1985).

Одержані цифрові дані піддавали статистичній обробці.

РЕЗУЛЬТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Реальність альтернативного шляху метаболізму нітрату у рубці великої рогатої худоби, під дією симбіотичної асоціації мікроорганізмів його вмісту, - була доведена в дослідах, що проводилися як методом інкубації, так і безпосередньо на тваринах. Так, у першій серії досліджень, з застосуванням міченого (^{15}N)-нітрату натрію за умов *in vitro* показано, що такий процес відбувається у вмісті рубця. При цьому утворювалася помітна кількість газоподібних азотвмісних сполук, походження яких з нітрату підтверджується відносно значним накопиченням в їх азоті мітки нітрату.

За умов підкислення вмісту рубця значних змін, щодо інтенсивності відновлення нітрату не виявлялось.

Друга серія досліджень *in vitro*, з вивчення трансформації нітратів з утворенням газоподібних азотвмісних сполук, була спрямована на виявлення перебігу цього процесу у хімусі сичуга великої рогатої худоби, за його несприятливого, кислого значення рН,

для дії нітрат-редуктази, а також з метою порівняння інтенсивності дисимілятивного перетворення нітрату в рубці та сичугі тої ж тварини.

У наслідок показано (таблиця I), що цей процес має місце і у хімусі сичуга. Слід також зазначити, що у випадках з хімусом сичуга продукування газоподібних продуктів із нітрату навіть дещо перевищувала їх кількість, утворювану пробами вмісту рубця.

Таблиця I

Кількість азоту вловлюваних газоподібних продуктів і нагромадження в ньому мітки із внесеного [^{15}N] нітрату при інкубаціях вмісту рубця або хімусу сичуга, $M \pm m$, $n=6$

Застосовувані :		Визначувані показники	
	:	Концентрація,	: Кількість ^{15}N , % від
пастки	:	мг N/проба	: внесеного
Вміст рубця, рН 6,30 (6,08-6,55)			
З кислим середовищем	0,0012 \pm 0,0001	x/	-
	0,0366 \pm 0,0040		0,215 \pm 0,032
З лужним середовищем	0,0016 \pm 0,0003	x/	-
	0,0507 \pm 0,0079		0,165 \pm 0,032
Хімус сичуга, рН 3,10 (2,81-3,50)			
З кислим середовищем	0,0027 \pm 0,0001	x/	-
	0,0361 \pm 0,0070		0,302 \pm 0,773
З лужним середовищем	0,0030 \pm 0,0001	x/	-
	0,0356 \pm 0,0050		0,192 \pm 0,057

Примітка: x/ - контрольні проби, інкубовані без внесення нітрату.

Отже, за даними досліджень *in vitro* встановлено, що в процесі трансформації нітратів крім асимілятивного шляху відновлення до аміаку, проходить їх дисиміляційне розщеплення з утворенням азотвмісних газоподібних продуктів.

Дослідження, які проводили безпосередньо на тваринах, підтвердили дані інкубаційних досліджень про дисимілятивний шлях ме-

таболізму нітратів, що надходять у передшлунки жуйних.

Слід також зазначити, що газоподібні азотвмісні продукти утворювалися як у контрольних тварин (які отримували тільки корми раціону), так і в дослідних бичків, яким додатково через фістулу вводили водний розчин нітрату натрію. Але у дослідних тварин цих сполук продукувалося значно більше.

Помічена також суттєва різниця щодо динаміки накопичення газоподібних азотвмісних сполук у різних пастках інкубаційної системи. В пастках з кислим середовищем найбільше цих продуктів уловлювалось до 4 години, досягаючи найвищих показників. У лужних пастках вони своєї верхньої границі сягали на 3 годині.

У подальших, проведених нами дослідженнях, з вивчення дисиміляційного шляху трансформації нітрату, ми пробували прослідкувати вплив складу раціону, на інтенсивність їх утворення.

Тут слід зазначити, що незалежно від істотних різниць у наборі згодовуваних кормів, із низьким, чи дуже малим природним вмістом у них нітрат-нітритних форм азоту, - відмінностей, щодо інтенсивності утворення газоподібних (летких) азотвмісних продуктів у передшлунку не встановлено. Характерним за умов проведення цих досліджень було досить помітне накопичення азоту газоподібних продуктів у лужних пастках, тоді як у пастках з кислим середовищем, уловлювання визначуваних продуктів не реєструвалося. Це може вказувати на неоднорідність продуктів дисиміляційного перетворення нітратів.

Припускаємо, що споміж уловлюваних пастками газоподібних продуктів, переважає двоокис азоту. Він на відміну від окису і закису азоту взаємодіє з розчинами лугів і кислот. У лужному середовищі при цьому відбувається накопичення нітрат-нітритних аніонів. При взаємодії з сірчаною кислотою двоокис азоту утворює нітросірчану кислоту.

За таких же ж умов годівлі, але при модельному навантаженні нітратом натрію, із дев'яти проведених досліджень лише у чотирьох спостерігалось ярке виявлення позитивної реакції на присутність нітритних іонів. Слід однак підкреслити, що для перебігу реакції на нітрита, необхідні певні умови. Але у деяких тварин вияв якійсь реакції на нітрита і одночасне вловлювання пастками газоподібних азотвмісних сполук вказують на можливість трансформації цих сполук у нітрита. Ці дані певною мірою співпадають з даними літератури (Тиунов Л.А., 1991) стосовно до дихальної системи і крові, які свідчать, що NO_2 , попадаючи в легені, має властивість

взаємодіяти з ліпідними і білковими компонентами з утворенням нітратів і нітритів. У крові NO_2 трансформується в нітрит.

Експериментально доведено, що значна частка неметаболізованих нітрат-нітритних форм азоту з передшлунків у процесі травлення переходить у подальші відділи шлунково-кишкового тракту, а також водночас поступає у кров'яне русло.

Вивчаючи подальшу міграцію нітратів і нітритів у шлунково-кишковому тракті, було звернуто увагу на потребу з'ясування можливості трансформації зазначених форм азоту у сичугі з утворенням аміаку, із-за відсутності таких даних.

У результаті в дослідях *in vitro* з хімусом сичуга, встановлено, що процес перетворення нітрату і нітриту супроводився підвищенням рівня аміаку в інкубованому хімусі та накопиченням у ньому відносно значної кількості мітки (азот-15). Причому цей процес інтенсивніше відбувався у випадках з нітритом (таблиця 2).

Таблиця 2

Рівень азоту аміаку і нагромадження в ньому азоту-15 при інкубації хімусу сичуга бичків з міченим нітратом або нітритом натрію, $M \pm m$, $n=5$

Додані субстрати,	Визначувані показники			
	концентрація	збагачення,	кількість $[^{15}\text{N}]$,	
7,5 мкмоль/мл: N-NH_3 ,	атомний % $[^{15}\text{N}]$: % від внесеного			
	$M \pm m$	$M \pm m$	$M \pm m$	$P <$
$[^{15}\text{N}]$ -нітрат натрію	$0,117 \pm 0,010$	$0,126 \pm 0,007$	$0,135 \pm 0,010$	x 0,02
$[^{15}\text{N}]$ -нітрит натрію	$0,115 \pm 0,012$	$0,230 \pm 0,035$	$0,234 \pm 0,032$	x 0,02

Примітка: в чисельнику - на 0,5-1 хв; у знаменнику - на 120 хв інкубації.

Отже, одержані дані, вказують на участь сичуга у перетворенні нітрат-нітритних форм азоту за умов їх надходження у шлунково-кишковий тракт жуйних тварин.

У наступних дослідженнях, на поліфістульному бичку, динаміки надходження частки нетрансформованого у складному шлунку жуйних нітрату у кишечник, було доведено їх переміщення з хімусом і появу у дванадцятипалій та голодній кишках.

Навантаження організму бичка нітратом натрію (0,1 г на кг маси тіла) зумовлювало зростання у хімусі тонкого відділу кишечника рівнів нітрат-нітрит-іонів уже на другій годині після введення нітрату. Тоді ж реєструвалося і збільшення концентрації цих ополук в крові та виділюваній сечі, яке продовжувалося і на четвертій. А за умов навантаження нітратом по 0,2 г на 1 кг маси тварини - і на шостій годині.

Водночас слід зазначити, що в контролі - при надходженні в організм тварини нітратів наявних в кормах раціону, а у досліді ще з добавками різних доз нітрату натрію, в останньому випадку в хімусі голодної кишки реєструвалися дещо вищі концентрації нітрат-іону в порівнянні з таким дванадцятипалою кишки. Ця закономірність спостерігалася і в дослідях інших авторів (Гунчак В.М. 1990, Гуфрій Д.М., 1990). Тому можна припустити, процес зворотного надходження нітрат-іону з крові через стінку голодної кишки в хімус.

Дослідження здатності метаболітичних властивостей мікрофлори хімусу кишечника, щодо трансформації нітратів і нітритів, проведені методом інкубацій з міченим нітратом і нітритом, показали (таблиця 3), що і в хімусі тонкого відділу кишечника проходить

Таблиця 3

Динаміка вмісту амонійного азоту і його збагачення азотом-15 при інкубації хімусу дванадцятипалої+голодної кишок бичків з міченими субстратами, M±m, n=6

Додані субстрати	:Тривалість:інкубації, хв	:Концентрація: N-NH ₃ , мг/100 мл	:Збагачення, ат% [¹⁵ N]	:Кількість : [¹⁵ N], % від внесеного
[¹⁵ N]-нітрат натрію	0 120	0,457±0,018 0,469±0,052	0,031±0,004 0,160±0,028	0,121±0,022 0,673±0,128
P<		0,5	0,01	0,01
[¹⁵ N]-нітрит натрію	0 120	0,325±0,045 0,539±0,039	0,037±0,070 0,256±0,079	0,074±0,007 0,875±0,097
P<		0,01	0,05	0,001

відновлення цих сполук з утворенням аміаку. Про це переконливо свідчить досить значне накопичення в ньому азоту-15 із мічених нітрату і нітриту.

Слід однак зазначити інтенсивніше накопичення мітки в аміаку з нітриту, ніж з нітрату. Це зокрема може свідчити про вищу нітротредуктазну активність мікроорганізмів екосистеми тонкого відділу кишечника в порівнянні з такою ж нітратредуктазною активністю.

Отже, трансформація нітрат-нітритів шляхом відновлення до аміаку продовжується і в пострумінальних ділянках травного тракту великої рогатої худоби, але із значно меншою інтенсивністю, ніж у передшлунках.

Вивчення закономірностей міграції і змін вмісту нітрат-нітритів в організмі великої рогатої худоби у дослідях на бичках, - за умов визначення погодинної динаміки накопичення нітрат-нітритів у вмісті рубця, крові, сечі, - встановлено (таблиця 4), що їх рівні в основному знаходились у прямій залежності від кількості надходження цих сполук в організм тварин. Так, за навантаження організму тварин нітратом натрію (0,2 г на 1 кг маси) вміст нітрат-нітрит-іонів у досліджуваних біологічних об'єктах різко підвищувався, проти такого вмісту у контрольних тварин.

При цьому у динаміці накопичення нітратів і нітритів у вмісті рубця, крові і сечі виявлені істотні відмінності. В рубці максимальні значення рівнів нітрату реєстрували на другій годині, в крові - на шостій годині, а в сечі - в першій трьохгодинній відрізок часу від початку навантаження нітратом. Причому у сечі впродовж усього дослідження рівень нітрат-нітритних форм азоту був на досить високому рівні. Це вказує на спроможність сечевидільної системи відносно швидко і в значній кількості виводити неметаболізовані нітрат і нітрит із організму, підтримуючи його гомеостаз. Динаміка накопичення метгемоглобіну в крові в основному співпадала з такою ж динамікою накопичення в ній нітратів і нітритів. Так, зокрема, як згадувалось, в крові найвищий рівень нітрат-нітрит-іонів реєструвався на шостій годині з моменту поступлення цих сполук в організм худоби, а через 12 годин, їх концентрація поверталася до вихідного рівня.

Таким чином, отримані дані свідчать про існування позитивного зв'язку між рівнем нітратів у кормовому раціоні та їх вмістом у рубці, крові і сечі.

Таблиця 1.4

Динаміка вмісту метгемоглобіну в крові та кількості нітрат-нітритів у вмісті рубця, крові і сечі бичків при разовому нітратному навантаженні, мг/л, М т, n=6

Час відбо- разків, години	Метгемог- лобін, % від гемог- лобіну	Кров		Вміст рубця		Сеча	
		NO ₃ ⁻	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻	NO ₂ ⁻
До наван- таження	4,69±0,37	1,66±0,06	0,34±0,05	1,41 0,07	0,40 0,03	4,40±0,24	0,74±0,05
Через 1	-	-	-	3,74±0,55 ^{xx}	0,45±0,45	-	-
2	8,27±0,59 ^{xxx}	2,61±0,43	0,64±0,10 ^x	9,13±0,42 ^{xxx}	1,38±0,03 ^{xxx}	-	-
3	-	-	-	5,88±0,65 ^{xxx}	2,02±0,12 ^{xxx}	11,20±0,54 ^{xxx}	2,74±0,37 ^{xxx}
4	10,12±0,40 ^{xxx}	3,52±0,79 ^x	0,79±0,05 ^{xxx}	5,01±0,27 ^{xxx}	1,85±0,05 ^{xxx}	-	-
5	-	-	-	4,49±0,63 ^{xxx}	0,83±0,02 ^{xxx}	-	-
6	11,40±0,43 ^{xxx}	6,46±0,02 ^{xxx}	1,24±0,13 ^{xxx}	2,38±0,06 ^{xxx}	0,81±0,06 ^{xxx}	9,71±0,86 ^{xxx}	1,12±0,11 ^{xx}
12	-	-	-	1,65±0,13 ^{xxx}	0,36±0,04	5,44±0,07 ^{xx}	0,83±0,10
24	7,88±0,53	2,42±0,04	0,39±0,03	1,51±0,13	0,40±0,03	4,35±0,33	0,72±0,06
48	4,83±0,53	2,30±0,13	0,35±0,06	1,61±0,05	0,43±0,03	4,50±0,26	0,82±0,08

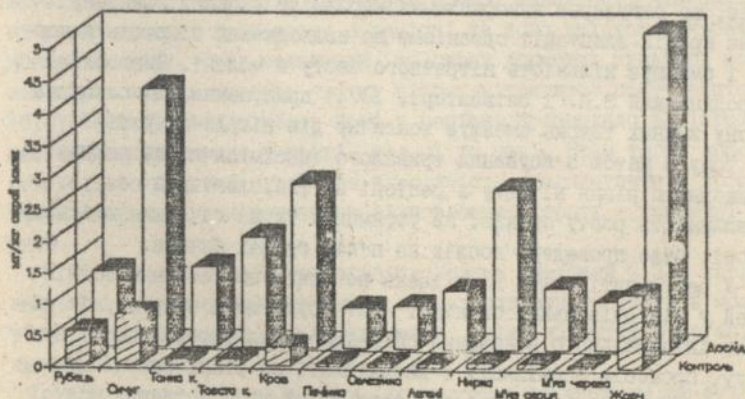
Примітка: P<0,05 - x, P<0,001 - xx, P<0,001 - xxx.

В досліді проведеному на коровах, в якому вивчали щоденні виділення нітрат-нітритного азоту з молоком і сечею, а також порівняли накопичення цих сполук у тканинах окремих органів тварин, за десятиденного модельованого навантаження тварин нітратом натрію (0,2 г на 1 кг маси тіла), встановлена недостатність бар'єрної функції молочної залози корів, щодо пропускання із крові в молоко нітрат-нітритних форм азоту. Загалом показано, що з молоком корів виводиться порівняно незначна кількість нітрат-нітритів. Основна найбільша частка цих сполук виводилася з сечею. Це, як і у попередньому досліді, вказує на провідну роль сечевидільної системи у виведенні нітрат-нітритів, із організму тварин.

Аналіз результатів, одержаних за дослідження тканин деяких органів корів (селезінка, печінка, м'яз серця, поздовжній м'яз черева, легені, жовч), на вміст у них залишку нітрат-нітритів, показав, що ці сполуки у відносно значних кількостях можуть накопичуватися в них.

Важливо зазначити також порівняно високий рівень нітритів в жовчі, тоді коли в інших органах він був низький.

Значно чіткіші особливості щодо накопичення нітрат-нітритів в тканинах функціонально різних органів були виявлені у корів іншого досліді (за умов шестиденного навантаження нітратом натрію, 0,3 г кг^{-1} живої маси, малюнок I).



Малюнок I. Вміст нітрат-іону в тканинах органів корів.

Отримані дані засвідчують різну фізіологічну активність органів тварин, щодо здатності кумулювати залишковий нітрат-нітритний азот. Із органів шлунково-кишкового тракту найвищі рівні нітрат-нітритного азоту реєструвалися в стінці сичуга, що може свідчити про значну роль цього органу у метаболізмі нітрат-нітритів, а можливо і всмоктуванні неметаболізованої частки цих сполук через його стінку в кров'яне русло організму тварин.

Серед інших органів, які відбиралися для проведення досліджень, слід зазначити досить значний рівень нітратного азоту в нирках. Це ще раз підкреслює провідну роль сечевидільної системи у виділенні нетрансформованих нітрат-нітритів із організму худоби.

Зареєстрований високий вміст нітратного, а особливо нітритного азоту в жовчі піддослідних корів, підкреслює її важливу роль, як фізіологічного механізму в системі органів кумуляції і виведення цих сполук з організму жуйних тварин. У тваринницькій практиці науково обґрунтовано і рекомендовано для використання синтетичну сечовину (карбамід), як додаткове джерело небілкового азоту раціону жуйних тварин за умови його дефіцитності за перетравним протеїном (Erfe J.D., Makadevan S., 1978, Модянов А.В., 1981, Вридник Ф.І., Пупін І.Г. 1986, і інші).

Проте роль сечовини, як можливого модифікуючого чинника впливу на процеси перетворення нітрат-нітритних форм азоту, ще залишається дуже мало досліджена. Кошаров А.Н. (1978) наприклад, вважає, що регулярне використання карбаміду у складі раціону сприяє кращій адаптації організму до надходження нітратів з кормами і зменшує кількість нітратного азоту в молоці. Висловлене (Скородинський З.П. і співавтори, 1974) припущення, що сечовина раціону жуйних тварин зменшує токсичну дію нітрат-нітритів.

Тому з метою з'ясування тривалого (двохмісячного) впливу підвищеного рівня нітрату в раціоні на фізіологічний статус, інтенсивність росту бичків, за утримання їх на сечовинновмісному раціоні, було проведено дослід на п'яти групах бичків.

У результаті наших досліджень не виявлено істотних відмінностей у відгодівельних бичків I - IV груп, щодо приросту їх маси, як інтегрального показника співвідношення інтенсивності перетравлення, процесів асиміляції і дисиміляції на рівні організму. Водночас константовано вищі прирости живої маси у тварин п'ятої групи (на 17%), які крім основного раціону і добавки нітрату натрію (0,2 г на/кг), отримували добавку сечовини разом з меля-

сою. Це можна пояснити кращим азото-енергетичним збалансуванням раціону бичків.

Навантаження нітратом натрію, зумовлювало істотне зростання концентрації нітрат-нітритів у крові і сечі, проте вірогідних міжгрупових різниць не спричиняло. Така ж закономірність спостерігалася і щодо вмісту в крові і сечі сечовини, в групах тварин яким згодовували карбамід.

Таким чином, з'ясувалося, що надходження в організм тварин нітрату натрію не зумовлювало видимих відхилень у загальному стані тварин і інтенсивності їх росту. Але підвищене надходження нітратів призводить до значного зростання концентрації нітрат-нітритного азоту в крові та сечі бичків. Це підкреслює той факт, що екскреція нітрат-нітритів з сечею є найважливішим шляхом виведення цих сполук з організму худоби, і підтримки його гомеостазу. А також засвідчує і те, що визначення в сечі великої рогатої худоби рівня нітрат-нітритів можна використовувати, як доступний діагностичний тест оцінки ступеня нітратного навантаження.

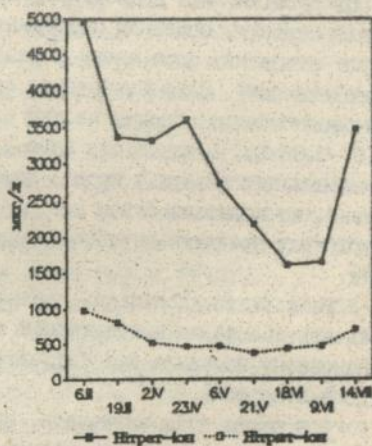
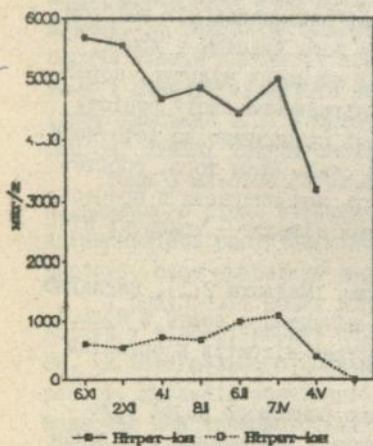
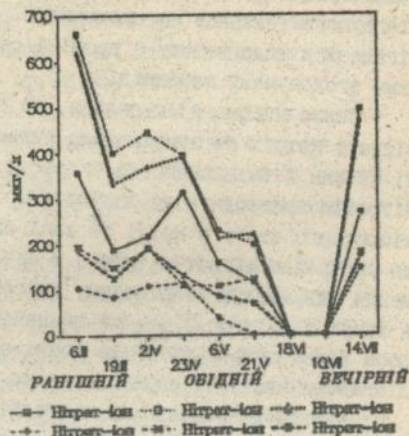
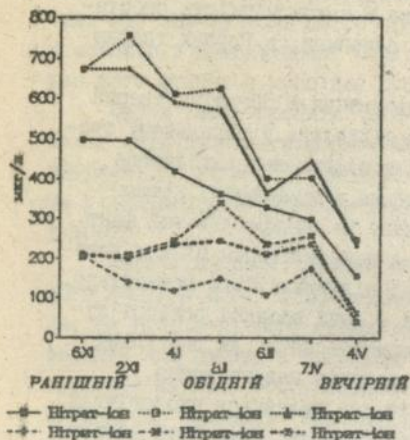
Важливого значення в сьогоdnішній час надається екологічній чистоті продукції тваринництва, зокрема молока, щодо його забруднення нітрат-нітритними формами азоту.

Тому у наступних дослідженнях з'ясували закономірність зв'язків між рівнем нітрат-нітритів у раціоні корів та їх вмістом у крові, молоці і сечі протягом лактації.

Ці дослідди, які проведені у зимово-стіловий і у весняно-літній періоди, показали існування прямої залежності між вмістом нітрат-нітритних форм азоту в раціоні та його вмістом у крові, молоці та сечі. Слід зазначити, що серед кормових культур, кормовий буряк містив основну частку нітрат-нітритного азоту раціону (0,67-0,80 %). Відсутність його у раціоні призводило до істотного зменшення цих сполук у крові, молоці та сечі. Крім того, спостережено, що кормовий буряк має властивість накопичувати в процесі зберігання продукти неповного відновлення нітрату - токсичні нітроти.

Результати досліджень зразків молока (Малюнки 2,3), наглядно свідчать про те що концентрація нітрат-нітритного азоту в молоці в основному залежала від надходження нітрат-нітритів в організм худоби з кормами.

Одночасно слід зазначити, що молоко ранкового надоя було значно чистіше за вмістом нітрат-нітритів у порівнянні з молоком обідного чи вечірнього удоїв. Хоча за динамією змін концентра-



ці цих сполук у молоці усіх надоїв впродовж лактації загалом співпадали.

Важливо підкреслити і той факт, що навіть за концентрації нітратів у раціоні в межах 4,3-4,5 г, присутність нітрат-нітритних форм азоту визначали в молоці у помітних кількостях. Можливо відбувається поступове виведення з організму кумульованих в ньому нітратів.

Зменшення удоїв в останні місяці лактації зумовлювало зменшення виведення нітрат-нітритів з молоком, і тоді ж спостерігалося компенсаторне збільшення виділення із організму нітратів і нітритів сечевидільною системою корів (Малюнки 4,5).

Щодо добової кількості нітрат-нітритів виділюваних із сечею і молоком, то слід зазначити, що з молоком виводиться із організму лактуючих корів порівняно мало (0,3-0,8 %) неметаболізованих нітрат-нітритних форм азоту.

Внаслідок проведених нами, як модельних досліджень так і дослідів безпосередньо на тваринах, одержані експериментальні дані, які мають елементи новизни і розкривають закономірності міграції та біотрансформації нітрату в організмі великої рогатої худоби, що дозволяє зробити наступні висновки.

ВИСНОВКИ

1. У дослідженнях *in vitro* з міченим нітратом та в дослідах, проведених безпосередньо на тваринах (бичках з нітратним навантаженням і без нього), доведена реальність перебігу процесу альтернативного перетворення нітрату асоціацією мікроорганізмів вмісту рубця з утворенням газоподібних азотвмісних сполук (в т.ч. окислів азоту).

2. Показана наявність у хімусі сичуга умов для трансформації нітрату і нітриту як через відновлення до амонію, так і шляхом розщеплення - з утворенням газоподібних продуктів. Цим стверджується фізіологічна участь сичуга у перетворенні нітрат-нітритів, що надходять у травний тракт.

3. Встановлено, що, окрім переходу в кров'яне русло, частина неметаболізованих у складному шлунку великої рогатої худоби нітрат-нітритних форм азоту, досить швидко переміщається з хімусом у тонкий відділ кишечника, де продовжується їх перетворення з відновленням до амонію.

4. Із крові відносно невелика частка нітрат-нітритів накопичується в тканинах функціонально різних органів, але не в однако-

вих залишкових кількостях. Причому, за навантаження нітратом натрію в дозі 30 г/100 кг маси тіла, вміст нітрату і нітриту у тканинах досліджуваних органів худоби був нижчий гранично допустимих концентрацій.

5. Накопичення в жовчі порівняно значної кількості нітрату, а особливо нітриту (за модельованого нітратного навантаження і без нього) вказує на важливу роль функціонування жовчевиділення в системі органів виведення нітрат-нітритів із організму і підтримки його гомеостазу. Припускається важлива роль жовчі в рециркуляції нітрат-нітритних форм азоту і його асиміляції в організмі жуйних тварин.

6. Найбільше неметаболізованого нітрату та нітриту виводиться із організму досліджуваних тварин з сечею, в якій за звичайних умов їх містилося відповідно - 0,77-5,67 мг $\text{NO}_3^-/\text{л}$ і 0,02-0,98 мг $\text{NO}_2^-/\text{л}$, а при навантаженні нітратом натрію - їх кількість зростала відповідно ступеню його величини.

7. Показано, що виведення із організму корів нетрансформованих нітрат-нітритів відбувається і з молоком, що слід розглядати як один з механізмів підтримки його гомеостазу. Вміст нітратів у молоці залежав від рівня їх надходження в організм. У молоці ранішнього надю містилось менше нітратів, ніж у такому із обіднього чи вечірнього надю.

Зі зменшенням добових надюв, а разом з цим зменшенні кількості виведення нітрат-нітритів з молоком, реєструвалось компенсаторне збільшення їх виділення з сечею.

Збільшення надходження нітратів в організм спричинювало погіршення умов для одержання екологічно чистої (вільної від нітратів і нітритів) продукції.

8. Співвідношення нітратів і нітритів у раціоні, рідині рубця, крові, молоці та сечі значно відрізнялися і коливались у різних межах.

9. Встановлено, що на раціоні з підвищеним вмістом нітратів і дефіцитному за протеїном, використання синтетичної сечовини та покращення енергетичного забезпечення, забезпечувало виді природи маси тіла у дослідних бичків, що зумовлювалось кращою адаптацією їх організму до нітратного навантаження.

10. Навантаження нітратом (0,2-0,3 г на/кг) піддослідних тварин у проведених дослідах не зумовлювали видимих клінічних змін їх фізіологічного стану, але супроводилось збільшенням вмісту нітратів і нітритів у біологічних рідинах та тканинах.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ

1. У жуйних слід враховувати можливість утворення в передшлунках і сичузі токсичних окислів азоту, як продукту розщеплення нітратів, - патогенного чинника нітрат-нітритних токсикозів.

2. Пропонується використовувати визначення вмісту нітрат-нітрит-іонів у сечі, як діагностичний тест ступеня нітрат-нітритних навантажень організму великої рогатої худоби.

3. На територіях забруднених нітрат-нітритними формами азоту для харчування слід використовувати молоко ранішніх удоїв, як екологічно чистіше щодо вмісту нітрат-нітритного азоту.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ РОБІТ

1. Пупин И.Г., Хиривский П.Р. Превращение нитрата микрофлорой содержимого рубца с образованием азотсодержащих газообразных продуктов //Научно-техн. бюлл. Укр. НИИЖиБ с.-х. животных. -1989. -Вып. II(3). -С.9-11.
2. Вороняк В.В., Хиривский П.Р., Влияние выпашивания с водой разных доз нитрата натрия на содержание нитратов и нитритов в химусе тонкого кишечника у быка //Всесоюзное координационное совещ. "Итоги научно-исследовательских работ по зооигиене за 1986-1990 годы и задачи НИР на период 1991-1995 годы". Тезисы докладов. -1990. -Ч.1. -С.40-41.
3. Пупин И.Г., Хиривский П.Р. Превращение нитрата микрофлорой содержимого рубца с образованием азотсодержащих газообразных продуктов //Канцерогенные N-нитрозосоединения и их предшественники - образование и определение в окружающей среде - Таллин. Тезисы докл. -1990. -С.150-151.
4. Пупин И.Г., Гривул Т.Н., Хиривский П.Р., Верес Е.Н. Вышнівський И.Я. Пути превращения нитрат-нитритов микроорганизмами содержимого рубца //Проблема нитратов в животноводстве и ветеринарии. Республ. конф. Киев. Тезисы докл. -1990. -С.60-6
5. Хірівський П.Р., Пупін І.Г. Біотрансформація нітрату і нітриту натрію в хімусі сичуга з утворенням аміаку //І Республіканська наукова конференція "Біотехнологічні дослідження і перспективи їх розвитку". Тези доповідей. -1990. -С.106.
6. Хірівський П.Р., Пупін І.Г. Вплив нітратного навантаження на вміст нітрат-нітритів в окремих органах, молоці й сечі корів

- // Науково-техн. бюл. Укр. НДІФІБ с.-г. тварин. -1991. -Вип. ІЗ(2). -С.І4-І7.
7. Пупін І.Г., Хірівський П.Р., Верес Є.М. Альтернативне перетворення нітратів асоціацією мікроорганізмів рубцевої екосистеми худоби // VI Український з'їзд. Тези доповідей. -1992. -Ч.ІІ. -С.82.
 8. Хірівський П.Р., Пупін І.Г. Навантаження нітратами на динаміку їх вмісту у рубці, крові і сечі //Науково-техн. бюл. Інституту ФІБ тварин. -1992. -Вип.І4(І). -С.27-29.
 9. Пупін І.Г., Хірівський П.Р., Верес Є.М. Відновлення нітрат-нітритів в аміак у хімусі сичуга і тонкого відділу кишечника худоби // Науково-техн. бюл. Інституту ФІБ тварин. -1992. -Вип.І4(І). -С.33-35.
 10. Хірівський П.Р., Різель С.А., Пупін І.Г. Нітрети раціону та рівень нітрат-нітрит-іонів, вітамінів А,Е і каротину у крові корів. //Науково-техн. бюл. Інституту ФІБ тварин. -1993. -Вип. І5(І). -С.83-85.

Підписано до друку 13.05.94. Формат паперу 60x84 1/16.
Папір газетний. Друк офсетний. Безкоштовно.
Др. карських листів І. Зам. 563. Тираж 100.

Ретопронт Львівського ЦДІ. Бул. 70^а-річчя Львова, 57.

452/111

AB 30.253

AB 30.253

Безкоштовно