

Стимуляции цикла мочевины влияет на микробиоту рубца телят- МОЛОЧНИКОВ

*Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии, биохимии и
питания животных – филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства –
ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста».
Боровск, Калужская обл., РФ*

Колоскова Елена Михайловна

VII Международная научная конференция
«СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ, ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ АГРАРНОЙ НАУКИ»

октябрь 2022 г.

Республика Крым, г. Симферополь

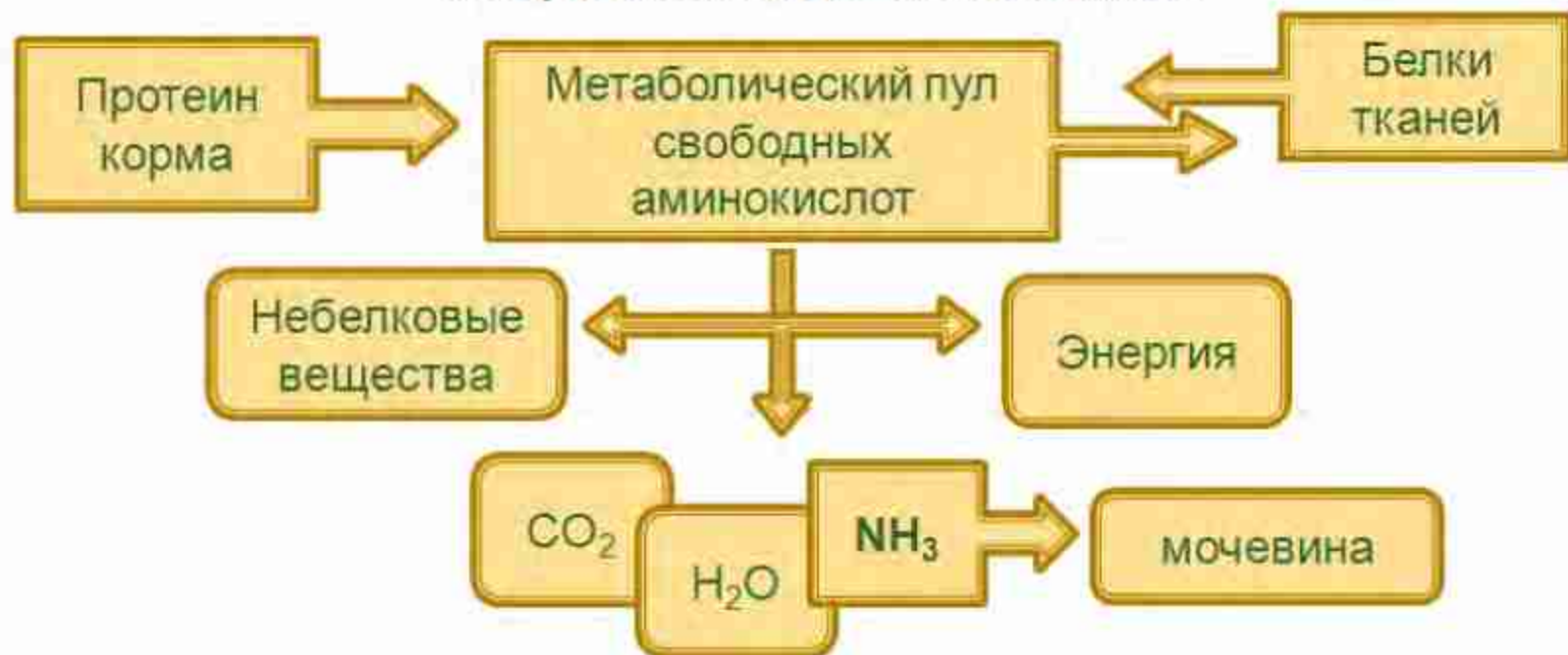
Один из важнейших факторов повышения мясной и молочной продуктивности животных - оптимизация процессов метаболизма: **углеводного, жирового и белкового обмена.**

Белковый метаболизм - биохимические процессы, ответственные за синтез белков и аминокислот (**анаболизм**) и расщепление белков (**катаболизм**). Белковый обмен - неотъемлемой частью **азотистого обмена**, конечными продуктами которого являются мочевины и аммиак.

Состояние белкового обмена оценивают по азотистому балансу. **Азотистый баланс** – это соотношение между количеством азота, поступающего в организм и количеством азота, выведенного из организма в виде конечных продуктов азотистого обмена.

Конечные продукты распада аминокислот: в результате процессов дезаминирования, переаминирования декарбоксилирования аминокислот образуются аммиак, углекислый газ, кето- и органические кислоты, которые утилизируются в организме

Общая схема белкового обмена



Азотистый баланс (АБ) – разница между азотом, поступившим с кормом в организм, и выведенным из организма.

АБ > 0 – доминируют синтетические процессы. Молодой, растущий организм. Беременность.

АБ < 0 – распад белков тела. Голодание (частичное или полное), белковая недостаточность, заболевания.

АБ = 0 - состояние азотистого равновесия. Здоровый взрослый организм на полноценном рационе с нормальным содержанием белка.

Источники образования аммиака

Катаболизм аминокислот
(дезаминирование)

Деаминирование аминов,
нуклеотидов

Катаболизм азотистых
компонентов липидов и
углеводов

Продукт кишечных
бактерий (в рубце)

Аммиак

Концентрация в крови в норме - менее 50 мкмоль/л.
В свободном виде - высокая токсичность.
Накопление аммиака вызывает: гипоэнергетическое
состояние; угнетение реакций трансаминирования
аминокислот; алкалоз; судороги

Пути утилизации

Восстановительное
аминирование альфа-
кетокислот

Образование солей
аммония

Образование глутамина и
аспарагина

Биосинтез мочевины

Биосинтез мочевины

Мочевина – основной конечный продукт азотистого обмена уреотелических организмов (млекопитающие, земноводные): до 85% всего азота выводится из организма с мочевиной.

- Мочевина в организме синтезируется только в печени в орнитиновый цикл или цикл мочевины.
- Поражение печени и нарушение синтеза мочевины приводят к повышению в крови и тканях аммиака и аминокислот (глутамина и аланина).

Орнитиновый цикл – первый метаболический цикл, обнаруженный Г.Кребсом и К. Гензелейном в 1932 году (за 5 лет до цикла трикарбоновых кислот).

Полный набор ферментов орнитинового цикла есть только в печени. Отдельные ферменты обнаружены и в других органах:
почки – аргининосукцинатсинтетаза, аргининосукцинатлиаза
энтероциты – карбамоилфосфатсинтетаза

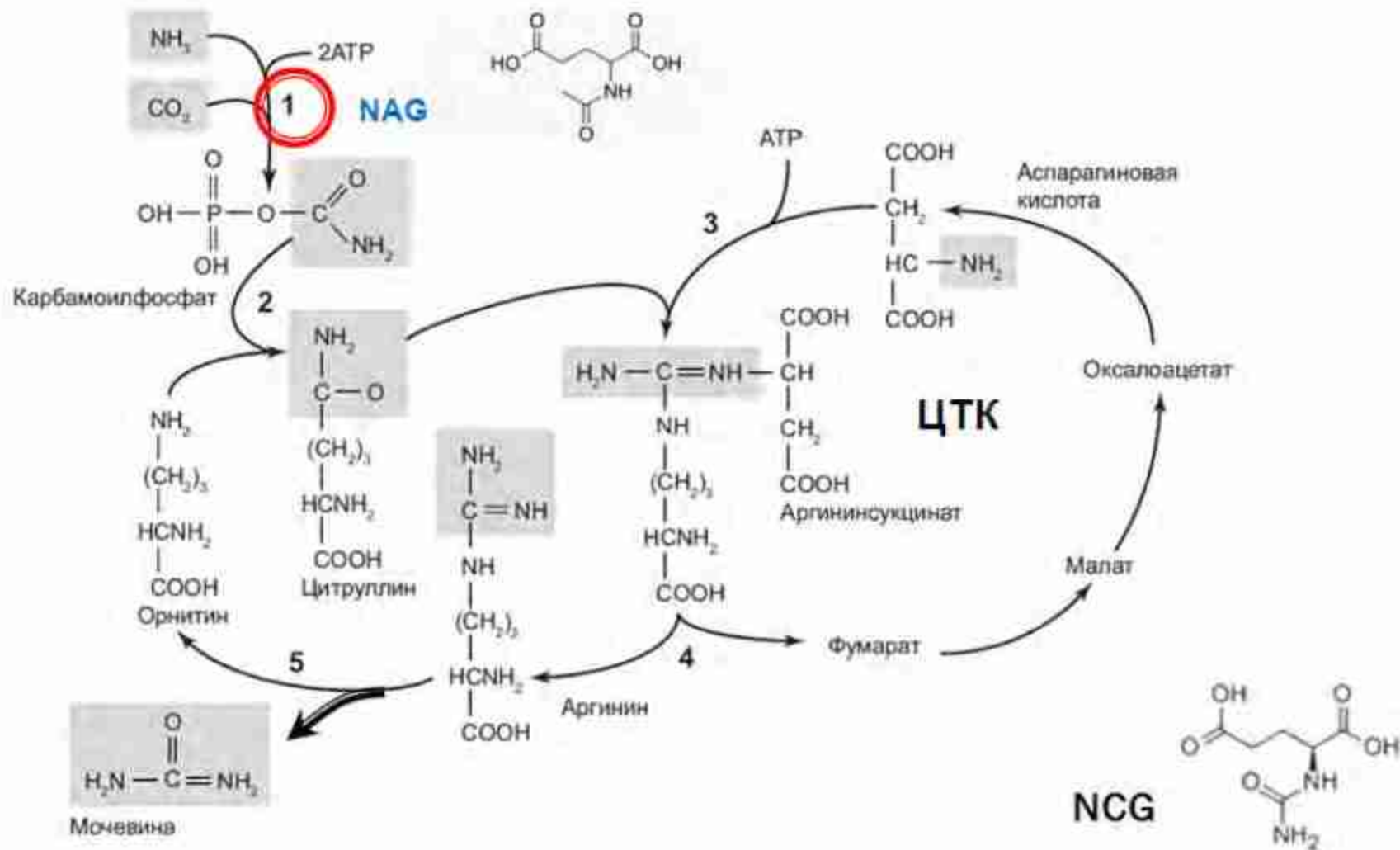


Рис.1. **Орнитиновый цикл и его взаимосвязь с циклом трикарбоновых кислот.** Протекает в клетках печени: первые две реакции в митохондриях, остальные – в цитозоле. Начинается с образования богатого энергией карбамоил-фосфата в присутствии **N-ацетилглутаминовой кислоты (NAG, кофактор)**, при участии фермента **карбамоилфосфатсинтетазы 1** (1). Карбамоилфосфат в реакции с орнитином образует цитруллин (2 — орнитинтранскарбамоилаза). Цитруллин и аспарагиновая кислота (из ЦТК) образуют аргининсукцинат (3 — аргининсукцинатсинтетаза), расщепляющийся на фумаровую кислоту (в ЦТК) и аргинин (4 — аргининсукцинатпиаза). Аргиназа (5) расщепляет аргинин на мочевину и орнитин, способный вновь поступать в митохондрии и запускать новый оборот цикла мочевины.

Общий баланс орнитинового цикла:

Энергетический баланс синтеза мочевины:

За один оборот орнитинового цикла расходуются макроэргические связи 3-х молекул АТФ.

Пути компенсации энергозатрат:

- При включении фумарата в ЦТК на стадии дегидрирования малата образуется 1 НАДН(Н+) (3 АТФ)
- При окислительном дезаминировании глутамата образуется 1 НАДН(Н+) (3 АТФ).

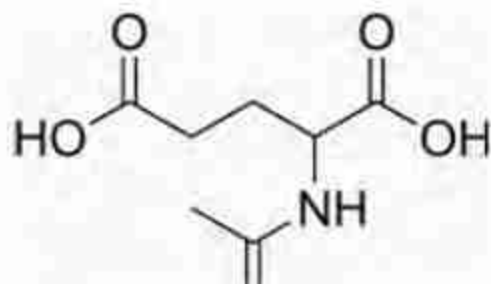


N-ацетилглутамат

N-ацетилглутаминовая кислота (N-ацетилглутамат, NAG) - первый промежуточный продукт, участвующий в биосинтезе аргинина у прокариот и простых эукариот, регулятор цикла мочевины.

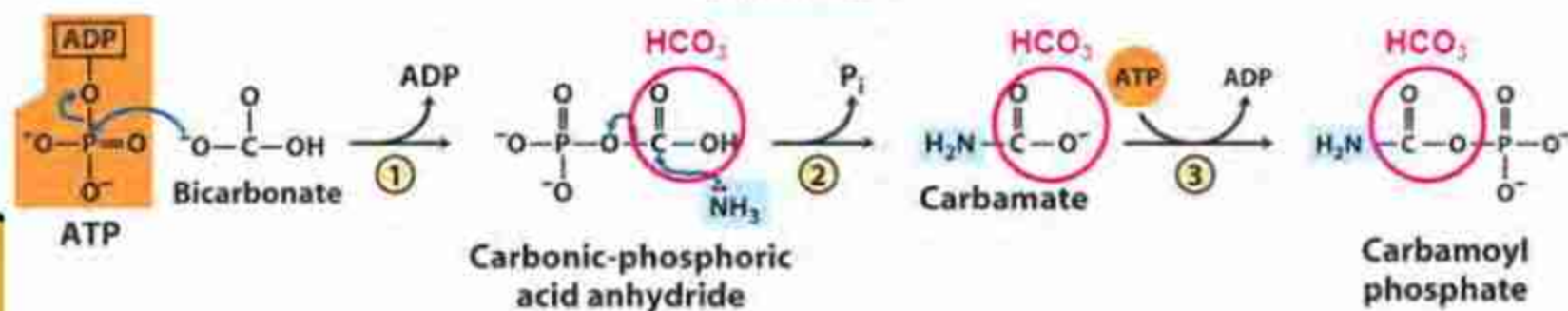
Аллостерический активатор первого фермента в цикле мочевины -- митохондриальной карбамилфосфатсинтетазы I (CPSI) -

Запускает выработку первого промежуточного продукта цикла мочевины, карбамилфосфата, метаболически активной формы аммиака, обогащенной энергией. CPSI неактивен без NAG.



Дефицит N-ацетилглутаминовой кислоты приводит к блокировке выработки мочевины, что увеличивает концентрацию аммиака в крови (гипераммониемия). Дефицит может быть вызван дефектами в гене, кодирующем NAGS, или недостатками предшественников, необходимых для синтеза.

Carbamoyl phosphate synthetase I



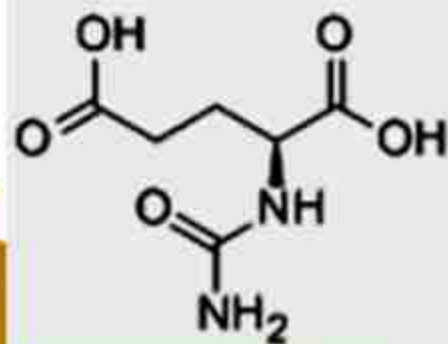
N-карбамоилглутамат

Уровень интермедиатов цикла мочевины можно регулировать, воздействуя на активность его ключевых ферментов.

N-карбамоилглутамат (NCG) (неметаболизируемый аналог N-ацетилглутамата) – эффективный агонист и регулятор карбамоилфосфатсинтетазы-1.

NCG активизирует цикл мочевины, его применение в качестве кормовой добавки обеспечивает более полную конверсию азота мочевины и аммиака в эндогенный белок и повышает мясную и молочную продуктивность сельскохозяйственных животных.

Современные технологии кормления сельскохозяйственных животных включают в себя применение кормовых добавок, способствующих улучшению конверсии кормов.



NCG достоверно улучшает показатели роста и развития телят, однако, его влияние на микробиоту рубца и других отделов ЖКТ практически не изучено.

Цель исследований:

получение новых знаний о влиянии послеотъемного стресса на формировании микробиоты рубца телят-молочников, с использованием или без добавки N-карбамоилглутамата (NCG)

Длительность эксперимента – 30 суток.
Возраст телят в начале опыта – 1 месяц.

Группа	Голов в группе	Характеристика кормления
Контрольная	8	Основной рацион (ОР)
Опытная	8	ОР +20 мг NCG на кг живой массы

Выделение ДНК из рубцового содержимого

T-RLPL анализ выполнен на Beckman Coulter CEQ-8000 Analyzer (США), обработка пиков - в программе Фрагмент Энелайзис («Beckman Coulter», США) в ООО «Биотроф».

T-RFLP-анализ

Анализ результатов

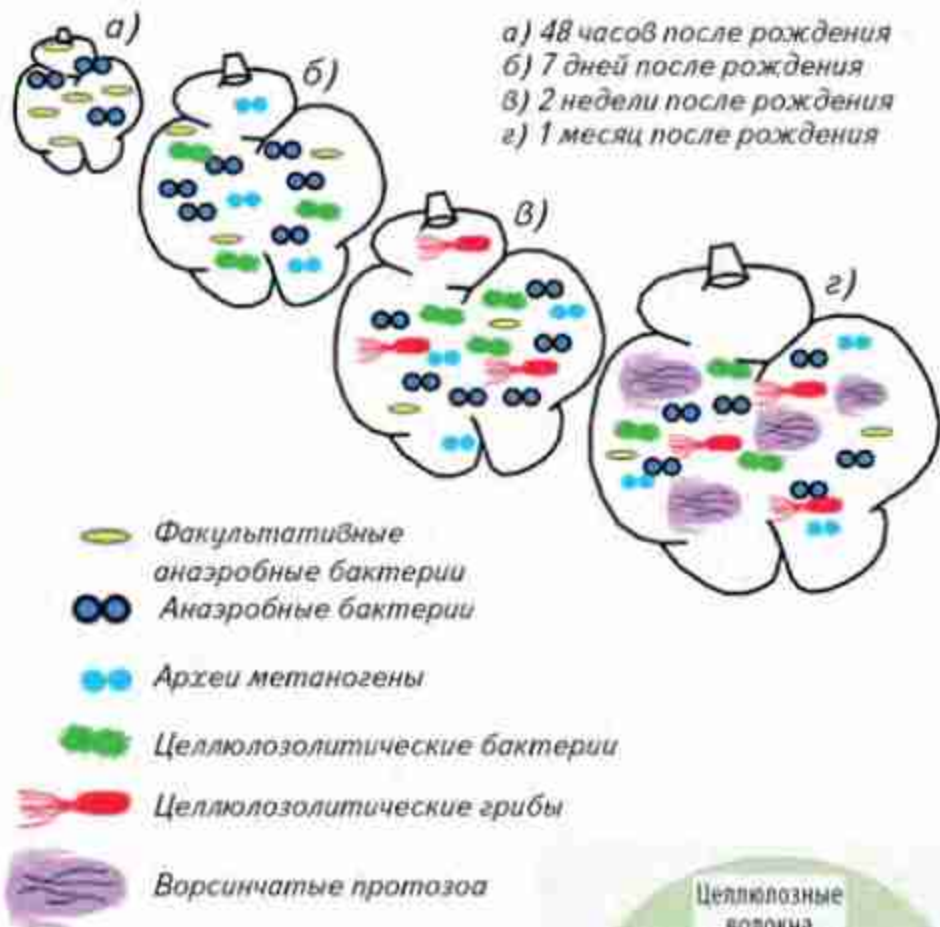
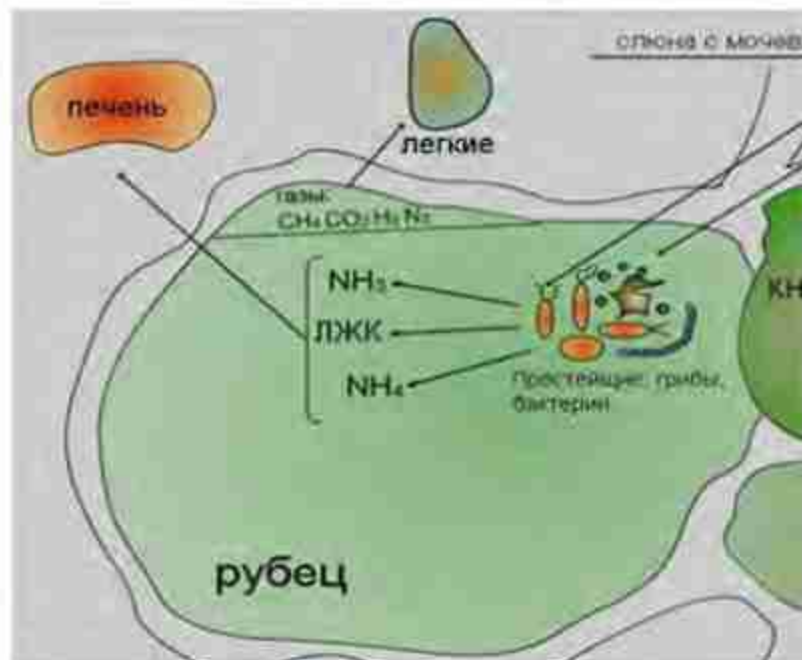


БИОТРОФ

микробиология для животноводства

Колонизация рубца теленка микроорганизмами

Рубец – главный пищеварительный орган жвачных животных.



Микробиота рубца меняется параллельно изменениям в кормлении, условиях содержания, с возрастом животных, при стрессах.

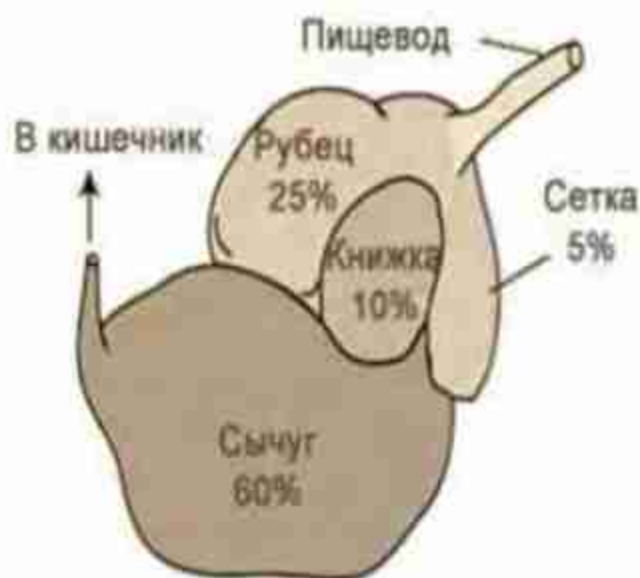
Рубцовая среда может изменить состав и микробную активность с его физико-химическими параметрами.

У всех жвачных животных индивидуальный микробный баланс рубца



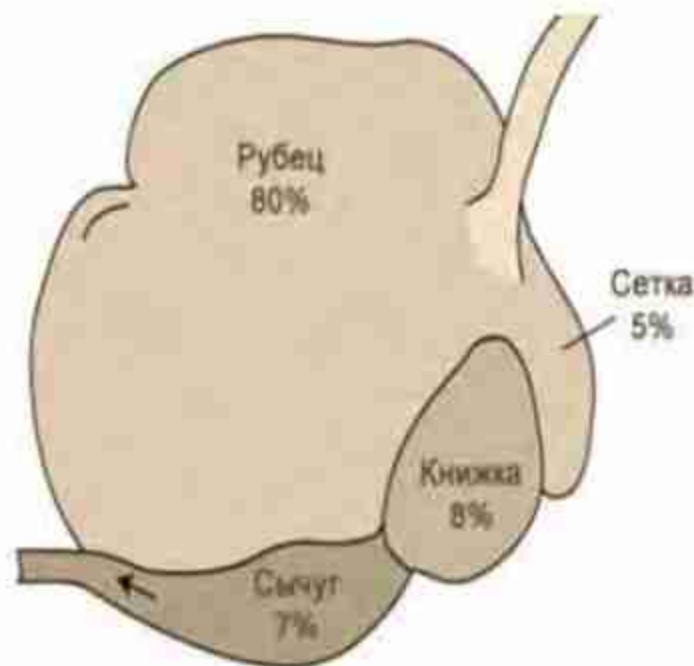
Развитие отделов желудка телянка после рождения

Желудок телянка после рождения



Рубец не развит и не функционирует; молоко не попадает в рубец, а усваивается в сычуге и кишечнике

Желудок телянка после отъема



Потребление твердых кормов, особенно зернового стартера или концентратов стимулирует развитие стенок рубца

Теленок жует жвачку и большинство энергии получает из желудочной ферментации

Основной рацион (ОР):

Сено разнотравное – 0,2 кг (утро) и 0,2 кг (вечер).

Комбикорм – 1,0 кг (утро) и 1,0 кг (вечер).

Заменитель цельного молока – 3,0 л (утро) и 3,0 л (вечер).

Вода – в свободном доступе.

Таблица 1. Основные показатели 3ЦМ LOGAS MILK эконом плюс

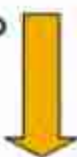
Компонент	Единица измерения	Показатель	Компонент	Единица измерения	Показатель
Энергетическая ценность			Витаминная группа		
Обменная энергия	Мдж/кг	16,0	Витамин А, не менее	МЕ/кг	40000
Структура			Витамин D3, не менее	МЕ/кг	1000
Белок, не менее	%	20,0	Витамин Е, не менее	мг/кг	150
Жир, не менее	%	16	Витамин С, не менее	мг/кг	150
Клетчатка	%	2,5	Витамин В1, не менее	мг/кг	6
Лактоза, не более	%	20,0	Витамин В2, не менее	мг/кг	6,0
Микро, макроэлементы			Витамин В5, не менее	мг/кг	87,5
Железо (Fe), не менее	мг/кг	85,0	Витамин В4, не менее	мг/кг	200,0
Цинк (Zn), не менее	мг/кг	126,0	Витамин В3, не менее	мг/кг	50,0
Марганец (Mn), не менее	мг/кг	126,0	Витамин В6, не менее	мг/кг	4,0
Медь (Cu), не менее	мг/кг	12,5	Биотин (вит. Н), не менее	мг/кг	37,5
Йод (I), не менее	мг/кг	2,5	Витамин К, не менее	мг/кг	4,0
Селен (Se), не менее	мг/кг	0,1	Аминокислоты		
Кальций (Ca), не менее	г/кг	6,0	Лизин, не менее	%	1,24
NaCl, не менее	г/кг	1,3	Метонин, не менее	%	0,38
Фосфор (P), не менее	г/кг	7,0	Метионин+цистин, не менее	%	0,68

Мишень: ген 16S рРНК

Последовательность гена 16S рРНК используется в исследовании филогенетики бактерий и архей, применяется для медицинских исследований патогенных бактерий.



ПЦР



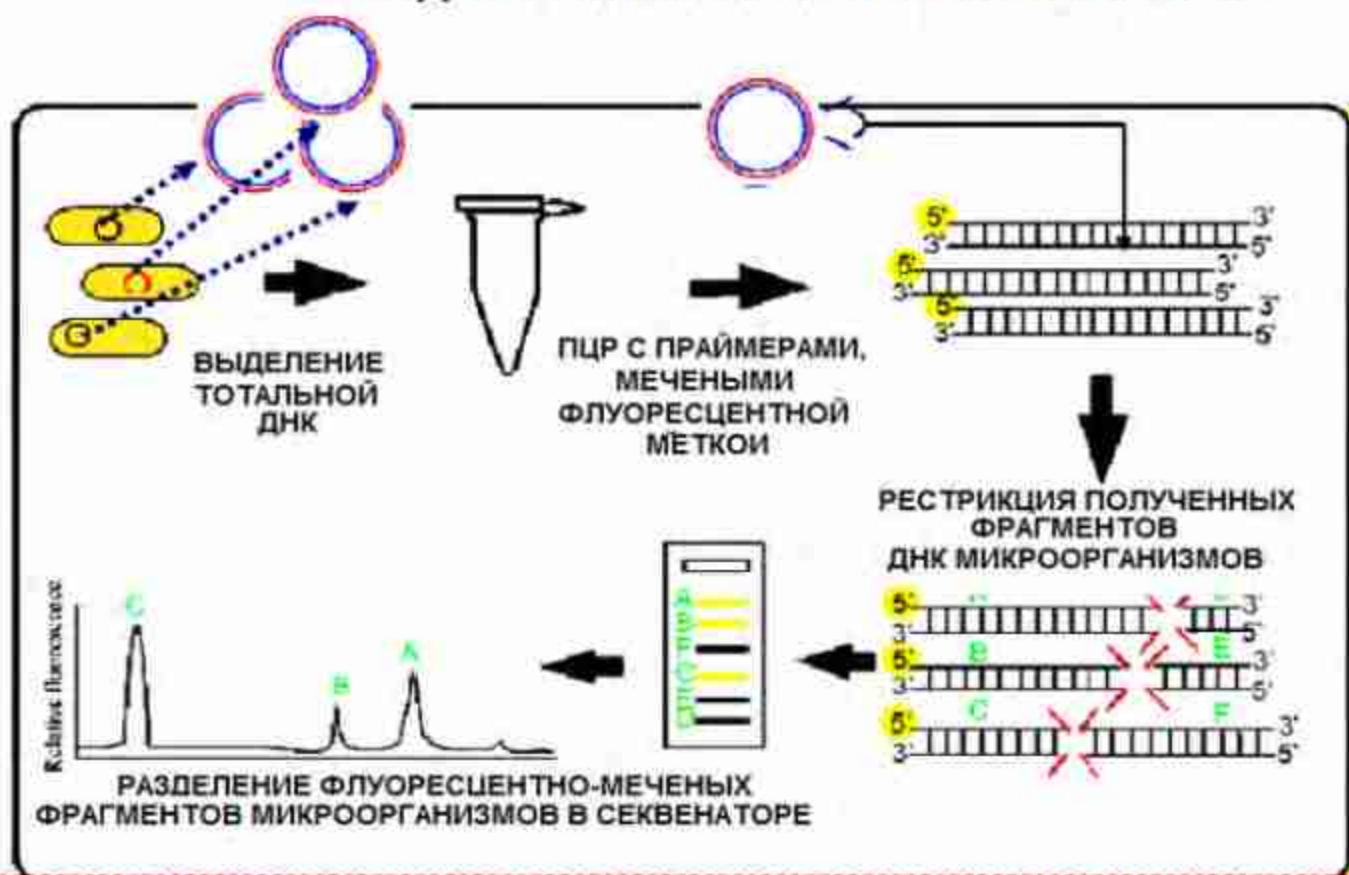
V1V9 – ампликоны,
около 1400 п.н.



Рестрикция:
HaeIII, *HhaI*
и *MspI*.

Результат:
множество меченых
рестриктных
фрагментов разного
размера

Стадии выполнения T-RFLP-анализа.



РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Результаты взвешивания телят молочников ($M \pm m$; $n=8$)

Группы	вес телят, кг		
	до исследования	через 30 дней	среднесуточный привес*
Контроль	$73,4 \pm 2,41$	$83,8 \pm 3,42$	$0,35 \pm 0,07$
Опытная группа	$72,0 \pm 1,34$	$88,0 \pm 1,87$	$0,49 \pm 0,09$

*Норма привесов молодняка голштинской породы в возрасте 0-2 мес 620-650 г/сутки

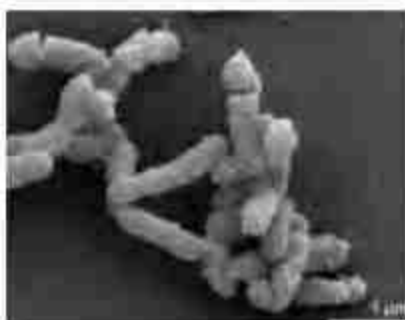
Отъем – один из самых сильных стрессов в жизни теленка. происходит изменение режима питания, температуры, меняются внешние условия содержания. Отъем часто совпадает с транспортировкой телят.

Стрессы приводят к различным заболеваниям телят: респираторным, желудочно-кишечным – в первую очередь.

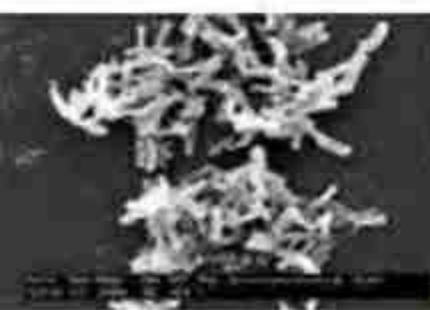
Содержание основных полезных бактерий в рубце телят опытной и контрольной групп, %



Ruminococcus albus



Lachnospiraceae



Clostridium difficile

	Контроль	NCG	Референсные значения (по Ипьиной, 2017)
<u>Ruminococcaceae</u>	4,07 ± 1,22	8,87 ± 3,43*	не < 5
<u>Eubacterium</u>	6,84 ± 2,34	7,24 ± 1,54	не < 2
<u>Lachnospiraceae (Butyrivibrio)</u>	3,06 ± 0,63	4,84 ± 0,75*	не < 2
<u>Clostridiaceae</u>	1,54 ± 0,32	3,78 ± 0,63**	не < 5
<u>Bacteroides</u>	2,47 ± 0,81	4,24 ± 1,62	4-8%
<u>Prevotella</u>	0,73 ± 0,32	0,90 ± 0,53	
<u>Прочие</u>	0,06 ± 0,04	0,20 ± 0,18	
Итого:	18,77 ± 1,54	30,08 ± 3,05**	не < 20
<u>Целлюлозолитическая активность, %</u>	11,06 ± 0,35	12,77 ± 0,71*	
<u>Содержание инфузорий, тыс. шт./г</u>	114,6 ± 1,1	106,0 ± 0,5**	

* $p < 0,05$;

** $p < 0,01$;



Содержание и функции микроорганизмов в пробах рубца телят (T-RFLP-анализ), %

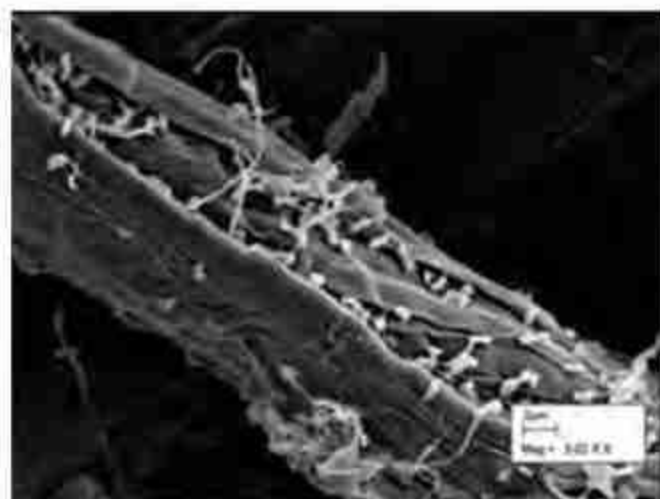
Микроорганизм	Роль микроорганизма	Контроль	NCG
Нормофлора			
<u>Целлюлозолитики</u> (сем. <u>Lachnospiraceae</u> , <u>Ruminococcaceae</u> , <u>Eubacteriaceae</u> , <u>Clostridiaceae</u> и др.)	«Полезные» микроорганизмы, расщепляющие растительную клетчатку и другие углеводы кормов	$18,77 \pm 1,54$	$30,08 \pm 3,05^*$
Селеномонады (<u>Veillonellaceae</u> , <u>Selenomonadaceae</u>)	Способны разлагать органические кислоты, в том числе <u>лактат</u>	$10,88 \pm 1,44$	$9,30 \pm 2,36$
Bacillaceae	Обладают антимикробной активностью в отношении патогенных микроорганизмов и др. полезными свойствами	$26,41 \pm 2,44$	$21,85 \pm 6,00$
Bifidobacterium sp.	Обладают антимикробной активностью в отношении патогенных микроорганизмов	$0,69 \pm 0,12$	$0,94 \pm 0,25^*$
Нежелательная или условно-патогенная микрофлора			
Lactobacillaceae	Ферментируют моносахара до молочной кислоты, снижение pH рубца	$5,01 \pm 2,22$	$2,29 \pm 0,84^*$
Энтеробактерии (Enterobacteriaceae)	Могут провоцировать гастроэнтериты	$5,67 \pm 0,81$	$4,26 \pm 0,93^*$
Филум Actinobacteria	Могут провоцировать актиномикозы	$10,20 \pm 1,47$	$5,74 \pm 2,23^*$

**Содержание и функции патогенных микроорганизмов в пробах рубца телят
(T-RFLP-анализ), %
Продолжение**

Патогенные микроорганизмы			
Фузобактерии	Возбудитель некробактериоза	$1,41 \pm 0,69$	$2,42 \pm 0,78^*$
Стафилококки (<i>Staphylococcus</i> sp.)	Возбудители гнойно-воспалительных процессов, маститов	$1,00 \pm 0,20$	$1,01 \pm 0,47$
Пептококки (<i>Peptococcus</i> sp.)		$0,41 \pm 0,19$	$0,79 \pm 0,37$
Кампилобактерии (Сем. <i>Campylobacteraceae</i>)		$0,20 \pm 0,13$	$0,53 \pm 0,20^*$
Пастереллы	Возбудитель пастереллеза	$3,19 \pm 0,93$	$1,46 \pm 0,61^*$
Микоплазмы	Возбудители микоплазмозов	$1,93 \pm 0,25$	$2,10 \pm 0,75$
Транзитная микрофлора			
Псевдомонады (Сем. <i>Pseudomonadaceae</i>)	Не играют существенной роли	$1,11 \pm 0,40$	$2,48 \pm 0,45^*$
Некультивируемые	Роль не ясна	$13,10 \pm 3,45$	$14,75 \pm 3,33$

Содержание целлюлозолитических микроорганизмов, целлюлозолитическая активность рубцового содержимого телят опытной и контрольной групп

* $p < 0,05$;
** $p < 0,01$;



	Контроль	Опыт
<u>Целлюлозолитические</u> бактерии, %	$18,8 \pm 1,54$	$30,1 \pm 3,05^{**}$
<u>Целлюлозолитическая</u> активность, %	$11,1 \pm 0,35$	$12,8 \pm 0,31^{*}$
Содержание инфузорий, <u>тыс.шт./г</u>	$114,6 \pm 1,1$	$106,0 \pm 0,5^{**}$

Содержание аммиака и мочевины в крови телят

	Контроль	NCG	Норма
Мочевина, ммоль/л	$4,75 \pm 0,16$	$3,94 \pm 0,16^{*}$	3,3 – 6,7
Аммиак, <u>мкмоль/л</u>	$124,76 \pm 9,02$	$59,10 \pm 4,30^{*}$	не более 50

Заключение

- Впервые показано влияние NCG на состав микробиоты рубца телят молочников: введение NCG в дозировках 20 мг/кг живой массы способствует достоверному **повышению содержания целлюлозолитической микробиты** рубца телят почти на 50% по сравнению с контрольной группой, снижает содержание условно-патогенной микробиоты. Целлюлозолитическая активность рубцового содержимого коррелировала с этими показателями.
- На фоне высокого уровня аммиака в крови телят контрольной группы, вероятно, вызванного повышенным содержанием патогенных микроорганизмов у телят обеих групп, использование NCG с кормом позволило не только привести **концентрации аммиака и мочевины** в крови к нормальным значениям, но и **улучшить биохимические и зоотехнические показатели** опытных животных.

Спасибо за внимание!

