



МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ОДЕСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ АГРАРНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ

ФАКУЛЬТЕТ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ

КАФЕДРА ВНУТРІШНІХ ХВОРОБ ТВАРИН ТА КЛІНІЧНОЇ
ДІАГНОСТИКИ



МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

для самостійної роботи

здобувачів вищої освіти IV курсу факультету ветеринарної
медицини з освітнього компоненту «Внутрішніх хвороб тварин»
на тему «Дослідження вмісту рубця у корів»

рівень вищої освіти

другий (магістерський)

галузь знань

21 ветеринарна медицина

спеціальність

211 ветеринарна медицина

освітня програма

ветеринарна медицина

Одеса, 2026

УДК 619:616-07:636.2(075.8)

Методичні рекомендації для самостійної роботи здобувачів вищої освіти факультету ветеринарної з курсу «Внутрішні хвороби тварин».

Методичні рекомендації на тему «**Дослідження вмісту рубця у корів**» призначені для самостійного вивчення освітнього компонента «Внутрішні незаразні хвороби тварин». Видання містить систематизовану інформацію щодо фізіологічних особливостей функціонування рубця жуйних тварин, а також основні підходи до лабораторного та клінічного дослідження його вмісту. У методичних рекомендаціях розглянуто сучасні методи діагностики стану рубцевого травлення, зокрема визначення фізико-хімічних показників вмісту рубця (рН, консистенція, запах, колір), оцінку мікробіом та мікрофауни рубця, а також інтерпретацію отриманих результатів у клінічній практиці. Особливу увагу приділено діагностиці порушень рубцевого травлення у корів, таких як ацидоз, алкалоз, гіпотонія та атонія рубця, їх етіології, патогенезу, клінічним проявам та методам диференційної діагностики. Методичні рекомендації спрямовані на формування у здобувачів вищої освіти практичних навичок клінічного мислення, проведення діагностичних досліджень та обґрунтування лікувально-профілактичних заходів при патології рубця у великої рогатої худоби.

Укладач: Дубін Р. А., Улизько С. І., Тодоров М. І.

Рецензент: Жунько І. Д.

Методичні рекомендації для самостійної роботи здобувачів вищої освіти факультету ветеринарної з курсу «Внутрішні хвороби тварин» для здобувачів денної форми навчання другого (магістерського) рівня вищої освіти, спеціальності 211 ветеринарна медицина / Дубін Р. А., Улизько С. І., Тодоров М. І. [Електронний ресурс] – Одеса. : ОДАУ, 2026. – 1 електрон. опт. диск (CD-ROM); 12 см. 26 с.

Схвалено методичною комісією факультету ветеринарної медицини

Протокол № 5 від 29 травня 2026 року

Відповідальний за випуск: Р. А. Дубін, кандидат ветеринарних наук, доцент

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ ВМІСТУ РУБЦЯ

Отримання вмісту рубця та підготовка до аналізу. Вміст рубця у клінічно здорових тварин отримують за допомогою ротоглоткових або носоглоткових зондів. За необхідності відбір проб здійснюють шляхом пункції вентрального мішка рубця. В експериментальних умовах процеси травлення у передшлунках жуйних тварин вивчають із використанням фістульованих тварин, що забезпечує доступ до вмісту рубця та можливість його багаторазового відбору для досліджень. В останні роки сконструйовано штучний рубцевий мішок, що дає можливість вивчати ферментативні процеси *in vitro*. Зонд Черкасова призначений для виведення газів і промивання рубця і мало придатний для отримання його вмісту. У дорослої великої рогатої худоби вміст рубця беруть гумовими або поліхлорвініловими шлангами довжиною 200—250 см і зовнішнім діаметром 20—40 мм. На 15—20-сантиметровому відрізку переднього кінця такого шланга роблять невеликі отвори на випадок закупорки основного ходу. У країнах Західної Європи виготовляють ряд ротоглоткових зондів різної модифікації, що використовуються для отримання проб рубцевого вмісту. Для зондування рубця овець, кіз та молодняка великої рогатої худоби можна використовувати шлункові зонди довжиною 120—150 см, зовнішнім діаметром близько 15 мм, що випускаються медичною промисловістю.

М'якою трубкою зондують через дерев'яний зівник, отвір якого дещо більший за діаметр зонда. Натискаючи пальцями на жувальні м'язи, зівник вставляють якомога ближче до кута рота і фіксують його за рогами стрічками. Попередньо змащений вазеліновим маслом рубцевий кінець зонда вводять до кореня язика і обережно просувають у стравохід, злегка рухаючи вперед і назад, щоб викликати у тварини ковтальний рефлекс. Якщо зонд потрапляє в трахею, тварина починає хвилюватися та кашляти. У цьому випадку зонд слід трохи витягнути та спрямувати його у бік стравоходу. При потраплянні зонда в рубце відчувається запах вмісту або він витікає. Для кращого вилучення рубцевого вмісту голову тварини необхідно максимально опустити вниз, масажувати ліву голодну ямку і рухати зондом вперед і назад. Можна вміст рубця відкачувати за допомогою вакуумного насоса Камовського в колбу Бунзена. У молодняка великої та дрібної рогатої худоби вміст витягують, приєднавши до зонда шприц Жане.

При необхідності невелику кількість вмісту рубця можна отримати шляхом пункції його вентрального мішка. Прокол роблять на стоячій тварині краніальніше лівої колінної складки голкою для аортопункції. Рідину відсмоктують за допомогою шприца.

У тварин з фістулами рубця вміст беруть металевою трубкою довжиною близько 1 м і діаметром отвору 0,5 см. Трубку вводять через фістулу у вентральний мішок рубця. Для відсмоктування вмісту використовують шприц Жане, приєднаний до трубки.

Для підтримання температури та збереження активності мікрофлори вмісту рубця його доцільно відбирати в термос. Під час досліджень вміст рубця зберігають при кімнатній температурі (20—22 °C) не більше 9 годин, а

в холодильнику — не більше 1 доби. Під час транспортування з господарств зразки необхідно поміщати в термос з льодом. Для запобігання лізису найпростіших і бактерій зразки консервують 10%-вим розчином формаліну (5—6 крапель на 20 мл вмісту рубця). Для визначення летких жирних кислот, лактату, амінокислот, біогенних амінів, іонів (Cl^+ , Na^+ , K^+ та ін.) вміст рубця можна зберігати в замороженому стані близько 6 місяців. Аміак слід визначати у свіжому вмісті. Перед використанням проби фільтрують через 2—4 шари марлі.

ОРГАНОЛЕПТИЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ

Органолептичне дослідження вмісту рубця проводять відразу ж після його отримання безпосередньо в господарстві. При цьому визначають запах, колір, осад, флотацію.

Колір. У здорових тварин колір вмісту рубця залежить від споживаного корму. У більшості випадків воно має колір від сіро-зеленого до коричнево-зеленого, під час випасу або при годуванні сіном — бурого або коричнево-зеленого, при згодовуванні жома — сірого, кукурудзяного силосу та соломи — жовто-коричневого кольору. Темно-коричневий або темно-зелений колір свідчать про застій або гниття вмісту рубця. При гострому ацидозі рубця його вміст молочно-сірого, а при хронічному ацидозі — молочно-коричневого кольору.

Консистенція. Вміст рубця має слабковязку (тягучу) консистенцію, яка при порушенні травлення може ставати водянистою, пінистою або в'язкою (густою). Водяниста консистенція вказує на зниження ферментативних процесів у передшлунках і розвиток гострого ацидозу. При тимпанії вміст рубця пінистий. В'язка консистенція відзначається при хронічному ацидозі рубця, але може бути і внаслідок потрапляння великої кількості слини в пробу вмісту. **Запах.** У здорових тварин запах вмісту рубця специфічний, ароматний і залежить від раціону. Різкий запах може бути при годуванні зеленою травою, буряком, капустою, силосом. Запах тухлих яєць або аміачний відзначають при гнитті вмісту. Затхлий або іншого роду неприємний запах — результат зниження активності мікрофлори та ферментативних процесів у рубці. Кислуватий запах характерний для хронічного ацидозу рубця, а різко кислий — для гострого ацидозу. Затхлий і кислуватий запахи можливі при потраплянні вмісту сичуга в передшлунки внаслідок порушення його прохідності та при антиперистальтиці.

Осад і флотація. Свіжий вміст рубця наливають у скляний циліндр або склянку, відзначаючи час осадження та флотації. У вмісті рубця здорових тварин значна частина перевареного корму осідає (осад), а грубі непереварені з бульбашками газу (бродіння) компоненти піднімаються на поверхню і збираються у вигляді плаваючого прошарку (флотація).

Оцінюючи утворення осаду та флотації, необхідно відзначити початок першої осадової та флотаційної фази. При нормальному травленні в передшлунках і залежно від типу раціону та часу останнього годування осадження та флотація в більшості випадків завершуються через 4—10 хв. У випадках порушення травлення та водянистої консистенції вмісту

прискорюється випадання осаду, а флотація затримується або відсутня. Це спостерігають при інактивації мікрофлори, анорексії або недостатньому годуванні. Швидкий осад без флотації характерний для ацидозу рубця, затримка осадження та флотації — наслідок застою, гниття вмісту рубця та пінистої тимпанії.

ВИЗНАЧЕННЯ pH

Реакція середовища рубця — важливий показник, який визначає стан ферментативних процесів, утворення метаболітів, їх всмоктування та використання в організмі. Характеризується реакція середовища концентрацією іонів водню, або водневим показником. Величина pH — від'ємний логарифм концентрації іонів водню. Це означає, що для 0,1 ммоль/л розчину будь-якої сильної кислоти pH дорівнює 1, для чистої води — 7, для 0,1 ммоль розчину сильного лугу — 13. Відповідно кисла реакція визначається концентрацією іонів водню H^+ , а лужна — концентрацією іонів гідроксиду OH^- ; при нейтральній реакції pH дорівнює 7.

У розчинах pH визначають двома методами — колориметричним та електрометричним. Перший, найпростіший, але не зовсім точний метод ґрунтується на властивості деяких індикаторів змінювати колір залежно від реакції середовища. Цим методом складно визначити pH у каламутних та забарвлених розчинах, зокрема у вмісті рубця.

Електрометричний метод. Застосовують при роботі з забарвленими розчинами та суспензіями, ним досить швидко можна визначити pH з точністю до 0,05.

Принцип. Метод ґрунтується на тому, що при зануренні електрода в розчин виникає різниця потенціалів між іонами металу електрода та іонами цього ж металу, який знаходиться в розчині. Якщо в цей же час занурити ще й стандартний електрод з відомим і стійким потенціалом, то електрорушійна сила гальванічного елемента буде залежати від концентрації іонів металу в розчині. Визначають електрорушійну силу за допомогою pH-метра (ЛПУ-0,1; pH-метр-262, ОР-204/1; універсальний іонометр ЕВ-74).

Хід визначення. Основний та допоміжний електроди готують до роботи згідно з інструкцією до приладу. Прилад попередньо калібрують. При вимірюванні pH необхідно враховувати температуру досліджуваної рідини. При визначенні pH вмісту рубця натискають кнопку з діапазоном визначення 4—9.

Вміст рубця добре розмішують, виливають у склянку і занурюють електроди, попередньо промиті дистильованою водою та висушені фільтрувальним папером. Фіксують показники на шкалах приладу. Для більш точного вимірювання їх враховують через 1—3 хв, оскільки за цей час настає стан рівноваги між електродами та розчином. Після закінчення вимірювань прилад вимикають, електроди ретельно промивають і занурюють у стаканчик з дистильованою водою.

Коливання pH вмісту рубця залежать головним чином від рівня в ньому бікарбонатів, фосфатів і слабких органічних кислот. У жуйних тварин pH вмісту 6,5—7,2, у високопродуктивних корів 6,3—6,8. Він підтримується в

рубці в результаті: а) надходження луку в рубці зі слиною та кормом (щодня в рубці зі слиною потрапляє 370—520 г Na HCO_3); б) евакуації з рубця кислот внаслідок їх всмоктування в кров і переходу з хімузом у нижчерозташовані відділи травного каналу; в) буферних властивостей вмісту рубця (бікарбонати, фосфати, білок та ін.) і самих органічних кислот.

У кислий бік рН вмісту рубця (4,0—5,6) зміщується при раптовому або надмірному надходженні в рубець з кормами легкозасвоюваних вуглеводів (цукровий буряк, кукурудза молочно-воскової стиглості, патока, яблука, зернові концентрати). У рубці інтенсивно розвивається молочнокисле бродіння, що призводить до різкого утворення молочної кислоти, яка викликає зсув рН у кислий бік.

При підвищеній кислотності відзначають ознаки гострого розладу травлення, тварини втрачають апетит, настає атонія або тимпанія рубця, акт дефекації частішає, кількість інфузорій зменшується. У деяких тварин відзначають тремор м'язів, брадикардію.

Під впливом молочнокислих бактерій руйнуються деякі амінокислоти, утворюються шкідливі протеїногенні аміни (гістамін, тирамін, кадаверин), які всмоктуються в кров і сприяють розвитку ламініту та гіпотонії передшлунків.

Зсув рН вмісту рубця в лужну сторону (більше 7,2) називається алкалозом. Спостерігається при споживанні великої кількості трави бобових рослин та інших високобілкових кормів або небілкових азотистих продуктів. Лужна реакція середовища супроводжується гіпотонією рубця, пригніченням функції інфузорій, симбіотичних бактерій і навіть їх загибеллю, порушенням бродильних процесів у передшлунках. Інтенсивно розвиваються гнильні мікроорганізми, які використовують білок та амінокислоти з утворенням токсичних сполук (фенол, крезол, індол, скатол та ін.). Хвороба проявляється при підвищенні концентрації аміаку в вмісті рубця до 25 мг/100 мл і більше (у нормі 6,5—20). Мікробіом не встигає використовувати аміак для синтезу мікробного білка, а печінка — перетворювати його на сечовину, тому аміак всмоктується в кров і ліквор, викликаючи інтоксикацію.

ВИЗНАЧЕННЯ ЗАГАЛЬНОЇ КІЛЬКОСТІ ЛЕТЮЧИХ ЖИРНИХ КИСЛОТ (ЛЖК)

Принцип. Під впливом пари відбувається відгонка летких жирних кислот рубцевого вмісту з подальшим визначенням їх кількості шляхом титрування розчином луку.

Реактиви: суміш насиченого розчину магнію сульфату в 2,5%-ному розчині H_2SO_4 . 25 мл концентрованої сірчаної кислоти на 1 л насиченого розчину сульфату магнію; 0,1 н. розчин NaOH ; фенолфталеїн (індикатор). Обладнання : апарат Маркгама; електроплита (нагрівач); штатив для титрування; лабораторний посуд. Хід визначення. З загальної проби профільтрованого вмісту рубця відбирають у стаканчик 5 мл рідини та додають 5 мл розчину сульфату магнію.

Після цього 4 мл отриманої суміші (еквівалент 2 мл рідини рубця) переносять в апарат Маркгама для відгону (рис. 1). Пробу обережно

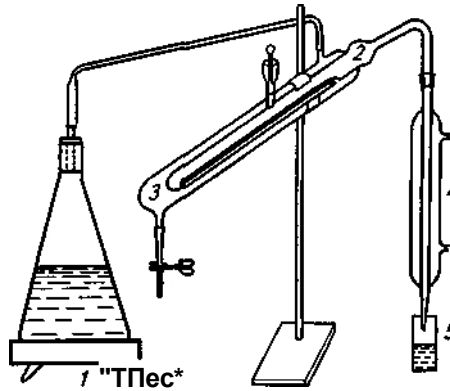


Рис. 1. Схема визначення легких жирних кислот в апараті Маркгама:

1 — колба на нагрівачі; 2 — внутрішня воронка; 3 — зовнішня воронка; 4 — холодильник; 5 — стаканчик для збору конденсату ЛЖК внутрішню трубку приладу через воронку. При цьому водяна пара з пароутворювача проходить між внутрішньою та зовнішньою трубками апарату, нагріває внутрішню трубку, а потім через отвір надходить у внутрішню камеру. Під дією пари відбувається відгонка ЛЖК, які разом з водяною парою потрапляють у холодильник, де вони конденсуються. Відбирають у стаканчик 50 мл рідини і титрують 0,1 н розчином лугу в присутності індикатора фенолфталеїну до появи слабо-рожевого кольору. Відзначають кількість лугу, що пішла на титрування.

З метою контролю повного видалення ЛЖК із проби рубцевого вмісту необхідно продовжити дистиляцію та титрувати другу порцію дистиляту (50 мл). У разі відсутності ЛЖК у другій пробі рідина в стаканчику після додавання кількох крапель лугу відразу ж набуває рожевого кольору.

Відпрацьована проба з внутрішньої камери після охолодження пароутворювача збирається в нижній частині разом з конденсатом водяної пари, звідки її видаляють.

Розрахунок загальної кількості ЛЖК проводять за формулою

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

де x — кількість ЛЖК у 100 мл рубцевої рідини, ммоль/л; A — кількість 0,1 н. розчину NaOH, що пішла на титрування, мл; 0,1 — показник нормальності розчину; 1000 — перерахунок концентрації ЛЖК на 1 л рубцевої рідини; B — кількість рубцевої рідини, взятої для аналізу (у даному випадку 2 мл); 50 — стабільна величина.

У вмісті рубця корів загальна кількість ЛЖК у нормі становить 80—150 ммоль/л (у середньому 120 ммоль/л).

Клінічне значення. Загальна кількість ЛЖК у вмісті рубця жуйних тварин залежить від складу раціону, виду та хімічного складу корму, технології його приготування, концентрації клітковини (оптимальна 18—20 %) та крохмалю (оптимальна 11—14 %) у сухій речовині раціону.

Синтез ЛЖК знижується при деяких захворюваннях, наприклад, при зміщенні сичуга у корів їхня кількість становить 60—70 ммоль/л (А. В. Чуб, 2002).

ХРОМАТОГРАФІЧНИЙ АНАЛІЗ ЛЕТЮЧИХ ЖИРНИХ КИСЛОТ

Принцип. Під дією високої температури (210 °С) кислоти починають випаровуватися. Проходячи через колонку заповнену хромосорбом-101, вони повністю відокремлюються одна від одної. Потрапляючи в детектор, згорають у полум'ї чистого водню, утворюючи при цьому певний електричний потенціал, який реєструється самописцем у вигляді піків. Чим більше кислоти міститься в досліджуваній пробі, тим вищою буде висота піку.

Реактиви: стандарти летких жирних кислот (оцтової, пропіонової, масляної, ізомасляної, валеріанової та ін.) зі ступенем чистоти не менше 99 %; сорбент хромосорб-101.

Обладнання: разовий хроматограф «Хром-5»; генератор водню «Водень-1»; компресор; балон з азотом; скляна колонка довжиною 1,5 м, заповнена хромосорбом-101; самописець; рулон паперу з міліметровими позначками; олівець для запису показників; мікрошприц; лабораторні ваги ВЛР-200; навіски не менше 2-го класу точності.

Хід визначення. Перед дослідженням готують стандарти: суміш ЛЖК у такому співвідношенні, щоб вона приблизно відповідала середнім показникам вмісту летких жирних кислот, які містяться у вмісті рубця. Прилад «Хром-5» перед роботою прогрівують протягом 1,5—2 год. Показник готовності приладу до роботи — чітка нульова лінія на самописці. Вихідні дані приладу: швидкість руху азоту 40 мл/хв (визначають піноміром); швидкість руху водню 40 мл/хв, повітря — 400 мл/хв. Робоча температура камери введення досліджуваної проби становить 170 °С, камери з колонкою та детектором — 210 °С.

Порядок увімкнення та роботи приладу. Відкривають балон з азотом. Увімкнуть «Хром-5», генератор водню та компресор. Після цього виставляють на приладі необхідні параметри роботи: швидкість руху азоту, водню та повітря. Виставляють температурний режим: камера введення проби 170 °С, камера з колонкою та детектором 210 °С, підпалюють водень і вмикають кнопку

«Нагрів». Далі встановлюють олівець і вмикають самописець. Протягом 1,5—2 год прилад прогрівують при постійному контролі температурного режиму та самописця. Якщо через 2 год самописець викреслює чітку нульову (горизонтальну) лінію, це означає, що прилад готовий до роботи. Потім у мікрошприц набирають 3 мкл досліджуваної проби та вводять у камеру введення, на самописці фіксується отриманий результат.

Протягом усієї роботи приладу необхідно контролювати температурний режим.

Підрахунок отриманих результатів. За допомогою міліметрової лінійки розраховують площу кожної кислоти в окремо взятій пробі та в стандартній суміші. Для цього вимірюють висоту піку і множать на ширину піку на середині висоти. Отримані результати по кожній кислоті

підсумовують і підраховують загальну площу кожної проби. Наприклад, висота піку оцтової кислоти 40 мм, ширина на середині висоти 6 мм, площа в цьому випадку становитиме $40 \cdot 6 = 240 \text{ мм}^2$. Таким чином підраховують площу всіх наявних кислот.

Розрахунок. Сума площ усіх кислот 100 %, а площа окремо взятої кислоти x . Після проведення необхідних математичних розрахунків отримують процентний вміст окремо взятої кислоти. Наприклад, загальна площа всіх кислот 560 мм², а площа оцтової кислоти 240 мм². Складаємо пропорцію:

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

Помноживши отриманий результат на поправочний коефіцієнт для оцтової кислоти, який дорівнює 1,125, дізнаємося відносний вміст оцтової кислоти: $42,85 \cdot 1,125 = 48,2 \%$.

Визначення поправочних коефіцієнтів. За допомогою мікрошприца вводять 3 мкл стандарту в камеру введення і записують показники на самописці. Підраховують отримані результати і визначають поправочний коефіцієнт.

Наприклад, у стандартній суміші міститься оцтової кислоти 60 %, пропіонової 20, масляної 15, ізовалеріанової 2 та валеріанової кислоти 3 %. Провівши підрахунки хроматограм, отримують такі показники: оцтової кислоти 52 %, пропіонової 18, масляної 23, ізовалеріанової 2,9 та валеріанової кислоти 4,1 %.

Підраховують поправочний коефіцієнт для оцтової кислоти ($60 : 52 = 1,153$) і таким же способом для всіх інших кислот: пропіонової ($20 : 18 = 1,1$), масляної ($15 : 23 = 0,652$), ізовалеріанової ($2 : 2,3 = 0,689$) та валеріанової ($3 : 3,1 = 0,731$).

Примітка. Для постійного контролю роботи приладу суміш стандартних кислот необхідно вводити перед початком досліджень, а потім через кожні 8—10 проб.

Клінічне значення. Кінцевий продукт ферментації вуглеводів — ЛЖК. Серед них вміст оцтової, пропіонової та масляної кислот становить близько 95 %. Решта припадає на валеріанову, ізовалеріанову, ізомасляну та капронову кислоти. За даними А. В. Чуба (2002), у вмісті рубця клінічно здорових високопродуктивних корів міститься 45–55 % ($52 \pm 1,3$) оцтової, 20–30 ($27 \pm 1,12$) пропіонової, піонової, 15–20 % ($22 \pm 1,33$) масляної, $2,0 \pm 0,4$ % ізовалеріанової та $2,8 \pm 0,6$ % валеріанової кислот. В. В. Влізло (1998) виявляв у вмісті рубця незначну кількість ізомасляної кислоти.

Збільшення в раціоні жуйних клітковини призводить до зростання синтезу оцтової кислоти, крохмалю — пропіонової, цукру — молочної, потім пропіонової кислоти. Зменшується концентрація оцтової кислоти при низькому вмісті сіна в раціоні, а також у хворих на кетоз, гепатодистрофію корів і при зміщенні сичуга. Відносно збільшується кількість масляної кислоти при кетозі (в 1,4 рази), тому співвідношення між пропіоновою та

масляною кислотами зменшується у хворих до $1,04 \pm 0,08$ порівняно з $1,37 \pm 0,09$ у здорових (А. В. Чуб, 2002).

При вторинній дистонії рубця збільшується вміст ізовалеріанової та валеріанової кислот. Особливо зростає їхня концентрація при зміщенні сичуга ($4,2 \pm 0,1$ і $7,2 \pm 0,9$ % відповідно). Ймовірно, це пояснюється тим, що при зниженні в раціоні клітковини бактерії рубця потребуватимуть для свого росту добавки валеріанової, ізовалеріанової та ізомасляної кислот.

ЕКСПРЕС-МЕТОДИ ВИЗНАЧЕННЯ ФУНКЦІОНАЛЬНОЇ АКТИВНОСТІ МІКРОБІОМА РУБЦЯ

Проба з метиленовим синім (за G. Dirksen). Принцип. Барвник — метиленовий синій, введений у вміст рубця (*in vitro*), знебарвлюється, відновлюючись ферментами мікроорганізмів. Реактив: 0,03 %- ний розчин метиленового синього. Обладнання: водяна баня; пробірки або хімічні стаканчики; скляні палички; секундомір або годинник.

Хід визначення. У пробірці або хімічний стаканчик на 20 мл наливають 10 мл свіжовзятого вмісту рубця, додають 0,5 мл (у стаканчик — 1 мл) 0,03 %-ного розчину метиленового синього та перемішують скляною паличкою. Паралельно проводять контрольний аналіз без додавання метиленового синього. Пробірки (стаканчики) перемішують на водяну баню при температурі 38 °С і контролюють час знебарвлення барвника, порівнюючи дослідну пробу з контрольною.

У здорової великої рогатої худоби при змішаному типі годівлі знебарвлення настає за 3 хв. Якщо ж знебарвлення триває 15—17 хв, необхідно звернути увагу на годівлю тварин (якість корму та режим годівлі). Збільшення часу знебарвлення розчину метиленового синього до 30 хв і більше свідчить про захворювання передшлунків.

Проба зі зброджуванням глюкози. Принцип. Легкоперетравлювані вуглеводи, що надходять з кормом у рубці, активно ферментуються мікрофлорою до ЛЖК і газів (вуглекислий, метан, водень). Додаючи глюкозу до вмісту рубця (*in vitro*), фіксують активність газоутворення і таким чином роблять висновки про ферментативну здатність мікроорганізмів. Реактив: свіжоприготований 16 %-вий розчин глюкози. Обладнання: цукромір або градуйовані пробірки; термостат.

Хід визначення. У цукромірі або градуйованій пробірці змішують 10 мл свіжого вмісту рубця з 0,5 мл 16%-ного злегка підігрітого розчину глюкози і ставлять у термостат при температурі 38 °С. Інтенсивність ферментації глюкози визначають через 30 і 60 хв за величиною утвореного прошарку газів.

У вмісті рубця здорової великої рогатої худоби під час бродіння глюкози газовий прошарок товщиною 1 см утворюється протягом 30 хв, а через 60 хв його товщина досягає 2 см. При інактивації мікрофлори (ацидоз, алкалоз) кількість утворених газів незначна або їх немає зовсім. При тимпанії рубця газоутворення значно зростає.

Проба з відновленням нітратів. Принцип. Внесення нітрату калію у вміст рубця (*in vitro*) викликає його відновлення мікроорганізмами та використання азоту, що характеризується зникненням червоного кольору.

Реактиви: 0,025 %- ний розчин нітрату калію (KN 03);

реагент 1: 2,0 мл концентрованої сірчаної кислоти змішують з 200 мл 30%-ного розчину оцтової кислоти;

реагент 2: 0,6 мл оснафтиліну, 16,0 мл концентрованої оцтової кислоти змішують із 140 мл дистильованої води. Обладнання: водяна баня; пробірки; пластина з комірками.

Хід визначення. У кожену пробірку наливають по 10 мл вмісту рубця. У першу пробірку вносять 0,2 мл, у другу — 0,5 мл і, за необхідності, у третю — 0,7 мл 0,025 %-ного розчину нітрату калію. Пробірки ставлять у водяну баню при температурі 39 °С. Через 5 хв з кожної пробірки беруть по 1 краплі суміші та наносять на пластинку з комірками. Потім додають по 2 краплі реактивів 1 і

2. Якщо відновлення нітратів не відбулося, то суміш забарвлюється в червоний колір. У разі розщеплення нітрату калію мікрофлорою протягом 5 хв забарвлення не з'являється. При появі червоного кольору продовжують контролювати час знебарвлення щохвилини.

У вмісті рубця здорових тварин KNO_3 відновлюється через 5—10 хв у першій пробірці та через 20 і 30 хв відповідно у другій і третій. При порушенні ферментативної активності мікрофлори (ацидоз, алкалоз, атонія, гіпотонія) час відновлення затулюється або ж відновлення взагалі не відбувається.

Визначення целюлолітичної активності мікрофлори. Розщеплення грубого корму у жуйних відбувається за допомогою ферментів целюлолітичних мікроорганізмів, які заселяють рубці під час споживання перших порцій сіна (приблизно у двотижневому віці). Уже у 2—3-місячному віці відзначають максимальну целюлолітичну активність мікроорганізмів. Розщеплення клітковини призводить до утворення ЛЖК — джерела енергії тварин. У передшлунках засвоюється 60—70 % клітковини.

Принцип базується на здатності целюлолітичної мікрофлори перетравлювати бавовняну нитку (*in vitro*). Реактив: 16 %- ний розчин глюкози. Обладнання: термостат; пробірки; скляна кулька; натуральна бавовняна нитка № 10 (штучну або напівсинтетичну не використовують).

Хід визначення. У пробірці змішують 10 мл свіжоотриманого вмісту рубця та 0,3 мл 16 %-го розчину глюкози. До кінця бавовняної нитки прив'язують скляну кульку та опускають її на дно пробірки з досліджуваним вмістом. Інший кінець нитки фіксують навколо зовнішнього краю пробірки.

Пробірку поміщають у термостат за температури 39 °С. Перший контроль проводять через 12 годин інкубації. За наявності нормальної целюлолітичної активності мікробіоти рубця бавовняна нитка перетравлюється протягом 96 годин.

Якщо протягом зазначеного часу перетравлення нитки не відбулося, целюлолітичну активність мікробіоти рубця оцінюють як негативну.

Визначення амілолітичної активності вмісту рубця. Визначення амілолітичної активності вмісту рубця базується на принципі розщеплення крохмалю мікробною амілазою; фотоелектроколориметричний аналіз проводиться за кольоровою реакцією крохмалю та йоду.

Реактиви: 6,25%-ний розчин крохмалю (готується безпосередньо перед використанням). У колбу на 250 мл відважують 6,25 г водорозчинного крохмалю і доливають 80 мл дистильованої води. Після утворення суспензії крохмалю колбу 10 хв витримують у киплячій водяній бані (до повного розчинення крохмалю), часто струшуючи. Розчин крохмалю, охолоджений до кімнатної температури, переносимо у мірну колбу на 100 мл і доводять об'єм кип'яченою дистильованою водою до позначки; фосфатний буфер, рН 6,8; 2 Н розчин хлористоводневої кислоти (HCl); розчин йодиду калію. Розчиняють 20 г йодиду калію та 2 г кристалічного йоду в 1 л дистильованої води. Обладнання: фотоелектроколориметр; водяна баня; мірні колби на 50 мл.

Хід визначення. У пробірці змішують 1,6 мл 6,25 %-го розчину крохмального субстрату з 7,4 мл фосфатного буфера. Після 10-хвилинного попереднього нагрівання пробірки у водяній бані при температурі 40 °С додають 1 мл рідини рубця, попередньо процідженої через два шари марлі.

Вміст пробірки ретельно перемішують і одразу відбирають 0,5 мл суміші, яку переносять у мірну колбу на 50 мл з додаванням 2 мл 2 н. розчину HCl для припинення дії мікробних ферментів. До колби додають 2 мл розчину йодистого калію та доводять об'єм дистильованою водою до 50 мл (проба до інкубації).

Після цього пробірку інкубують протягом 1 години у водяній бані при температурі 40 °С, періодично (кожні 10–15 хв) перемішуючи вміст шляхом струшування.

Після завершення інкубації відбирають 0,5 мл реакційної суміші та переносять у мірну колбу на 50 мл з додаванням 2 мл 2 н. розчину HCl. Додають 2 мл розчину йодистого калію та доводять об'єм дистильованою водою до 50 мл (проба після інкубації).

Отримані розчини проб до інкубації та через 1 год після неї досліджують на ФЕК у кюветах на 5 мм при червоному світлофільтрі (620 нм) проти дистильованої води.

Розрахунок. За калібрувальною кривою визначають кількість крохмалю (мг) у розчинах до інкубації та після неї. Різниця між цими показниками дає кількість крохмалю, розщепленого мікробною амілазою за 1 год інкубації. Амілолітична активність виражається формулою

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

де x — кількість крохмалю, розщепленого 1 мл вмісту рубця за 1 год, мг; A — кількість крохмалю в розчині до інкубації, мг; B — кількість крохмалю після інкубації, мг; 20 — коефіцієнт перерахунку на 1 мл вмісту рубця.

Визначення активності α -амілази. Принцип. Визначають кількість редукуючих цукрів, які утворюються внаслідок ферментативного

розщеплення крохмалю. В основу методу покладено кольорову реакцію з 3,5-динітросаліциловою кислотою, яка в лужному середовищі за наявності редукуючих цукрів перетворюється на 3-аміно-5-нітросаліцилову кислоту й утворює розчин жовто-помаранчевого кольору. Реактиви: розчин 3,5-динітросаліцилової кислоти. 1 г 3,5-динітросаліцилової кислоти та 30 г сегнетової солі розчиняють у 20 мл 2 н. розчину NaOH і доводять об'єм до 100 мл; 2 н. розчин NaOH; калій-натрій виннокислий (сегнетова сіль); мальтоза (для приготування стандартного розчину); 1/15 М розчин натрію хлориду; 1%-вий розчин крохмалю (субстрат). Обладнання: фотоколориметр.

Хід визначення. Рідину рубця розводять дистильованою водою у співвідношенні 1:5. У дослідну пробірку наливають 1 мл 1%-ного розчину крохмалю і ставлять у водяну баню при 39 °С на 1—2 хв. Додають 1 мл розведеного вмісту рубця, інкубують 20 хв. Додають 2 мл 3,5-динітросаліцилової кислоти для припинення реакції. У контрольну пробірку набирають 2 мл розчину 3,5-динітросаліцилової кислоти, 1 мл розведеного вмісту рубця, а потім 1 мл 1%-ного розчину крохмалю і перемішують. Обидві пробірки поміщають у киплячу водяну баню на 5 хв, негайно охолоджують у проточній воді та фотометрують при 530 нм.

Активність α -амілази обчислюють за різницею показників ФЕК між дослідними та контрольними пробами, а потім за калібрувальним графіком визначають кількість мальтози, яка вивільнилася внаслідок ферментативної реакції, за формулою де E — кількість одиниць активності α -амілази, виражена в мг мальтози; A — кількість мальтози, визначена за графіком; P — ступінь розведення хімусу (у 5 разів); 20 — час інкубації, хв.

Якщо параметри дотримані, то $E = -A \cdot \frac{1}{5} = -\frac{A}{5}$.

Примітка. Необхідно відпрацювати кінетику ферменту, тобто тривалість інкубації.

Визначення протеїназної активності вмісту рубця. Принцип. При рН більше 5,0 α -амінокислоти реагують з нінгідриним з утворенням вуглекислоти, альдегіду та сполуки, забарвленої в синій колір, яка характеризується максимальним поглинанням при довжині хвилі 597 нм. Інтенсивність забарвлення прямо пропорційна кількості амінокислот. Реактиви: фосфатний буфер, рН 7,1; цитратний буфер, рН 5,4; 2%-ний розчин казеїну, приготований на 0,5%-ному розчині NaHCO_3 ; 0,5%-ний розчин карбонату натрію; 10%-вий розчин трихлороцтової кислоти; 0,01 н. розчин хлористоводневої кислоти (HCl); 60%-ний розчин гліцерину; 1%-ний розчин нінгідрину (розчиняють при підігріванні в цитратному буфері; реактив темного кольору необхідно очищати); розчин «С»: до 40 мл 60%-ного гліцерину додають 100 мл 1%-ного нінгідрину та 40 мл цитратного буфера (готують перед аналізом).

Хід визначення. В одну пробірку (дослід) вносять 4 мл розчину казеїну, 1 мл фосфатного буфера і поміщають у водяну баню при температурі 30 °С. Через 10 хв додають 1 мл розведеного в 5 разів

дистильованою водою вмісту рубця (1 + 4), змішаного та інкубованого при 30 °С протягом 60 хв. Додають 4 мл 10%-ного розчину трихлороцтової кислоти для припинення реакції. Збовтують 10 хв, центрифугують або фільтрують (фільтрат має бути прозорим).

Набирають 0,2 мл фільтрату або аліквоту, додають 3,8 мл розчину «С», пробірки закривають притертими скляними пробками і ставлять у киплячу водяну баню на 20 хв.

Зразки, забарвлені в синій колір, охолоджують у проточній воді та фотометрують через 10—15 хв на приладі з червоним світлофільтром у кюветі на 10 мм. Інтенсивність забарвлення зберігається протягом 1 год. У контрольну пробірку вносять 1 мл розведеного вмісту рубця, 1 мл фосфатного буфера, 4 мл трихлороцтової кислоти, витримують 10 хв у водяній бані при температурі 30°С. Після цього вносять 4 мл розчину казеїну, змішують і фільтрують. Потім досліджують так само, як дослідну пробу. Кількість вільного амінного азоту визначають за калібрувальним графіком. Для його побудови беруть стандартні розчини тирозину або гліцину і готують ряд розчинів, які містять різну кількість цих амінокислот (мкмоль), і далі реакцію проводять так само, як описано вище. Активність ферменту виражають у мікромолях амінного азоту гліцину або тирозину за 1 хв на 1 г ферментного препарату (вмісту рубця), що відповідає 1 од. активності:

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

де x — активність ферменту, мкмоль/л; A — показник стандартного графіка; B — ступінь розведення (у 5 разів); T — час інкубації (60 хв).

Визначення ліполітичної активності вмісту рубця Принцип. Вміст інкубують з приготованою емульсією соняшникової олії. Показником активності ферментів є кількість вивільнених вільних жирних кислот.

Реактиви: соняшникова олія; 0,6 %-ний розчин цистеїну солянокислого або аскорбінової кислоти; жовч; 20%-вий розчин фосфорно-вольфрамової кислоти; 0,01 н. розчин NaOH; розчин Рінгера—Локка: 9 г NaCl, 0,2 г NaHCO₃, 0,2 г CaCl₂, 0,2 г KCl, 1 г глюкози та дистильованої води до 1 л; індикатор Ташіро: 40 мл 0,1%-ного спиртового розчину метилового червоного та 10 мл 0,1%-ного спиртового розчину метиленового синього.

Обладнання: термостат; холодильник; бюретка; колба на 100 мл з притертими пробками.

Хід визначення. Вміст рубця добре перемішують і готують розведення 1:10. Готують субстратну суміш: 3 мл соняшникової олії, 3 мл розчину Рінгера—Локка, 1 мл 0,6%-ного розчину цистеїну солянокислого та 3 краплі жовчі.

У колби на 100 мл (2 дослідні та 2 контрольні) з притертими пробками набирають по 3 мл розчину Рінгера—Локка та 1 мл вмісту

рубця. Дослідні проби ставлять у термостат при температурі 39 °С на 5 год, контрольні — у холодильник. Через кожну годину проби струшують 5 хв. Через 5 год додають у колби по 3 краплі 20 %-ного розчину фосфорно-вольфрамової кислоти та дослідні проби поміщають у холодильник. Вміст колбочок фільтрують у пробірки, додають по 1 краплі індикатора Ташіро. Дослідні та контрольні проби тестують 0,01н. розчином NaOH до рожевого кольору.

ВИЗНАЧЕННЯ ЗАГАЛЬНОЇ КИСЛОТНОСТІ ВМІСТУ РУБЦЯ

Загальну кислотність вмісту рубця визначають аналогічно до кислотності вмісту шлунка або сичуга. Принцип. До вмісту рубця в присутності індикатора титруванням розчин лугу, що викликає зміну кольору.

Реактиви: 0,1%-вий спиртовий розчин фенолфталеїну. 1 г фенолфталеїну вносять у колбу на 100 мл і розчиняють 96%-вим етиловим спиртом. Готовий реактив зберігають при кімнатній температурі; 0,1 н. розчин натрію гідроксиду (NaOH). Готують з фіксанула, перед застосуванням його титр перевіряють 0,1 н. розчином хлористоводневої кислоти (HCl).

Обладнання: мікробюретки на 2 і 5 мл; колби на 50 і 100 мл; стаканчики або конічні колбочки; піпетки на 5 і 10 мл; крапельниця.

Хід визначення. У стаканчик або конічну колбочку наливають 10 мл профільтрованого вмісту рубця і додають з крапельниці 1—2 краплі 1%-ного розчину фенолфталеїну. У кислому розчині індикатор не змінює кольору. При титруванні з мікробюретки 0,1 н. розчином натрію гідроксиду колір змінюється на рожево-червоний. Загальна кислотність вмісту рубця визначається кількістю мілілітрів 0,1 н. розчину натрію гідроксиду, необхідного для титрування 1 л (1000 мл) вмісту рубця (од. титру). 1 од. титру (ОТ) відповідає концентрації кислот у 1 ммоль/л.

Розрахунок загальної кислотності проводять за формулою

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

де x — загальна кислотність, ммоль/л (ЕТ); A — кількість 0,1 н. розчину NaOH, мл; 1000 — перерахунок на 1 л; 0,1 — кількість міліграм-еквівалентів луку в 1 мл 0,1 н. розчину, ммоль; C — об'єм вмісту рубця, взятого для дослідження, мл.

У клінічно здорових корів з нормальною ферментацією вмісту загальна кислотність становить 8—25 ммоль/л (ЕТ). У гіперацидному стані (ацидоз, непрохідність сичуга, антиперистальтика) загальна кислотність зростає до 70 ммоль/л (ЕТ).

ВИЗНАЧЕННЯ АЗОТИСТИХ РЕЧОВИН У ВМІСТІ РУБЦЯ

Визначення загального азоту в рідині рубця. Для визначення концентрації загального азоту в рубцевій рідині використовують метод К'ельдаля.

Принцип. Метод базується на здатності органічних сполук під впливом киплячої сірчаної кислоти окислюватися до вуглекислоти та води. Азот білкових та близьких до них сполук при цьому гідролізується, утворюючи в присутності води іони амонію. Метод виконують у три етапи: мінералізації (спалювання) проби, відгону аміаку та його визначення.

Реактиви : концентрована H_2SO_4 ; 33%-вий розчин NaOH ; 0,01 н. (0,01 моль/л) розчин NaOH ; 0,01 н. (0,005 моль/л) H_2SO_4 ; індикатор Ташіро; каталізатор, що складається з $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$), міді сульфату та селену у співвідношенні 100:10:5.

Обладнання: колби К'ельдаля на 100 мл; плитка для спалювання зразків; прилад К'ельдаля для перегонки проби; піпетки; бюретки на 10 мл; індикаторний папір.

Хід визначення. У колбу К'ельдаля обережно наливають 1 мл рубцевого вмісту. Туди ж доливають 5 мл H_2SO_4 (концентрованої) і 1 г каталізатора. Колби ставлять під кутом спочатку на слабке, а потім на сильне полум'я, не доводячи до сильного кипіння. Спалювання припиняють, коли рідина в колбі стане прозорою.

У перегінну колбу переносять всю спалену пробу. У приймальну колбу наливають 10—20 мл 0,01 н. розчину сірчаної кислоти та 3—4 краплі індикатора Ташіро, підставляють її під скляну трубочку, з'єднану з холодильником апарату К'ельдаля, опускаючи кінець трубки в розчин кислоти.

Відміряють 30—40 мл 33%-ного розчину NaOH і заливають його через воронку в перегінну колбу. Вмикають нагрівач і починають відганяти проби. Під час кип'ятіння виділяється аміак, який разом з парами води після проходження через холодильник потрапляє в приймач і зв'язується з сірчаною кислотою. Відгонку продовжують 15—30 хв до нейтральної реакції, перевіряючи індикаторним папером.

Вміст приймальної колби титрують 0,01 н. розчином NaOH до зміни малинового кольору на зелений.

Розрахунок кількості загального азоту в пробі проводять за формулою Розбіжність результатів паралельних визначень не повинна перевищувати 2—3 %.

Концентрація загального азоту, який представлений білком мікроорганізмів, нерозщепленим протеїном корму, кінцевими та проміжними продуктами азотистого обміну (аміак, вільні амінокислоти, пептиди та ін.), у цільному вмісті рубця корів може становити 100—300 мг/100 мл, у рубцевій рідині — від 50 до 240 мг/100 мл, у овець — 120—350 та 60—250 мг/100 мл відповідно.

Визначення білкового та небілкового (залишкового) азоту в рідині рубця. *Визначення небілкового азоту.* Небілковий азот у рубцевій рідині визначають методом К'ельдаля. Попередньо необхідно осадити білки. З цією метою використовують солі важких металів,

оскільки трихлороцтова кислота недостатньо повно осаджує рослинні білки та поліпептиди.

Реактиви: 0,3 Н (0,15 моль/л) розчин $\text{Ba}(\text{OH})_2$; 5 %-ний ZnSO_4 ; фенолфталеїн (індикатор); інші реактиви ті самі, що й при визначенні загального азоту. Обладнання: центрифуга; колби К'ельдаля на 100 мл; прилад К'ельдаля для перегонки проби; піпетки, бюретки; електроплитка.

Хід визначення . Для осадження білків у центрифужну пробірку наливають рубцеву рідину певного об'єму (наприклад, 2 мл). Туди ж додають таку саму кількість 0,3 н. розчину $\text{Ba}(\text{OH})_2$ та аналогічний об'єм 5%-го розчину сульфату цинку. Реактиви попередньо повинні бути відтитровані, тобто повинні точно нейтралізувати один одного за фенолфталеїном (об'єм на об'єм). Суміш ретельно перемішують і центрифугують 15 хв при 3000—5000 об/хв. 3 мл центрифугату, що відповідає 1 мл рубцевої рідини, переносять у колбу К'ельдаля, заливають 3 мл концентрованої сірчаної кислоти. Спалювання проби та відгонку аміаку проводять так само, як і при визначенні загального азоту. З огляду на те, що концентрація небілкового азоту у вмісті рубця не перевищує 60 мг/100 мл, у приймальну колбу достатньо налити 10 мл 0,01 н. розчину сірчаної кислоти.

Розрахунок вмісту небілкового азоту, як і загального азоту, проводять за формулою

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

де x — концентрація небілкового азоту, мг/100 мл; A — об'єм 0,01 н розчину H_2SO_4 у приймачі, мл; B — об'єм 0,01 н розчину NaOH , витраченого на титрування, мл.

Визначення білкового азоту. Білковий азот визначають за різницею загального та небілкового азоту.

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

де x — кількість загального азоту в 100 мл рубцевої рідини, мг; A — кількість 0,01 н. розчину H_2SO_4 у приймачі, мл; B — кількість 0,01 н. розчину NaOH , що пішла на титрування, мл; 0,14 — кількість азоту, що зв'язується 1 мл 0,01 н. розчину сірчаної кислоти, мг. Кількість небілкового азоту в рубцевій рідині великої рогатої худоби становить 15—60 мг/100 мл, овець — 10—50 мг/100 мл, небілкового відповідно 35—200 і 40—240 мг/100 мл.

Визначення аміаку (амонійного азоту) за допомогою реактиву Несслера. Реактиви: реактив Несслера; сульфат амонію.

Обладнання: спектрофотометр або фотоелектроколориметр; центрифуга. Хід визначення. Мікропіпеткою відбирають 20 мкл відцентрифугованої рідини рубця, переносять у пробірки, в які попередньо набирають по 5 мл дистильованої води, перемішують. Додають по 0,2 мл реактиву Несслера і знову перемішують. Зразки, в яких колір став жовтим, через 10 хв спектрофотометрують при довжині хвилі 410 нм. Оптичну густину вимірюють проти контрольного зразка,

до складу якого входять ті ж інгредієнти, але замість рубцевої рідини — 20 мкл дистильованої води. Таким же чином обробляють 20 мкл стандартного розчину, використовуючи з цією метою сульфат амонію. Готують його з розрахунку 0,4716 г перекристалізованого $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ на 1 л бідистильованої води. У 1 мл такого розчину міститься 100 мкг азоту (у 20 мкл — 2 мкг).

Розрахунок кількості аміаку в рідині рубця проводять за формулою

$$x = EП A/EC,$$

де x — кількість аміаку в пробі, мкг; $Eп$ — екстинкція проби; A — кількість аміаку в стандартному розчині, мл; Ec — екстинкція стандарту.

Визначення аміаку мікродифузійним методом. Принцип . Метод полягає у витісненні аміаку з амонійних солей концентрованим розчином луку з подальшим поглинанням його титрованим розчином кислоти.

Реактиви : 0,02 н. (0,01 моль/л) розчин сірчаної кислоти; насичений розчин K_2CO_3 ; 0,01 н. (0,01 моль/л) розчин натрію гідроксиду; індикатор Ташіро. Готують два розчини: 1) 50 мг метиленового синього розчиняють у 50 мл спирту; 2) 100 мг метиленового червоного (метилрота) розчиняють у 50 мл спирту. Потім обидва розчини з'єднують у рівних об'ємах.

Обладнання: чашки Конвея; піпетки; бюретки на 2 мл. Хід визначення. Попередньо готують чашку Конвея, зовнішній верхній край її змащують вазеліном. У внутрішню камеру чашки Конвея заливають точно відміряну кількість 0,02 н. розчину сірчаної кислоти. Виходячи з передбачуваного рівня аміаку в пробі, об'єм розчину може становити 2 або 3 мл. Туди ж додають 3—4 краплі індикатора Ташіро. У зовнішню камеру чашки Конвея наливають 1 мл рубцевої рідини і чашку закривають кришкою. Потім, трохи зовнішню камеру обережно з протилежного боку від наливої рубцевої рідини вливають 2 мл насиченого розчину K_2CO_3 . Кришку швидко закривають, перевіряють герметичність камери та обережно змішують досліджувану рідину з лугом. Паралельно з дослідними ставлять контрольну («сліпу») пробу, при цьому в зовнішню камеру чашки замість рубцевої рідини наливають 1 мл дистильованої води. Решта маніпуляцій такі ж, як і з дослідною пробою.

Потім чашки з дослідними пробами та контрольну ставлять на час, необхідний для повного витіснення з аналізованого розчину аміаку та подальшого поглинання його розчином сірчаної кислоти. Зазвичай дифузія при кімнатній температурі триває не менше 12 год. Однак найчастіше її проводять 20—24 год. Після закінчення цього терміну надлишок кислоти відтитровують 0,01 н. розчином натрію гідроксиду до переходу малинового забарвлення в зелене.

Розрахунок проводять за формулою

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

де x — кількість аміаку в 100 мл рідини, мг; A — кількість 0,01 н. розчину NaOH, що пішла на титрування контрольної проби, мл; B — кількість 0,01 н. розчину NaOH, що пішла на титрування дослідної проби, мл; 0,17 — кількість аміаку, еквівалентна 1 мл 0,01 н. розчину NaOH або 1 мл 0,01 н. розчину H₂SO₄, мл; 100 — коефіцієнт для переведення в мг/100 мл.

Слід зазначити, що даний метод аналізу дозволяє виявляти не тільки вільний газоподібний аміак, але й аміак рубцевого вмісту, що знаходиться у зв'язаному стані у вигляді амонію. Тому краще розраховувати вміст у рубцевій рідині азоту аміаку або амонійного азоту за формулою

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

де 0,14 — кількість амонійного азоту, еквівалентна 1 мл 0,01 н. розчину NaOH або 1 мл 0,01 н. розчину H₂SO₄, мл.

Приклад: на титрування контрольної проби пішло 4 мл 0,01 н. розчину NaOH; на титрування дослідної проби — 2,24 мл 0,01 н. розчину NaOH; $x = (4,00 - 2,24) \cdot 0,14 \cdot 100 = 24,64$ мг/100 мл. Отже, у 100 мл рубцевої рідини міститься 24,64 мг азоту аміаку або амонійного азоту.

Клінічне значення. Аміак — кінцевий продукт перетворення білкових і небілкових речовин корму. Його кількість, що утворюється в рубці, залежить насамперед від кількості білка, співвідношення легко- та важкорозчинного протеїну в кормах раціону, азотовмісних небЗі 2л8к ових сполук, а також інтенсивності його використання при синтезі мікробного білка та всмоктування в кров. За звичайних умов годівлі тварин, концентрація аміаку може становити від 5 до 40 мг/ 100 мл (2 , 8 — 22 ммоль/ л), але оптимальна кількість — 6 , 5 — 25 мг/ 100 мл.

Швидкість утворення аміаку та його концентрація у вмісті рубця визначаються забезпеченістю раціонів енергією та використанням аміаку рубцевою мікрофлорою для синтезу білка. Встановлено, що максимальна швидкість синтезу білка мікроорганізмами буває при концентрації амонійного азоту в рубці в межах від 5 до 20 мг/100 мл (від 2,8 до 11,0 ммоль/л). При концентрації вище 50 мг/100 мл (27,5 ммоль/л) аміак починає інтенсивно всмоктуватися в кров. Більша частина його в печінці перетворюється на сечовину (орнітиновий цикл), деяка кількість сечовини синтезується з аміаку в нирках (цикл Кребса—Генселяйта).

Збільшення утворення аміаку в рубці спостерігається при порушенні співвідношення в кормах раціону між легко- та важкорозчинним протеїном (оптимальним є 50—60 % легкокорозчинного протеїну на початку лактації та 65—70 % у середній і останній третині лактації); при згодовуванні зеленої маси люцерни, конюшини, озимої жита; при підвищеному рівні нітратів у кормах; використанні вуглеамонійних солей, аміачної води; годуванні неякісного силосу та сінажу, в яких вміст амонійного азоту може становити 35—50 % загального азоту. Крім того, у цих випадках рН вмісту рубця

зміщується в лужну сторону, що збільшує швидкість всмоктування аміаку в кров.

Знешкодження аміаку порушується при патології печінки (гепатит, цироз, гепатодистрофія) внаслідок зменшення синтезу сечовини. Його кількість у крові збільшується (*гіперамоніємія*): в артеріальній до 20—129 мкмоль/л, у венозній до 12—85 мкмоль/л (у здорових корів 7,0—30,0 та 5,5—25 відповідно). Аміак легко проникає через гематоенцефалічний бар'єр, і його кількість у лікворі може становити 40—64 мкмоль/л проти 8,5 мкмоль/л у здорових корів (В. В. Влізло, 1998). Солі амонію різко пригнічують обмін ацетилхоліну, і у тварин розвивається печінкова енцефалопатія та печінкова кома.

Аміак, що накопичується в тканинах, блокує цикл Кребса, що неминуче призводить до порушення окислювально-відновних процесів в організмі, тобто до стану гіпоксії. Пригнічення тканинного дихання має наслідком порушення синтезу макроенергетичних сполук (АТФ, КФ). Вважають, що це може бути пов'язано з блокуванням α -кетоглутарової кислоти внаслідок активації процесу відновного амінування або пригнічення активності ферментів, що беруть участь в окислювальному декарбоксилюванні α -кетокислот (В. С. Калашников, 2000). Вплив амонійного азоту на організм моногастричних тварин значно сильніший внаслідок відсутності у них гепаторенальної системи обміну азоту.

ВИЗНАЧЕННЯ НІТРИТІВ У РІДИНІ РУБЦЯ

Принцип. Метод базується на реакції Грісса, за якою при взаємодії реактиву Грісса з іонами NO_2 утворюється забарвлений розчин; інтенсивність забарвлення залежить від концентрації нітритів.

Реактиви: 0,3 Н розчин $\text{Ba}(\text{OH})_2$; 5 % розчин сульфату цинку; фенолфталеїн (індикатор); 5%-вий розчин аміаку; 0,1 н. розчин хлористоводневої кислоти (HCl); 96%-ний етиловий спирт; сульфанілова кислота; ос-нафтиламін; 12 % розчин оцтової кислоти; реактив Грісса. Складається з рівних об'ємів двох розчинів; а) 0,5 г сульфанілової кислоти розчиняють у 150 мл 12%-ного розчину оцтової кислоти; б) змішують 180 мл 12%-ного розчину оцтової кислоти з фільтратом водного розчину а-нафтиламіну, отриманого при кип'ятінні 0,2 г останнього в 20 мл дистильованої води. Зберігають розчин у темному місці, а перед використанням готують необхідну кількість розчину Грісса. Обладнання: фотоелектроколориметр або спектрофотометр; мірні колби на 100 мл.

Хід визначення. Попередньо важливо приготувати осаджувачі. Обидва розчини [0,3 Н $\text{Ba}(\text{OH})_2$ і 5%-вий розчин ZnSO_4] повинні точно нейтралізувати один одного за фенолфталеїном (об'єм на об'єм). Потім осаджують білки рубцевої рідини. Для цього в пробірки наливають по 2 мл рубцевої рідини, додають такий самий об'єм гідроксиду барію та сульфату цинку. Суміш ретельно перемішують і центрифугують 15 хв при 3000—5000 об/хв. 20 мл отриманого центрифугату переносять у мірну колбу на 100 мл, куди послідовно додають 5 мл 5%-ного розчину аміаку, 10 мл 0,1 н. розчину хлористоводневої кислоти і доводять об'єм до позначки дистильованою

водою. З отриманого розчину беруть 15 мл і змішують з 15 мл реактиву Грісса. Через 15 хв визначають інтенсивність забарвлення на електроколориметрі при зеленому світлофільтрі в кюветі на 20 мм. За показаннями екстинкції за допомогою калібрувального графіка обчислюють вміст нітритів у даному розчині.

Калібрувальний графік будують за стандартним розчином нітриту натрію (NaNO_2) з концентрацією нітриту від 0,1 до 1 мкг в 1 мл.

Розрахунок кількості нітритів у 100 мл рубцевої рідини проводять за формулою

$$X = E \cdot 1500,$$

нітритів у 1 мл, що відповідають отриманій екстинкції; 1500 — добуток $15 \cdot 100$, де 15 — число, на яке множать кількість рубцевої рідини, що міститься в 20 мл безбілкового фільтрату, щоб привести до 100 мл рубцевої рідини; 100 — число, на яке необхідно помножити кількість нітритів, знайдене за калібрувальною кривою (E), щоб визначити, скільки нітритів міститься в 20 мл безбілкового фільтрату.

Якщо показник екстинкції вищий за діапазон калібрувальної кривої, отриманий безбілковий фільтрат розводять певною кількістю дистильованої води і при розрахунках враховують ступінь розведення (P) фільтрату.

МЕТОДИ ПІДРАХУНКУ МІКРООРГАНІЗМІВ У ВМІСТІ РУБЦЯ

У рубці жуйних існує безліч різних мікроорганізмів — бактерій і найпростіших. Завдяки їхній активній діяльності поживні субстрати корму піддаються глибоким ферментативним перетворенням корму, внаслідок чого утворюються ЛЖК, аміак, амінокислоти, що використовуються організмом у процесі обміну. Поряд з перетворенням складових частин корму на сполуки, доступні для засвоєння в передшлунках, відбувається синтез життєво важливих амінокислот, вітамінів. Потрапляючи в нижчерозташовані відділи травного каналу, бактерії та найпростіші перетравлюються і забезпечують організм жуйних повноцінними білками.

Зростанню та розвитку великої кількості різноманітної за складом мікрофлори та мікрофауни сприяють певні сприятливі умови середовища в рубці, зокрема рН вмісту, постійний іонний склад, безперервне постачання мікроорганізмів живильним середовищем (кормом), анаеробні умови.

Бактерії та найпростіші дуже чутливо реагують на зміни у годівлі та утриманні тварин. Наприклад, кількість інфузорій збільшується при додаванні до раціону достатньої кількості сіна, вуглеводних кормів. Якщо ж у раціоні переважає силос, кількість найпростіших зменшується, змінюється їх видовий склад. Влітку при годуванні зеленими кормами їх, як правило, стає більше порівняно із зимовим раціоном. Майже повністю вони зникають при голодуванні, патологічному стані передшлунків, атонії, тимпанії рубця, травматичному ретикулоперитоніті.

Визначення кількості інфузорій. У рубці у жуйних знаходиться приблизно 100 видів інфузорій. Переважно вони представлені класом *Ciliata*, до якого входять дві великі групи: підклас *Holotricha* та підклас *Spirotricha*. Інфузорії першої групи рівнореснитчаті (вся їхня поверхня рівномірно

покрита та віями). Підклас *Spirotricha* (маловіїсті) у рубці становить 60—80 % загальної кількості інфузорій.

Наявність у рубці великої кількості інфузорій свідчить про нормальний та ефективний перебіг ферментативних процесів. Найбільш чутливі до змін середовища рубця великі інфузорії. За несприятливих умов існування в рубці вони зникають у першу чергу і з'являються при нормалізації процесів останніми.

Видовий склад найпростіших визначають тільки у свіжому вмісті рубця. Для цього краплю його наносять на предметне скло, накривають покривним склом і розглядають під мікроскопом спочатку при малому (окуляр х7, об'єктив х10), потім при великому (окуляр х7, об'єктив х40) збільшенні в злегка затемненому полі зору. Оскільки інфузорії, особливо великі, при кімнатній температурі швидко втрачають рухливість, то можна користуватися столиком з підігрівом (температура 38—39 °С). Для більш детального визначення будови інфузорій препарат краще піддати забарвленню розчином Люголя або приготувати мазок і розглядати його при великому збільшенні або під імерсією.

Реактив: 0,85 %-ний розчин NaCl, злегка забарвлений метиленовим синім. Обладнання: мікроскоп; лічильна камера з сіткою Горяєва; лейкоцитарний меланжер.

Хід визначення. У пробірку відбирають 5 мл профільтрованого вмісту рубця (рідку частину) і додають 0,1 мл 4%-ного розчину формаліну для фіксації інфузорій. Це дозволяє підрахувати кількість інфузорій протягом 20—24 годин після взяття вмісту рубця. Вміст пробірки ретельно перемішують, набирають рідину в лейкоцитарний змішувач (меланжер) до позначки 1, а до позначки 11 — ізотонічний розчин натрію хлориду, попередньо забарвлений розчином метиленового синього. Струшують 1—2 хв і отримують розведення проби в 10 разів.

У камеру з сіткою Горяєва під покривне скло вносять 1 краплю рідини (першу краплю видують на вату). Інфузорій підраховують у 100 великих квадратах. Загальну кількість інфузорій у 1 мм³(1 мкл) визначають за формулою

$$x = AC/nSh, \text{ тобто } x = A \cdot 25,$$

де x — кількість інфузорій в 1 мм³(1 мкл); A — кількість підрахованих інфузорій; C

— розведення проби; i — кількість квадратів, в яких підраховували інфузорії (100); S — площа одного квадрата (1/25); h — висота камери (0,1).

Кількість інфузорій в 1 мл вмісту рубця визначають за формулою $x = A \cdot 1000$, оскільки 1 мл = 1000 мкл.

У 1 мл рідини рубця міститься від 500 тис. до 1,2 млн інфузорій. Їхня кількість зменшується при різних патологіях. Особливо мало інфузорій (70—100 тис./мл) при зміщенні сичуга (А. В. Чуб, 2002).

Підрахунок бактерій. Бактерії відіграють важливу роль у процесах травлення жуйних тварин. Вони піддають ферментативному розщепленню целюлозу (основний компонент грубих кормів), крохмаль, моносахариди,

кислоти (молочну, бурштинову, мурашину), ліпіди, беруть участь у перетворенні азотистих сполук. Поряд з основними видами існує ряд бактерій, які не мають функціонального значення в рубцевому травленні, а потрапляють у рубець з кормом і водою.

Чисто рубцеві бактерії повинні відповідати певним вимогам: 1) виділені з рубця мікроорганізми повинні бути анаеробними; 2) бактерії повинні бути присутніми в рубці в кількості не менше ніж 1 млн в 1 мл вмісту; 3) по 10 штамів даного виду бактерій має бути виділено не менше ніж від двох тварин; 4) культури даного виду бактерій повинні бути присутніми в рубці тварин різних географічних зон; 5) кінцеві продукти обміну речовин отриманих культур мікроорганізмів повинні бути типовими рубцевими метаболітами. У 1 мл рубцевого вмісту присутні 10^9 — 10^{10} бактерій. Реактив: 0,85%-ний розчин NaCl. Обладнання: мікроскоп; мікропіпетки.

Хід визначення. Вміст рубця розводять стерильним ізотонічним розчином натрію хлориду у співвідношенні 1:1000. За допомогою мікропіпетки відбирають 0,01 мл отриманого розчину і профламованою бактеріологічною петлею рівномірно розподіляють його на предметному склі на площі 1 см². Як правило, готують 3–4 мазки. Мазки висушують над полум'ям спиртової лампи, після чого забарвлюють за Грамом. Готові препарати досліджують під імерсійною системою мікроскопа. Проводять підрахунок бактерій у визначеній кількості типових полів зору. З огляду на можливу нерівномірність розподілу матеріалу на склі, поля зору для підрахунку обирають по всій площі мазка, переважно по діагоналі.

У кожному мазку аналізують не менше 10 полів зору, після чого визначають середнє значення кількості бактерій для одного поля зору.

Щоб визначити загальну кількість бактерій у всьому мазку, уточнюють площу поля зору мікроскопа. Оскільки площа кола становить 100 мм², то необхідно виміряти діаметр поля (в мм) за допомогою об'єктивного мікрометра. Площа мазка 100 мм², поділена на площу поля зору під мікроскопом, дорівнює кількості полів зору в мазку. Оскільки мазок приготований з 0,01 мл рідини, то кількість полів зору в мазку, помножена на 100, дає кількість полів зору в 1 мл рубцевої рідини, розведеної до 10³ (1:1000). Усі ці арифметичні підрахунки можна об'єднати формулою $10\,000 : 3,1417 \cdot z^2$, де 3,1417 — коефіцієнт, на який слід помножити середню кількість клітин у полі зору мікроскопа.

Таким чином, підрахувавши необхідну кількість полів зору (по 10 у трьох мазках), підсумовують загальну кількість бактерій і обчислюють середню кількість бактерій в одному полі зору. Отримане число множать на коефіцієнт і ступінь розведення. Коефіцієнт залишається постійним доти, доки об'єктив, положення тубуса та окуляр мікроскопа не змінюються.

ДЕЯКІ ОСОБЛИВОСТІ ДОСЛІДЖЕННЯ ВМІСТУ РУБЦЯ

Досліджуючи вміст рубця, необхідно враховувати склад раціону, час взяття проби після годування та техніку зондування.

При годуванні грубоволокнистими кормами склад вмісту рубця відносно постійний протягом 1 години після годування. Введення в раціон

багатих на крохмаль комбікормів змінює ферментативні процеси в рубці. У ньому відбувається інтенсивне утворення ЛЖК за рахунок пропіонової та масляної кислот, з'являється молочна кислота. Аналогічні зміни відбуваються при згодовуванні тваринам надмірної кількості легкозасвоюваних вуглеводів (цукровий і напівцукровий буряк, патока), але в такому випадку відбувається утворення молочної кислоти. Змінюється якісний і кількісний склад мікроорганізмів: зменшується кількість грамнегативних бактерій, збільшується кількість грампозитивних.

При аналізі результатів досліджень вмісту рубця слід враховувати час останнього годування, оскільки в перші 2—3 години після прийому корму в передшлунках відбувається активний гідроліз, що викликає зростання кількості ЛЖК, аміаку, хлору, калію, відповідно величина водневого показника (рН) та іонів натрію знижується. Пізніше, внаслідок поступового загасання ферментативних процесів у рубці та активного засвоєння продуктів гідролізу, відбувається зниження концентрації ЛЖК (особливо пропіонової), аміаку, хлору, калію та підвищення рН і вмісту натрію. Тому при дослідженні вмісту рубця проби слід відбирати в один і той самий час після годування. Внаслідок зондування тварин для отримання проб вмісту рубця подразнюються ротова порожнина, глотка, кардіальний сфінктер, що викликає посилене слиновиділення. Відомо, що слина має лужну реакцію (рН 8,7—9,2), тому її домішка у вмісті рубця може стати причиною зміни рН та інших показників проб. Зміна рН у пробі з домішкою слини особливо показова при ацидотичному стані рубця. З огляду на те, що максимальна кількість слини надходить у пробу вмісту на початку зондування, перші її порції (200 мл) для аналізів використовувати не слід.

РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

Базова

1. Баняс Ю. Ю. Жувальна активність корів і кислотність вмісту рубця // Науковий вісник НУБіП України. — 2018. — Вип. 289. — С. 132–137.
2. Солдатенко Л. О. Мікрофлора рубця великої рогатої худоби та її функціональна роль // Ветеринарна біотехнологія. — 2021. — № 38. — С. 45–52.
3. Чуб О. В. Вторинна дистонія рубця у високопродуктивних корів: патогенез і лікування : дис. ... канд. вет. наук. — Київ, 2002. — 156 с.
4. Голубець О. В. Ізомерний склад жирних кислот вмісту рубця корів за різного раціону : дис. ... канд. с.-г. наук. — Київ, 2010. — 180 с.
5. Солодка Л. О. Мікробіом рубця великої рогатої худоби: сучасні підходи до дослідження // Аграрна наука України. — 2023. — № 2. — С. 55–61.
6. Ørskov E. R., Ryle M. Energy Nutrition in Ruminants. — Oxford: Elsevier, 2019. — 184 p.
7. Dijkstra J., France J. Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism. — Cambridge: CABI Publishing, 2020. — 512 p.
8. Nagaraja T. G., Titgemeyer E. C. Ruminal acidosis in beef cattle: The current microbiological and nutritional outlook // Journal of Dairy Science. — 2007. — Vol. 90(1). — P. 17–38.
9. Hook S. E., Wright A. D. G., McBride B. W. Methanogens: methane producers of the rumen and mitigation strategies // Microbial Ecology. — 2010. — Vol. 60. — P. 526–532.
10. Jami E., Mizrahi I. Composition and similarity of bovine rumen microbiota across individual animals // PLoS ONE. — 2012. — Vol. 7(3). — e33306.

Допоміжна

1. Ковальчук І. І. Фізіологія травлення жуйних тварин. — Київ: Урожай, 2017. — 312 с.
2. Левченко В. І. Ветеринарна клінічна біохімія. — Біла Церква, 2018. — 420 с.
3. Петров С. М. Мікробіологія рубця жуйних тварин. — Харків: Зоовет, 2016. — 256 с.
4. Шевчук О. П. Годівля великої рогатої худоби. — Київ: Аграрна освіта, 2020. — 380 с.
5. Іваненко М. В. Методи лабораторного дослідження вмісту рубця. — Львів: ЛНУВМБТ, 2019. — 198 с.
6. Church D. C. The Ruminant Animal: Digestive Physiology and Nutrition. — Waveland Press, 2017.
7. Van Soest P. J. Nutritional Ecology of the Ruminant. — Cornell University Press, 2018.
8. McDonald P. et al. Animal Nutrition. — Pearson, 2019.
9. Russell J. B. The Rumen Microbial Ecosystem. — Springer, 2016.
10. Hobson P. N., Stewart C. S. The Rumen Microbial Ecosystem (2nd ed.). — Blackie Academic & Professional, 2017.

Навчальне видання

**Методичні рекомендації
для самостійної роботи
здобувачів вищої освіти
факультету ветеринарної
з курсу «Внутрішні хвороби тварин»**

**Формат 60x84/16. Гарнітура Times New Roman
Папір для цифрового друку. Друк ризографічний.**

Ум. друк. арк. _.

Наклад

ОДАУ

65000, м.Одеса, вул. Пантелеймонівська, 13