

А.А. ГЕЙСУН, Л.М. СТЕПЧЕНКО

ОБЩАЯ АКТИВНОСТЬ ГИДРОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ КРАСНОГО КАЛИФОРНИЙСКОГО ЧЕРВЯ ПОД ДЕЙСТВИЕМ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОЙ ДОБАВКИ «ГУМИЛИД»

Днепропетровский государственный аграрно-экономический
университет

Установлено, что количество Гумилада от 14,0 до 20,0 мг/кг в составе питательного субстрата привело к увеличению общей активности гидролитических ферментов красного калифорнийского червя. В условиях вермифермы на фоне применения Гумилада в количестве 15 мг/кг протеолитическая активность к концу исследования возросла на 34,6 % ($p < 0,01$), целлюлозолитическая – на 50,0 % ($p < 0,01$) по отношению к контролю. Амилолитическая активность биомассы червей на 135-й день эксперимента возросла на 8,8 % ($p < 0,001$) относительно контроля и снизилась к концу исследования.

Ключевые слова: вермикультура, Гумилид, гидролитические ферменты, протеолитическая активность, амилолитическая активность, целлюлозолитическая активность.

A.A. GEYSUN, L.M. STEPCHENKO

GENERAL ACTIVITY OF HYDROLYTIC ENZYMES OF CALIFORNIA RED WORMS UNDER EFFECT OF ACTIVE SUPPLEMENT «HUMILID»

Dnipropetrovsk state agrarian and economic university

It was determined that the amount of Humilid ranged 14.0 to 20.0 mg/kg in composition of nutrient substrate increased the overall activity of hydrolytic enzymes of red California worm. In vermifarm conditions during applications of Humilid in amount of 15 mg/kg, proteolytic activity has increased by 34.6 % ($p < 0.01$) by the end of the study, cellulolytic – by 50.0 % ($p < 0.01$) compared to control. The amylolytic activity of worms biomass on the 135th day of the experiment has increased by 8.8 % ($p < 0.001$) compared to the control, and has decreased by the end of the experiment.

Keywords: vermiculture, Humilid, hydrolytic enzymes, proteolytic activity, amylolytic activity, cellulolytic activity.

Введение. Расщепление биополимеров в кишечнике красного калифорнийского червя имеет особое биологическое значение, так как черви потребляют органические субстраты [1]. Чаще всего субстратами для вермикультивирования служат органические отходы, такие как навоз, опавшие листья, осадок сточных вод, имеющий в своём составе большую часть клетчатки, углеводов и белковых компонентов. В основе переработки таких субстратов лежат процессы расщепления их с помощью ферментативных реакций. Известно, что дождевые черви имеют достаточно большой набор пищеварительных ферментов, в том числе собственную целлюлазу [2]. Скорость расщепления органиче-

ских остатков субстрата при вермикультивировании зависит от соотношения различных пищеварительных ферментов в кишечнике червей и их ферментативной активности. В связи с этим, перспективным может быть поиск новых способов повышения ферментативной активности в кишечнике вермикультуры.

Ранее установлено, что при включении кормовой добавки «Гумилид» (согласно ТУ У 15.7-00493675-004:2009) в основной рацион у молодняка кур-несушек протеиназная, амилалитическая и липолитическая активность ферментов слизистой оболочки 12-перстной кишки [3], а у страусят – активность целлюлозолитических ферментов в слепых отростках [4] увеличилась. Исследования же по влиянию биологически активной добавки «Гумилид» на общую ферментативную активность пищеварительных ферментов в биомассе вермикультуры ранее не проводились.

Целью работы было исследование влияния биологически активной добавки «Гумилид» на общую протеолитическую, амилалитическую и целлюлозолитическую активность биомассы красного калифорнийского червя в модельном и производственном экспериментах.

Материал и методика исследований. Изучение общей ферментативной активности биомассы вермикультуры проводились в условиях лаборатории гуминовых веществ им. проф. Л.А. Христовой ДГАЭУ и лаборатории кафедры биотехнологии и безопасности жизнедеятельности ГВУЗ «УГХТУ». Объектом исследования была вермикультура – красного калифорнийского червя, которого заселяли в воздухопроницаемые ёмкости с субстратом, объём которых составлял 2,0 л. Вермикультивирование проводили при температуре + 20 ... + 25 °С и влажности субстрата 65-75 %. Питательным субстратом служила измельченная и ферментированная подсолнечная лузга [5]. Были сформированы одна контрольная (К) и четыре (I, II, III, IV) опытных группы по 10 половозрелых особей в каждой. Повторность опыта – трёхкратная.

В субстраты для опытных вариантов I, II, III, IV вносили растворы гуминовой добавки «Гумилид» 1 раз в день в течение 5 дней в следующих количествах: 10,0; 14,0; 20,0; 24,0 мг/кг сухого субстрата соответственно. Контрольная группа красного калифорнийского червя биологически активной добавки не получала, а в среду добавляли дистиллированную воду. Концентрации Гумилида рассчитывали по действующему веществу в суммарном количестве гуминовых и фульвовых кислот в пересчёте на один килограмм сухого субстрата. Отбор вермикультуры проводили на следующий день после последнего внесения добавки.

Производственные исследования проводили в условиях вермифермы ООО «Природные биотехнологии» г. Запорожья, которая является

производителем биогумуса, жидкого гуминового препарата и биомассы вермикультуры. Объектом исследования был гибрид красного калифорнийского червя. Питательным субстратом служила смесь из ферментированного навоза крупного рогатого скота и ферментированной подсолнечной лузги (отход грибного производства) в соотношении 9:1. Для заселения вермикультурой в количестве 5-7 тыс. в среднем на 1 м² формировали бурты размером 5x0,5x0,15 м. Свежий субстрат слоем 7-10 см распределяли по всей поверхности бурта 1 раз в 7-10 дней и увлажняли водой. В помещении поддерживали температуру в диапазоне 21-24 °С и влажность субстрата в диапазоне 65-78 %, что соответствует технологическим условиям культивирования. Выделяли контрольные и опытные бурты, которые отличались тем, что в опытные варианты вносили биологически активную добавку «Гумилид» в количестве 15 мг/кг в виде раствора 1 раз в месяц, а в контрольные – такой же объём воды. Вермикультивирование продолжалось в течение 6 месяцев. Отбор вермикультуры из контрольных и опытных буртов проводили на 135-й и 180-й дни исследования. Из этих образцов готовили среднюю пробу биомассы вермикультуры. Особей червей быстро промывали дистиллированной водой и лишнюю влагу удаляли фильтровальной бумагой. Из червей с полным кишечником получали гомогенат, в котором определяли общую ферментативную активность. Протеолитическую активность определяли по методу Вильштеттера и Вальдшмидт-Лейтца в модификации, активность α -амилазы определяли по методу Каравая, целлюлолитическую – с использованием натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы [6].

Статистические расчёты выполнены с помощью редактора Microsoft Excel.

Результаты эксперимента и их обсуждение. Одним из показателей скорости переработки питательного субстрата вермикультурой является активность гидролитических ферментов в кишечнике особей червей, которые обеспечивают расщепление компонентов субстрата, в первую очередь белков, крахмала и клетчатки.

Общая ферментативная активность биомассы красного калифорнийского червя под действием Гумилида в разных количествах (модельные исследования) приведена в таблице 1.

Результаты лабораторных исследований показали, что общая протеолитическая активность биомассы красного калифорнийского червя при добавлении Гумилида 10,0 мг/кг к питательному субстрату (I группа) выросла на 17,7 % с достоверностью ($p < 0,05$) относительно контрольной группы. В то же время во II группе (14,0 мг/кг) активность протеолитических ферментов была выше контроля на 26,3 ($p < 0,001$) и на 7,3 % по отношению к I группе. При внесении гумино-

вой добавки к питательному субстрату в количестве 20,0 мг/кг (III группа) наблюдался рост общей протеолитической активности биомассы червей на 51,0 % ($p < 0,001$) относительно контроля и на 28,2 и 19,5 % по сравнению с I и II группами. Добавление Гумилида к питательному субстрату в количестве 24,0 мг/кг (IV группа) привело к повышению активности протеолитических ферментов на 85,3 % ($p < 0,001$) относительно контроля. Ферментативная активность в биомассе вермикюльтуры в IV группе была выше на 57,3 %, 46,7 и 22,8 % соответственно по сравнению с I, II и III группами. Таким образом, общая протеолитическая активность биомассы вермикюльтуры всех опытных групп повышалась на фоне биологически активной добавки и была самой высокой при введении Гумилида в количестве 24,0 мг/кг.

Таблица 1 – Общая активность гидролитических ферментов биомассы вермикюльтуры под действием Гумилида (M+ m, n =)

Модельные исследования	Общая ферментативная активность биомассы вермикюльтуры				
	Группы				
	К	К	К	К	К
	Количество Гумилида, мг/кг				
	К	К	К	К	К
Протеолитическая активность, ед./г	9,23 ±0,337	10,87± 0,545*	11,66± 0,427***	13,93± 0,448***	17,10± 0,434***
Амилолитическая активность, г/(ч*г биомассы)	21,84 ±0,035	22,65± 0,053***	22,18± 0,042***	22,01± 0,035**	21,90 ±0,017
Целлюлозолитическая активность КМЦЛА, МЕ/г	0,04± 0,001	0,05± 0,002**	0,06± 0,001***	0,06± 0,001***	0,005± 0,001***

Примечание: Здесь и далее - опытные по отношению к контролю: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Внесение биологически активной добавки «Гумилид» к питательному субстрату в количестве 10 мг/кг (I группа) привело к повышению общей амилолитической активности биомассы вермикюльтуры на 3,7 % ($p < 0,001$) относительно контроля. Во II группе при количестве добавки 14,0 мг/кг наблюдается увеличение общей активности амилазы в биомассе червей на 1,6 % ($p < 0,001$) относительно контрольной группы и снижение на 2,1 % по отношению к I группе. При внесении Гумилида к питательному субстрату в количестве 20,0 мг/кг (III группа) приводит к росту общей активности амилазы биомассы вермикюльтуры на 0,8 % с достоверностью ($p < 0,01$) относительно контрольной группы и её снижение на 2,8 и 0,8 % по сравнению с I и II группой со-

ответственно. В IV группе в биомассе червей наблюдался незначительный рост общей активности амилазы на 0,3 % относительно контроля. Ферментативная активность биомассы вермикультуры IV группы была ниже на 3,3 %, 1,2 и 0,5 % соответственно по отношению к I, II, и III группам. Итак, введение Гумилада в количестве 10,0 мг/кг в состав питательного субстрата привело к наибольшему росту общей активности амилазы биомассы вермикультуры.

Что касается общей активности целлюлазы, то в биомассе вермикультуры I группы она выросла на 25,0 % ($p < 0,01$) относительно контроля. При добавлении Гумилада к питательному субстрату в количестве 14,0 мг/кг в биомассе червей ферментативная активность достоверно увеличилась на 50,0 % ($p < 0,001$) и 20,0 % по сравнению с контролем и I группой соответственно. На фоне применения гуминовой добавки в III группе в биомассе вермикультуры общая активность целлюлазы была выше на 50,0 % ($p < 0,001$) по сравнению с контрольной группой. В этой группе (III группа) общая целлюлозолитическая активность была выше на 20,0 % относительно I и не изменилась по сравнению со II группами. В биомассе вермикультуры IV группы наблюдалось повышение общей активности целлюлазы на 25,0 % ($p < 0,001$) по сравнению с контролем. По сравнению с I группой достоверных изменений не наблюдалось. Общая активность целлюлазы в IV группе была ниже на 16,7 % по отношению к II и III группам. Итак, Гумилад в составе питательного субстрата способствует повышению общей активности целлюлазы биомассы вермикультуры во всех опытных группах и является самой высокой при количестве введения Гумилада от 14,0 до 20,0 мг/кг.

По результатам исследования установлено, что оптимальным диапазоном количества Гумилада, который влияет на рост активности ферментов, являются: для протеолитических ферментов – 14,0-24,0 мг/кг; амилазолизитических – 10,0-20,0 мг/кг; целлюлозолитических – 14,0-20,0 мг/кг. Таким образом, оптимальный диапазон количества Гумилада в составе питательного субстрата, что приводит к увеличению активности этих гидролитических ферментов, составляет от 14,0 до 20,0 мг / кг сухого субстрата. Кроме того, именно такое количество биологически активной добавки привело к активации обмена [7] веществ в организме красных калифорнийских червей и повышение их репродуктивной функции [8].

На основании установленного оптимального диапазона концентраций биологически активной добавки, которая влияет на рост общей активности гидролитических ферментов в биомассе вермикультуры, для дальнейших исследований в условиях фермы Гумилад вводили в субстрат в количестве 15 мг / кг.

В таблице 2 представлена общая ферментативная активность биомассы вермикультуры, полученная в условиях фермы.

Таблица 2 – Общая ферментативная активность биомассы вермикультуры, полученная в условиях фермы (производственном эксперименте)

Исследования в условиях вермифермы	Общая ферментативная активность биомассы вермикультуры		
	Время, дни	Группы	
		К	Д
		Количество Гумилада, мг/кг	
	К	Д	
Протеолитическая активность, ед./г	135	9,34±0,717	11,98±0,852*
	180	9,76±0,808	13,14±0,759**
Амилолитическая активность, г/(ч* г биомассы)	135	21,72±0,025	23,64±0,067***
	180	22,70±0,026	22,04±0,021***
Целлюлозолитическая активность КМЦЛА, МЕ/г	135	0,02±0,001	0,03±0,001**
	180	0,02±0,001	0,03±0,001**

Примечание: Здесь и далее - опытные по отношению к контролю: * p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

В биомассе вермикультуры на 135-й день эксперимента при внесении Гумилада в количестве 15 мг/кг к субстрату общая активность протеолитических ферментов биомассы червей увеличилась на 28,3 % (p<0,05) относительно контроля. На 180-й день исследования гуминовая добавка в составе питательного субстрата привела к росту общей протеолитической активности биомассы вермикультуры на 34,6 % (p<0,01) по сравнению с контролем. В биомассе червей активность протеазы выросла в контрольной группе на 4,5 и опытной – на 9,6 % по отношению к предыдущему периоду. Таким образом, общая активность протеолитических ферментов биомассы вермикультуры на протяжении всего периода исследования растёт на фоне применения Гумилада по сравнению с контрольным вариантом.

Вместе с тем, общая амилолитическая активность биомассы червей под действием Гумилада на 135-й день исследования возросла на 8,8 % (p<0,001) относительно контроля. К концу исследования (180-й день) в биомассе вермикультуры опытной группы наблюдалось снижение общей активности амилазы на 2,9 % (p<0,001) по сравнению с контролем. По отношению к предыдущему периоду в биомассе червей контрольной группы наблюдается увеличение активности амилазы на 4,5 %, а в опытной – снижается на 6,8 %. Мы считаем, что снижение активности амилазы в этот период связано с высокой общей амилолитической активностью на 135-й день и снижением количества субстра-

та соответственно к 180-му дню исследования.

Что касается общей целлюлозолитической активности, то на 135-й день эксперимента в опытной группе при применении Гумилица в биомассе вермикультуры активность целлюлазы выросла на 50,0 % ($p < 0,01$) относительно контроля. К концу исследования в биомассе червей опытной группы общая целлюлазная активность была выше на 50,0 % ($p < 0,01$) относительно контроля. По сравнению с предыдущим периодом активность целлюлазы не изменилась в биомассе вермикультуры контрольной и опытной групп. Таким образом, на фоне применения Гумилица общая активность целлюлозолитических ферментов биомассы вермикультуры увеличивается на протяжении всего периода исследования.

Заключение. Таким образом, внесение биологически активной добавки «Гумилиц» в питательный субстрат приводит к росту общей активности протеолитических ферментов в биомассе вермикультуры относительно контроля, с увеличением концентрации гуминовой добавки – к монотонному повышению активности протеазы.

Увеличение концентрации Гумилица приводит к росту общей активности целлюлазы и незначительно повышает активность амилолитических ферментов в биомассе вермикультуры.

В условиях фермы на фоне применения Гумилица в количестве 15 мг/кг наблюдался рост общей протеолитической активности биомассы вермикультуры в течение всего эксперимента и на конец исследования увеличивается на 34,6 % ($p < 0,01$) относительно контроля.

Внесение в субстрат биологически активной добавки в концентрации 15 мг/кг при вермикультивировании обеспечило значительное повышение (на 8,8 %, $p < 0,001$) общей амилолитической активности биомассы червей на 135-й день эксперимента. Это способствовало более быстрому расщеплению субстрата в опытной группе и, как следствие, снижению активности фермента на конец исследования.

В то же время, целлюлозолитическая активность увеличилась на 50,0 % ($p < 0,01$) и на конец исследования составила $0,03 \pm 0,001$ МЕ/г.

Таким образом, применение Гумилица в вермикультивировании приводит к повышению общей активности гидролитических ферментов вермикультуры, что позволяет особям червей лучше расщеплять и усваивать питательный органический субстрат и соответственно интенсифицировать процесс образования биогумуса.

Литература

1. Титов, И. Н. Дождевые черви. Руководство по вермикультуре : в 2 ч. Ч. 1. Компостные черви / И. Н. Титов. – Москва : ООО «МФК Точка опоры», 2012. – 284 с.
2. Стриганова, Б. Р. Питание почвенных сапрофагов / Б. Р. Стриганова. – Москва : Наука, 1980. – 245 с.
3. Островська, М. Ю., Активність гідролітичних ферментів та стан мікробіоценозу

кишечнику в організмі молодняка курей-несучок за дії «Гуміліду» / М. Ю. Островська, А. В. Гунчак, Л. М. Степченко // Біологія тварин . – 2013. – Т. 15, № 3. – С. 95-104

4. Коляда, С. Травна система страусенят під дією гуміліду / С. Коляда, Л. Степченко // Тваринництво України. – 2014. – № 12. – С. 30-33.

5. Мітіна, Н. Б. Дослідження технологій створення білкових добавок. 3. Біологічна доброякісність сировини для вермтехнологій / Н. Б. Мітіна, О. П. Кулик, С. Г. Кашаніков // Вопросы химии и химической технологии. – 2009. – № 5. – С. 32-34.

6. Препараты ферментные. Методы определения ферментативной активности целюлазы: ГОСТ Р 53046-2008; введ. 16.12.2008. – Москва : Стандартинформ, 2009. – 10 с.

7. Степченко, Л. М. Биологически активные вещества гуминовой природы как регуляторы гомеостаза организма сельскохозяйственной птицы / Л. М. Степченко // Фитогормоны, гуминовые вещества и другие биорациональные пестициды в сельском хозяйстве : сборник материалов конф. VII международной конференции Radostim 2014 (02-04 ноября 2011 г.). – Минск, 2011. – С. 164-166.

8. Гейсун, А. А. Дослідження росту та розвитку вермикюльтури за впливу Гуміліду / А. А. Гейсун, Л. М. Степченко // Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва. Науковий вісник НУБіП України. – 2016. – Вип. 236. – С. 316-325.

Поступила 3.03.2017 г.

УДК 619:615.3:612.017.11/.12:612.664.3

С.И. ГОЛОПУРА, Н.И. ЦВИЛИХОВСКИЙ

ВЛИЯНИЕ ФОСФОЛИПИДСОДЕРЖАЩИХ ПРЕПАРАТОВ НА УРОВЕНЬ ИММУНОГЛОБУЛИНА М В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ТЕЛЯТ В ПЕРИОД ФОРМИРОВАНИЯ КОЛОСТРАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА

Национальный университет биоресурсов и природопользования
Украины

Приведены результаты применения разработанного нами препарата «Мембраностабил» и фосфолипид-бислойных макрокапсул на основе соевого лецитина для коррекции показателей содержания иммуноглобулина М в крови новорождённых телят в период формирования колострального иммунитета. Установлено, что препарат «Мембраностабил» и фосфолипид-бислойные макрокапсулы на основе соевого лецитина активируют транспорт иммуноглобулинов в тонком кишечнике и способствуют достоверному увеличению содержания иммуноглобулина М у телят в сравнении с показателями контрольной группы. Увеличение содержания иммуноглобулина М в крови новорождённых телят профилактирует развитие расстройств пищеварения у этих животных.

Ключевые слова: колостральный иммунитет, молозиво, сыворотка крови, иммуноглобулин М, новорождённые телята.