

ANNA ANTONIEWICZ, PAWEŁ PISULEWSKI
Instytut Zootechniki w Krakowie

SYNTEZA BIAŁKA MIKROORGANIZMÓW W ŻWACZU I METODY JEJ WYZNACZANIA

Procesy trawienia u przeżuwaczy polegają na współdziałaniu dwóch systemów metabolicznych — populacji mikroorganizmów żwacza oraz enzymów trawiennych przewodu pokarmowego. Podstawowa rola mikroorganizmów żwacza to synteza swoistych białek z wykorzystaniem azotu paszy i endogennego azotu oraz hydrolityczny rozkład węglowodanów strukturalnych (celulozy, hemicelulozy) z pasz roślinnych, do trawienia których zwierzęta nie posiadają enzymów jelitowych.

Przemiany jakim ulega w żwaczu spożyta pasza zależą od całego szeregu czynników chemicznych, fizycznych i biologicznych. Czynniki te wpływają na rozwój mikroorganizmów, a tym samym na syntezę ich białka i rozmiary konwersji azotu dawki pokarmowej na białko mikroorganizmów żwacza i dlatego zasługują na krótkie omówienie. Typ i wielkość aktywności mikroorganizmów w żwaczu zależą od składu chemicznego i stanu fizycznego paszy oraz od warunków panujących w żwaczu (pH, stopień rozcieńczenia). Konkurujące ze sobą procesy o różnych szybkościach zachodzące w żwaczu (rozkład, synteza, absorpcja i wpływ) łącznie z ciągłym spożyciem paszy dają dynamiczny układ fermentacji ciągłej, w którym badania ilościowe są trudne do przeprowadzenia. Rozkład i wykorzystanie paszy zależy ściśle od czasu jaki pasza pozostaje w żwaczu i od aktywności mikroorganizmów. Środowisko żwaczowe oraz czas przebywania paszy w żwaczu warunkowane są przez takie czynniki jak typ i ilość spożytej paszy, wydajność dopływu śliny oraz szybkość przejścia treści ze żwacza do dalszych odcinków przewodu pokarmowego. Ogólnie stwierdzić można, że rozkład paszy pobranej i zatrzymanej w żwaczu zależy od czynników fizycznych związanych z mechanizmem trawienia, powierzchni paszy wystawionej na działanie mikroorganizmów, wielkości i rodzaju populacji mikroorganizmów, objętości żwacza i stopnia rozcieńczenia płynu żwaczowego oraz działania buforującego i objętości płynu wpływającego do żwacza.

Znaczny (w ilości do 2/3) rozkład składników pokarmowych w żwaczu powodowany przez mikroorganizmy jest związany z zapotrzebowaniem energetycznym mikroorganizmów dla przeprowadzonych syntez

i wzrostu numerycznego populacji. Beztlenowy charakter fermentacji zwaczowej wyznacza małą produkcję ATP na cząsteczkę odwodorowanego substratu. Tak więc mała dostępność wiązań wysokoenergetycznych uzasadnia z góry duży rozkład składników paszowych obserwowany w żwaczu. Teoretyczna wydajność syntezy bakterii wynosi 28 g suchej masy komórek na 1 mol ATP (29). Dużo niższe wartości w żwaczu i czystych kulturach świadczą o małej efektywności systemu przetwarzania energii w metabolizmie mikroorganizmów. Mała wydajność wynika prawdopodobnie z dających straty cykli syntezy i rozkładu tych samych związków oraz wzrostu i rozkładu mikroorganizmów w obrębie żwacza. Nolan i Leng (62) na podstawie badań kinetyki amoniaku z ^{15}N sugerują, że ok. 30% populacji bakterii w żwaczu jest rozkładane w miejscu powstania. Straty te mogą powodować zmniejszenie o 30% dostępnego ATP, co obniża wydajność molową wzrostu z 28 do 19 g. Podobnie Abe i Kandatsu (1) uważają, że do 40% bakterii wytworzonych w żwaczu jest „wykorzystywane” przez pierwotniaki.

Wydajność produkcyjna mikroorganizmów zależy od szybkości wzrostu, regulowanej u pojedynczych gatunków przez liczne czynniki (36). Według Hungate (43) ciężar komórek mikroorganizmów stanowi 10—15% przefermentowanych substratów i jest niższy od teoretycznego. Ograniczenie wzrostu może być wynikiem niedoboru przyswajalnych substancji dostarczających energię (głównie węglowodanów), dostępnych związków azotowych lub innych czynników wzrostowych. Zachodzi także hamowanie wzrostu — być może przez końcowe produkty metabolizmu lub czynniki autoregulacyjne, ponieważ szybkość wzrostu zwiększa się po rozcieńczeniu treści żwacza roztworem soli o odpowiednim składzie i sile jonowej (27). Z obserwacji Hobsona (35) wynika, że w czystych kulturach mikroorganizmów wydajność molowa wzrostu zwiększa się z 10 do 20 g, gdy rozcieńczenie wzrasta 3—5-krotnie.

Mikroorganizmy żwacza muszą otrzymać wszystkie niezbędne dla nich składniki pokarmowe z dawką, drogą sekrecji endogennej do żwacza lub w wyniku zależności symbiotycznych między gatunkami w obrębie populacji. Substratami dla syntez komórkowych mikroorganizmów są najczęściej proste związki jak amoniak i dwutlenek węgla. Liczne gatunki wymagają podaży kwasów tłuszczowych C_4 — C_6 o prostym i rozgałęzionym łańcuchu (18). Zapotrzebowanie na substancje mineralne zaspokajane jest drogą podaży z dawką i śliną, witaminy pochodzą z dawki i własnej syntezy mikroorganizmów.

Znaczny rozkład białek z dawki pokarmowej dostarcza związków azotowych — peptydów, aminokwasów oraz amoniaku, służących jako źródło azotu dla syntezy białek mikroorganizmów. Dla wielu gatunków amoniak jest podstawowym i preferowanym, a niekiedy nawet niezbędnym

źródłem azotu (20). Mikroorganizmy żwacza wykorzystując amoniak różnią się od większości heterotroficznych bakterii pod tym względem, że przeprowadzają syntezę aminokwasów z amoniaku nawet wtedy, gdy egzogenne aminokwasy są obecne w środowisku (91). *Bacteroides rumi-nicola* rosną w obecności amoniaku i peptydów jako głównych źródeł azotu (97), nie wykorzystują natomiast wolnych aminokwasów (69). Wynika to z faktu, że posiadają one mechanizmy aktywnego transportu oligopeptydów (66), natomiast nie są w stanie efektywnie wchłaniać wolnych aminokwasów. Wyjątek stanowią aminokwasy siarkowe, działające stymulująco na wzrost szczepów wykorzystujących amoniak, podobnie jednak działa siarka nieorganiczna (33). Peptydy wchłonięte do komórek mikroorganizmów ulegają bardzo szybko rozkładowi.

Proteazy żwaczowe są głównie związane w komórkach bakterii gram-ujemnych (13, 97) i są uwalniane do środowiska podczas rozpadu komórek. Proteazy są enzymami konstytucyjnymi i nie podlegają regulacji poprzez stężenie substratu i produktu, czyli skład dawki pokarmowej nie ma dużego wpływu na aktywność proteolityczną treści żwacza (5, 14).

Zawartość aminokwasów w płynie żwaczowym jest bardzo niska i wynosi $2,6-65 \times 10^{-5}$ M (3). Aminokwasy białka dawki są w żwaczu bardzo szybko rozkładane w kierunku produkcji amoniaku, dwutlenku węgla i lotnych kwasów tłuszczowych. Wzrost czystych kultur bakteryjnych jest proporcjonalny do stężenia amoniaku w ośrodku od $0,5$ do 4×10^{-5} M (19), a zawartość NH_3 w płynie żwaczowym przy normalnym żywieniu utrzymuje się przy górnym poziomie lub go przekracza. Dla głównego enzymu wiążącego amoniak, dehydrogenazy glutaminianu, substratem jest raczej jon amonowy niż NH_3 , co wynika z wartości pH płynu żwaczowego. Dehydrogenaza glutaminianu w zależności od gatunku bakterii współdziała z NAD lub NADP, a względne proporcje tych enzymów zależą od rodzaju dawki pokarmowej (23, 65). Zwiększenie w środowisku zawartości tych koenzymów zwiększa metaboliczne wykorzystanie produkowanego NH_3 .

Jakkolwiek jakość białka różnych czystych kultur jest zróżnicowana (11), a skład aminokwasowy i udział aminokwasów w azocie ogólnym zmieniają się w poszczególnych gatunkach pierwotniaków (38), to różnorodność populacji bakteryjnej w żwaczu powoduje, że białko mikroorganizmów opuszczających żwacz ma względnie stałą wartość. Duże zmiany dawki pokarmowej nie zmieniają w sposób istotny u owiec składu aminokwasowego (93) lub jakości białka (12) mikroorganizmów. Zawartość azotu w preparatach mieszanych bakterii żwaczowych wynosi ok. 10,5% suchej masy komórek (17, 43), czyli ok. 65% komórek mikroorganizmów stanowi białko surowe (72). Azot aminowy stanowi 75—85% azotu ogólnego mikroorganizmów (73).

W białku mikroorganizmów aminokwasy siarkowe są limitujące w stosunku do białka jaja i produkowane są w ilości niewystarczającej do pokrycia zapotrzebowania wzrostowego zwierzęcia oraz do produkcji wełny (51).

Wydajność procesów syntezy białka mikroorganizmów w zważu zależy w sposób zasadniczy od równowagi pomiędzy różnymi formami azotu oraz równoczesności degradacji węglowodanów i związków azotowych. Dlatego do dokładnego poznania procesów zważowych konieczna jest znajomość stężeń zarówno substratów jak i produktów reakcji chemicznych zachodzących w tym ciągłym systemie fermentacyjnym. Przemiany kataboliczne składników pokarmowych polegają głównie na dostarczającym energii rozkładzie węglowodanów do lotnych kwasów tłuszczowych oraz na reakcji

białko dawki → związki azotowe niebiałkowe (R1).

Reakcji tej towarzyszy proces syntezy:

związki azotowe niebiałkowe → białko mikroorganizmów (R2).

W praktyce żywieniowej jednym z głównych czynników określających dawkę pokarmową dla zwierząt jednożołądkowych jest zawartość i jakość białka. W przypadku zwierząt przeżuwających azot dawki ulega transformacji bakteryjnej i wartość białka jaką uzyskuje zwierzę może być wyznaczona tylko przy dokładnym określeniu wielkości syntezy białka mikroorganizmów. Do chwili obecnej opracowano cały szereg metod pośrednich do oznaczania udziału białka mikroorganizmów w treści pokarmowej przeżuwacza. Podstawowa trudność leży w odróżnieniu białka mikroorganizmów od nierozłożonego białka dawki, gdyż nie ma żadnej metody chemicznej, która umożliwiłaby takie rozróżnienie.

Metody bilansu fermentacyjnego

Metody bilansu fermentacyjnego opierają się na założeniu, że proces fermentacji mikrobiologicznej dostarcza energii i substratów do wzrostu komórek mikroorganizmów i jest z tym wzrostem ściśle związany (43).

Wykorzystanie równań stechiometrycznych i produkcji wodoru

Metoda opiera się na teoretycznym schemacie stechiometrycznej przemiany substratów do lotnych kwasów tłuszczowych, kwasu mlekowego, metanu i wodoru (64), czemu towarzyszy synteza komórek bakteryjnych. W tabeli przedstawiono współczynniki reakcji przy produkcji LKT, metanu i kwasu mlekowego kosztem fermentacji glukozy (87). Uwzględniając fakt, że zużycie i produkcja wodoru w reakcjach zważowych muszą być zbilansowane, wyliczyć można, dla danego przebiegu fermentacji,

Tabela

Na 1 mol	Mole glukozy przefermentowane	Mole wodoru		Mole ATP wytworzone
		wytworzone	zużyte	
Octanu (A)	1/2	2	—	2
Propionianu (P)	1/2	1	2	2
Maślanu (B)	1	4	2	2
Walerianianu (V)	1	3	4	2
Mleczanu (L)	1/2	—	—	1
Metanu (M)	1 mola CO ₂	—	4	1

odzysk wodoru metabolicznego H_{2m} z reakcji: H_2 wytworzony = $2A + P + 4B + 3V = 2P + 2B + 4V + H_{2m} = H_2$ zużyty. Wodór metaboliczny może być zużyty do syntezy suchej masy komórek wg reakcji:

$C_6H_{12}O_6 + 1,93 (2H) \rightarrow C_6H_{9,85}O_{2,99} + 3,01 H_2O$ przy czym $C_6H_{9,85}O_{2,99}N_{1,2}$ jt. średni skład elementarny preparatu mikroorganizmów, które zawierają w suchej masie 10,72% N, 46,16% C, 6,32% H i 30,66% O (26).

Zakładając pełne zużycie wodoru metabolicznego do syntezy komórek z reakcji wynika, że 60 g suchej masy (s.m.) komórkowej powstaje przy fermentacji 1 mola glukozy, 30 g produkcji 1 mola LKT lub 15 g na 1 mol wytworzonego ATP. Ilość s.m. komórek uzyskana z tych obliczeń zależy istotnie od dokładności oznaczeń metanu i wodoru a także prawidłowego wyznaczenia składu mikroorganizmów. Wg Hungate (44) komórki bakterii zważowych zawierają więcej wodoru niż substraty, które rozkładają, i skład ich jest następujący: $C_6H_{13,6}O_{1,7}N_{1,0}$. Przy fermentacji określonego typu im mniej wodoru jest zużyte do syntezy komórek tym większa może być produkcja metanu i na odwrót.

Wykorzystanie produkcji ATP

Druga możliwość zastosowania bilansu fermentacji do oceny syntezy bakteryjnej w zważcu to ustalenie całkowitej produkcji LKT przy trawieniu określonych substratów i wyliczenie na tej podstawie ATP dostępnego dla syntezy, co determinuje ilość s.m. bakteryjnej jaka może być zsyntetyzowana. Bauchop i Elsdén (8) wykazali, że ok. 10,5 g (10—12 g) s.m. komórek przyrasta na 1 mol ATP dostępnego, w zależności od rodzaju substratu fermentacji. Dalsze badania (29, 37) wykazały jednak, że molowa wydajność wzrostu Y_{ATP} (ilość g s.m. komórek na 1 mol ATP dostępnego) nie zawsze jest stała, lecz przy fermentacji ciągłej treści zważca zmienia się u różnych organizmów w zależności od rodzaju substratu i szlaku fermentacji. Obserwowane wartości Y_{ATP} wynoszą 10—20 g/1 mol ATP (35, 90). Baldwin i in. (6) sugerują wartość 15 g s.m.

Hogan i Weston (37) stwierdzili, że fermentacja 100 g substancji organicznej słomy trawionej alkaliami związana była z syntezą 2,5—3,7 g N w komórkach bakteryjnych, co daje teoretycznie Y_{ATP} 10—14 g. Pomimo tych zmiennych wartości Hogan i Weston (37) wyrażają pogląd, że dla danego typu dawki pokarmowej Y_{ATP} jest względnie stałe.

Baldwin i in. (6) wyliczyli współczynniki, które w oparciu o produkcję LKT pozwalają określić dostarczanie i zużycie ATP w reakcjach syntezy i rozkładu zachodzących w żwaczu, dla 3 typów bakterii żwaczowych: a) celulolitycznych, podobnych do *Ruminococci flavefaciens* i *allus*, b) amyloolitycznych, c) o szerokim zakresie substratów i słabej aktywności celulolitycznej (np. *Bacteriodes ruminicola* i kilka gatunków *Butyrivibrio*).

Z danych dla różnych dawek pokarmowych wynika, że w zależności od typu fermentacji przy produkcji 1 mola LKT dla mikroorganizmów żwacza dostępne jest 2,2—2,8 moli ATP. Wartości wyliczone przez innych autorów wahają się w granicach (89) do 2,6 moli LKT/1 mol ATP (52).

Na wydajność syntezy ATP przy fermentacji mają wpływ wzajemne proporcje LKT i produkcja metanu (87) oraz zapotrzebowanie pokarmowe mikroorganizmów (6). Efektywne wykorzystanie ATP do syntezy komórek bakteryjnych zależy m.in. od podaży substratów nieenergetycznych [azot, czynniki wzrostowe (41)] oraz od parametrów środowiska inkubacyjnego (70).

Poprawność metod opartych na bilansie fermentacji składników węglowodanowych dawki do LKT i metanu zależy od prawidłowo przyjętych współczynników wiążących produkcję H_2 , LKT i ATP z tworzeniem komórek bakteryjnych.

Metody znaczników izotopowych

Metoda oparta o wbudowywanie ^{35}S do białka mikroorganizmów

Block, Stakel i Loosli (17) wykazali, że $^{35}SO_4^{2-}$ dodany do żwacza jest wbudowany do cysteiny i metioniny w białku mikroorganizmów, syntetyzowany w żwaczu. Fakt ten wykorzystali Hendrickx i in. (32) do odróżnienia białka mikroorganizmów od nierozłożonego białka paszy w treści żwacza *in vitro*. Oparli się przy tym na założeniu, że skład aminokwasowy bakterii żwaczowych jest względnie stały, niezależnie od dawki pokarmowej (73, 93). Przy produkcji określonych ilości białka syntetyzowane są te same ilości metioniny i cysteiny (odpowiednio 3 i 2

g S/100 g białka), czyli na każdą jednostkę zsyntetyzowanego N-białkowego wbudowywana jest taka sama ilość S (stosunek molowy N/S = = 1/0,02). Stosując ^{35}S o znanej aktywności właściwej uzyskuje się stałość stosunku N/ ^{35}S w białku mikroorganizmów. Wielkość tego stosunku wyznaczyć można w układach, w których zachodzi tylko reakcja (R2).

Stosując tę metodę Henderickx i Martin (33) badali *in vitro*:

a) wykorzystanie do syntezy białka mikroorganizmów azotu z różnych związków drobnocząsteczkowych w obecności różnych źródeł energii,

b) czynniki wpływające na rozkład i dalsze wykorzystanie białek. Metoda opracowana przez Henderickxa i in. (32) do badań *in vitro* nie może być zastosowana wprost do badań *in vivo* z następujących powodów (34):

a) niemożliwe jest ustalenie standardowego stosunku $^{35}\text{S}/1$ g N-białkowego zsyntetyzowanego w płynie żwaczowym;

b) trudne jest przejście z pomiarów względnych do absolutnego wyznaczenia ilości zsyntetyzowanego białka. Aktywność właściwa izotopu w treści żwacza ulega zmianie wskutek różnej zawartości SO_4^{2-} , lub związków metabolizowanych do SO_4^{2-} , w paszy (58) czy podaży siarki ze śliną lub drogą sekrecji endogennej. Równocześnie wbudowanie SO_4^{2-} do aminokwasów siarkowych jest reakcją wielostopniową, której każdy etap przebiega z inną szybkością. Co więcej, nie cały SO_4^{2-} ubywający ze żwacza wbudowywany jest do mikroorganizmów. Duża jego część jest zredukowana do S^{2-} i w tej formie zanika ze żwacza;

c) adaptacja mikroorganizmów do różnych źródeł siarki oraz wpływ siarczku, metioniny i cysteiny na wbudowanie S do białek (30) komplikuje ilościową interpretację metody.

Harmeyer i in. (31) wykazali, że stosowanie ^{35}S *in vitro* także obarczone jest znacznym błędem. Jeżeli założenia Henderickxa i wsp. (32) o stałości stosunku S/N i $^{35}\text{S}/\text{N}$ w mikroorganizmach są słuszne, wtedy należy spodziewać się, że:

a) nie zachodzi włączanie ^{35}S do białka mikroorganizmów już znajdujących się w treści żwacza,

b) w płynie inkubacyjnym nie następuje znaczny rozpad białka mikroorganizmów.

Chcąc to wyjaśnić Harmeyer i in. (31) starali się ustalić, czy wbudowywanie ^{35}S jest:

a) liniową funkcją ilości nowo zsyntetyzowanego białka mikroorganizmów ($^{35}\text{S}_{\text{wbud}} = F(\Delta N)$ białka mikroorganizmów), b) funkcją szybkości wzrostu mikroorganizmów, oraz c) czy zachodzi wbudowywanie ^{35}S , gdy wzrost mikroorganizmów jest zerowy.

Autorzy ci badali włączanie ^{35}S do wytrącalnej kwasem trójchloro-

octowym (TCA) frakcji mikroorganizmów zwłaszcza przy różnych szybkościach wzrostu. Stosowali płyn żwaczowy owiec żywionych dawką z moczynikiem jako jedynym źródłem azotu. Dlatego cały azot wytrącalny TCA uznano za azot mikroorganizmów. Okres inkubacji *in vitro* wynosił 6 godz. Autorzy wykazali, że wzrost mikroorganizmów zależy od dodanego substratu. Ilość siarki wbudowana podczas okresu inkubacji nie jest liniowo skorelowana z ilością nowo zsyntetyzowanego białka, gdy zmienia się szybkość wzrostu. Zależność pomiędzy włączaniem ^{35}S i tempem wzrostu opisuje złożona funkcja. Ponadto stwierdzono, że zachodzi znaczne wbudowywanie ^{35}S gdy wzrost mikroorganizmów netto wynosi 0.

Wyniki Harmeyera i in. (31) wprowadzają trudności interpunkcji związku pomiędzy syntezę białka mikroorganizmów a wbudowywaniem ^{35}S . Wydaje się jednak, że wyniki te częściowo zależą od stosunkowo długiego czasu inkubacji. Krótki cykl życiowy bakterii może być powodem lizy komórek i zużycia ich składników jako substraty przez inne mikroorganizmy. Potwierdza to fakt wbudowywania ^{35}S przy niedoborze substratów i zerowym wzroście netto, w warunkach gdy synteza komórek jest równa ich rozkładowi. Zbyt długi czas inkubacji powoduje znaczne zmniejszenie stężeń substratów i zwolnienie tempa wzrostu komórek.

Nikolić i in. (61) zastosowali ^{35}S *in vitro* do badania wpływu poziomu NH_3 w treści żwacza na syntezę białka mikroorganizmów. Stwierdzili oni liniową zależność wbudowywania ^{35}S od czasu inkubacji (do 4 godz.) oraz stałą aktywność właściwą puli siarczku w płynie inkubacyjnym. Stosunek N/S we frakcji mikroorganizmów (nierozpuszczalnej w TCA) wynosił 20,1, zgodny z wartością teoretyczną podaną przez Henderickxa i in. (34).

Wydaje się, że założenia Harmeyera i in. (31) powinny być przebadane w układach inkubowanych krócej, stosując preparaty ^{35}S o wyższej aktywności właściwej. Zależność pomiędzy wbudowywaniem ^{35}S a tempem wzrostu można by ograniczyć do szybkości początkowej, gdy zapotrzebowanie w substraty i aktywność mikroorganizmów są wystarczające do zapewnienia maksymalnego wzrostu.

Hume (42) oraz Beever i in. (9) zastosowali dożwaczowe infuzje $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ do określenia *in vivo* proporcji białka dawki oraz mikroorganizmów w treści dwunastnicy owiec. We frakcji mikroorganizmów z dwunastnicy (M) oraz w pełnej treści dwunastnicy (D) oznaczono aktywność właściwą siarki w metioninie. Stosunek M/D równy ok. 1 przy dawce zawierającej jedynie nieaminokwasowy azot niebiałkowy, a zwiększający się w miarę udziału białka dawki w treści dwunastnicy, podaje wzajemne proporcje białka mikroorganizmów oraz nierozłożonego białka pochodzenia paszowego. W metodzie tej należy rozpatrzyć trzy możliwe źródła błędów: a) endogenną sekrecję metioniny do treści pokarmowej,

b) wbudowywanie do mikroorganizmów aminokwasów siarkowych dawki bez ich rozkładu i syntezy na nowo włączającej ^{35}S , c) zanieczyszczenie frakcji mikroorganizmów białkiem roślinnym.

Stosunek M/D bliski 1 przy dawce bezbiałkowej (9, 42) świadczy o bardzo małej sekrecji lub o pełnym rozkładzie endogennej metioniny. Nolan i Leng (62) stwierdzili, że jedynie 80% azotu zsyntetyzowanych mikroorganizmów pochodzi z puli amoniaku w żwaczu. Pozostałe 20% stanowią aminokwasy dawki wbudowane wprost. Zakładając równomierłą syntezę wszystkich aminokwasów, o czym świadczy stały skład aminokwasowy preparatów mikroorganizmów, niezależnie od dawki pokarmowej (51, 73), ok. 1/5 ilości aminokwasów siarkowych w mikroorganizmach nie będzie wnosić znacznika izotopowego. Powoduje to zniżenie oznaczeń konwersji, podobnie jak zanieczyszczenie frakcji mikroorganizmów białkiem roślinnym.

Leibholz (51) zastosowała ciągłą dożwaczową infuzję $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ do oceny proporcji białka mikroorganizmów w treści dwunastnicy owiec poprzez wyznaczenie aktywności właściwej siarki w cysteinie (oznaczonej jako kwas cysteinowy) we frakcji mikroorganizmów oraz w cysteinie obecnej w treści dwunastnicy. Uwagi o możliwych błędach przy znakowaniu metioniny *in vivo* odnoszą się także do tej metody. Dwukrotnie wyższe zawartości metioniny niż cysteiny [1,7 i 0,8%, (51)] we frakcji mikroorganizmów sugerują, że wyniki oparte o oznaczenia metioniny mogą być obciążone mniejszym błędem względnym przy zbliżonym udziale białka mikroorganizmów w treści pokarmowej.

Metoda oparta o wbudowywanie izotopów fosforu do komórek mikroorganizmów

Van Nevel i in. (87) zastosowali ^{32}P *in vitro* jako wskaźnik syntezy mikrobiologicznej w reakcji (R2). Założenia metody oparli na wynikach Kepes i Cohen (49), że związki ufosforylowane, takie jak nukleotydy i in. nie penetrują do wnętrza komórek oraz że fosforan nieorganiczny nie opuszcza rosnących komórek.

Oznaczano wbudowywanie $^{32}\text{PO}_4^{3-}$ do frakcji mikroorganizmów podczas inkubacji *in vitro* glukozy i NH_4HCO_3 z przesączoną treścią żwacza owiec. Pozakomórkowa pula fosforanu była stała ($83,0 \pm 2,4$ mg/100 ml treści żwacza) i znacznie wyższa niż zawartość NH_3 — 25,2 mg/100 ml (4) i S^{2-} — 0,46 mg/100 ml (90). Duża zawartość fosforanu zapewnia bardzo małe, możliwe do pominięcia, zmiany w aktywności właściwej (AW) puli fosforanu podczas inkubacji. Umożliwia to wyliczenie włączania fosforanu wg wzoru

$$P_{\text{wbud}} = \text{DPM}_{\text{wbud}} / \text{AW puli pozakomórkowej}$$

gdzie DPM_{wbud} oznacza zliczenie/minutę w preparacie komórkowym. Znając zawartość fosforu w suchej masie preparatów mikroorganizmów można, stosując tę metodę, wyliczyć produkcję s.m. komórek i porównać z innymi metodami informującymi o tej produkcji.

Wydaje się, że wyniki uzyskane z wbudowywania, ^{32}P są trochę zawyżone (na 1 mol LKT 30,11 mg s.m.) w porównaniu z 27,0 mg z bilansu fermentacyjnego i 26,33 mg z wbudowywania NH_4HCO_3 (87).

Jest prawdopodobne, że aktywność właściwa pozakomórkowej puli $P_{nieorg.}$ jest oznaczona za nisko wskutek pominięcia faktu, że w treści zwacza część fosforu rozpuszczalnego w kwasach znajduje się w formie nukleotydów lub ufosforylowanych cukrów i związków pośrednich fermentacji.

Uwzględniając założenia o nieprzenikalności związków ufosforylowanych do komórek można przypuścić, że wewnątrzkomórkowa aktywność właściwa fosforanu (jako I prekursora) jest wyższa od aktywności właściwej wszystkich związków fosforowych w bezkomórkowym płynie inkubacyjnym. Sugestię tę potwierdzają wyższe wyniki zawartości fosforu w poszczególnych frakcjach związków fosforowych w mikroorganizmach uzyskane z wbudowywania ^{32}P w stosunku do np. metody Schmidta-Thannhausera (D. Demeyer, informacja osobista).

Poza tym wbudowywanie izotopu zależy od szybkości wzrostu (większe wbudowywanie przy wolniejszym wzroście). Użycie ^{32}P mierzy „wzrost całkowity”, związany z wyjściem znacznika do komórek, nie zawsze równy „wzrostowi netto”, obrazującemu rzeczywisty przyrost wielkocząsteczkowych związków fosforowych, białka i suchej masy komórek.

Bucholtz i Bergen (21) przyjęli syntezę fosfolipidów, znaczonej ^{33}P jako wskaźnik syntezy białka mikroorganizmów w zwaczu. Oparli się na założeniach, że: a) synteza fosfolipidów (błon komórkowych) jest wprost proporcjonalna do wzrostu komórek (63,95), b) wzrost komórek jest wprost proporcjonalny do syntezy białka w komórkach (54), c) wewnątrzkomórkowa aktywność właściwa prekursorów do syntezy fosfolipidów osiąga bardzo szybko stan równowagi z aktywnością wewnątrzkomórkowej puli fosforanu nieorganicznego (92).

Wyznaczano szybkość syntezy białka z pomiaru szybkości syntezy fosfolipidów w mikroorganizmach. Stwierdzono, że po 4 godz. inkubacji *in vitro* pula PO_4^{3-} w komórkach nie osiąga aktywności właściwej $^{33}PO_4^{3-}$ w płynie inkubacyjnym. Dlatego każdorazowo wydzielano frakcje bakterii i pierwotniaków i wyznaczano aktywność $^{33}PO_4^{3-}$. Uzyskane przez Bucholtza i Gergena (21) wyniki 16,1 g białka właściwego/100 g przefermentowanej materii organicznej oraz 30 g strawnego białka mikroorganizmów/1 Mcal energii strawnej są wyższe od wartości teoretycznych podanych przez Hungate (43). Nie można wykluczyć, że w fa-

zie intensywnego wzrostu frakcja fosfolipidów po 4 godz. inkubacji osiąga wyższą aktywność właściwą niż pula wewnątrzkomórkowa prekursora — fosforanu nieorganicznego (24).

Metoda oparta o wbudowanie ^{15}N do mikroorganizmów

Mikroorganizmy wykorzystują amoniak do syntezy związków azotowych w komórkach. Jeśli NH_3 w treści żwacza jest znaczone ^{15}N , izotop zostaje wbudowany do mikroorganizmów. Ulbrich i Scholtz (86) i Pilgrim i wsp. (67, 68) badali szlak i kinetykę wbudowywania ^{15}N do mikroorganizmów żwacza. *In vivo* interperacja ilościowa wyników jest utrudniona gdyż stężenie $^{15}\text{N-NH}_3$ w puli amoniaku w żwaczu ulega zmianie. Zawartość NH_3 w płynie żwaczowym wyznaczana jest przez następujące procesy (7): a) zamianę azotu dawki do aminokwasów i amoniaku, b) wchłanianie NH_3 przez mikroorganizmy, c) lizę mikroorganizmów i rozkład ich składników w żwaczu, d) absorpcję NH_3 przez ścianę żwacza, e) sekrecję mocznika do żwacza, f) przejście NH_3 do dalszych odcinków przewodu pokarmowego wraz z treścią żwacza.

Jeśli inkubację treści żwacza prowadzi się *in vitro* w układzie zamkniętym na stężenie amoniaku wpływają tylko procesy a—c. Takie właśnie warunki przyjęli Al-Rabbat i in. (4) w opracowanej metodzie wyznaczenia syntezy mikroorganizmów kosztem NH_3 z pomiaru *in vitro* szybkości wbudowywania NH_3 do składników komórek.

Jeśli założony stan równowagi dynamicznej to próbki treści żwacza inkubowane w układzie zamkniętym można uważać za przestrzeń, w której NH_3 jest wytwarzany i wykorzystywany w sposób ciągły ze stałą i równą szybkością. Po wprowadzeniu dawki $^{15}\text{N-NH}_3$, wyznaczyć można szybkość wbudowywania ^{15}N do mikroorganizmów.

Metoda pojedynczej dawki znacznika jest prawidłowa jeśli:

a) zapewni się warunki równowagi dynamicznej, czyli dopływ N-NH_3 do puli z rozkładu związków azotowych dawki ma być w przybliżeniu równy ubytkowi z puli poprzez wbudowywanie do komórek mikroorganizmów;

b) $^{15}\text{N-NH}_3$ wbudowany do komórek nie wraca ponownie do puli NH_3 wskutek rozpadu komórek;

c) fermentacja jest przerywana efektywnie w określonym czasie inkubacji;

d) nie zachodzi zjawisko swoistego wiązania NH_3 przez części stałe, jak opisane dla H_2S przez Walker i Nader (90),

e) jest pełny odzysk ^{15}N po inkubacji.

W celu sprawdzenia tych założeń użyto treści żwacza od skopa i krowy żywionych lucerną. Stwierdzono doświadczalnie spełnianie tych wa-

runków, a ponadto dobrą powtarzalność między różnymi inkubacjami z tej samej porcji treści żwacza. Mikroorganizmy żwacza owiec i krów nie różnią się pod względem zdolności wbudowywania NH_3 do komórek o ile są obecne w równej ilości w ośrodku o tym samym stężeniu NH_3 .

Znajomość szybkości wbudowywania NH_3 do mikroorganizmów w określonych warunkach żywienia i inkubacji pozwala na wyliczenie szybkości syntezy komórek mikroorganizmów, zakładając, że przy żywieniu ciągłym zawartość w treści żwacza substratów do syntezy mikroorganizmów nie zmienia się istotnie w czasie.

Stosowane przeliczniki:

a) 10,5% N w suchej masie (s.m.) mikroorganizmów (43), 60% białka w s.m. mikroorganizmów (53). Jeśli V_N jt. szybkość wbudowywania azotu z amoniaku do mikroorganizmów (mg) kg treści (godz.) to szybkość syntezy s.m. mikroorganizmów z udziałem N- NH_3

$$V_{s.m.} = V_N \frac{100}{10,5}$$

a szybkość syntezy białka mikroorganizmów

$$V_B = V_{s.m.} \times 0,6;$$

b) Około 86% azotu mikroorganizmów stanowią białka, peptydy i aminokwasy (73), większość pozostałych 14% jest w kwasach nukleinowych (80). Amoniak jest zużywany równomiernie do syntezy aminokwasów i kwasów nukleinowych. Zatem

$$V_B = V_N \times 0,86 \times 6,25,$$

a szybkość syntezy kwasów nukleinowych

$$V_{KN} = V_N \times 0,14 \times 6,05,$$

natomiast

$$V_{s.m.} = V_B \times \frac{100}{60}$$

Znajomość ciężaru treści żwacza pozwala wyliczyć dobową syntezę mikroorganizmów w oparciu o NH_3 jako źródło N.

Metody oparte na ilościowych modelach metabolizmu azotowego u przeżuwaczy — zastosowanie ^{15}N
in vivo

Technika izotopowa stosowana w badaniach przemianą nad azotową przeżuwaczy *in vivo* (55, 62, 67, 68), pozwala na dokładne prześledzenie szlaków metabolicznych azotu, a także na ilościowe określenie rozmiarów pul metabolicznych poszczególnych związków azotowych. Źródłem izotopu ^{15}N w tych badaniach są sole amonowe (NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), a także mocznik — ^{15}N i mocznik — ^{14}C , podawane zwierzętom doświadczalnym metodą infuzji dożwaczowej lub dożylniej.

W badaniach izotopowych przyjmuje się dwa zasadnicze założenia: a) amoniak jest kluczowym metabolitem w procesach rozkładu i syntezy związków azotowych w żwaczu, b) w warunkach równowagi dynamicznej wielkości pul metabolicznych związków azotowych są stałe a aktywność właściwa azotu ($^{15}\text{N}/\text{N}$) w poszczególnych metabolitach wyrażona w stosunku do aktywności właściwej azotu amoniaku określa udział azotu pochodzący z amoniaku w azocie ogólnym danego metabolitu.

Założenie dotyczące roli amoniaku w procesach metabolizmu azotowego jest całkowicie słuszne jedynie w warunkach żywienia mocznikiem lub solami amonowymi, jako jedynymi źródłami białka. W warunkach żywienia dawkami naturalnymi, stopień wykorzystania azotu w procesach mikrobiologicznej syntezy białka jest ujemnie skorelowany z podażą azotu amonowego w żwaczu (55, 68). Wyjaśnieniem tego faktu jest zdolność bakterii żwacza do wbudowanych wolnych aminokwasów i peptydów zamiast amoniaku, w warunkach dużej podaży białka (91).

Założenie stanu równowagi dynamicznej jest słuszne w warunkach doświadczalnych, w których stosuje się system ciągłego żywienia w małych odstępach czasu. W celu uzyskania stanu równowagi w procesach przemiany azotowej, zwierzęta żywiono w okresie doświadczalnym w odstępach 1-godzinnych (62, 67, 68), a nawet 10-minutowych (55).

Przykładem postępowania w badaniach izotopowych jest praca Pilgrima i in. (68), poświęcona przede wszystkim dokładnemu określeniu rozmiarów syntezy białka mikroorganizmów (bakterii i pierwotniaków) w żwaczu. Opracowania Mathisona i Milligana (55) i Nolana i Lenga (62), miały natomiast na celu określenie ilościowego ogólnego modelu metabolizmu azotowego przeżuwacza i ich przydatność w badaniach syntezy mikrobiologicznej w żwaczu jest ograniczona.

Pilgrim i in. (68) w warunkach stanu równowagi dynamicznej, ustalili dobową produkcję i absorbcję azotu amonowego w żwaczu, a różnicę pomiędzy tymi wartościami przyjęli za miarę mikrobiologicznej syntezy białka. Azot mikroorganizmów żwacza traktowany jest tu jako jedna z pul metabolicznych, pozostająca w stanie równowagi z pozostałymi pulami metabolicznymi związków azotowych.

Znajomość udziału azotu amonowego w procesie syntezy białka mikroorganizmów nie pozwala jednak na bezpośrednie określenie rozmiarów tej syntezy. Stwierdzono bowiem (55, 68), że udział azotu pochodzącego z amoniaku w azocie ogólnym bakterii i pierwotniaków jest zależny od rodzaju dawki pokarmowej, a także udział ten jest różny u obu grup mikroorganizmów. Zatem, dokładne określenie rozmiarów syntezy białka w żwaczu można przeprowadzić jedynie dla ściśle określonych warunków żywieniowych przy jednoczesnej znajomości wzajemnych proporcji

azotu bakterii i pierwotniaków w żwaczu. Jest to niewątpliwie mankamentem tej metody.

Drugim źródłem błędu jest pominięcie w obliczeniach przepływu azotu amonowego do dalszych odcinków przewodu pokarmowego wraz z treścią żwacza.

Rozważając wartość omawianej metody wydaje się, że jest ona zbyt skomplikowana technicznie, i niedostatecznie opracowana, aby mogła znaleźć zastosowanie w seryjnych doświadczeniach żywieniowych.

Metoda ubytku znacznika izotopowego

Oryginalne zastosowanie znaczników izotopowych przedstawili Singh i in. (77, 78). Polega ono na wyznaczaniu szybkości wzrostu mikroorganizmów w żwaczu *in vivo* na podstawie zaniku izotopu z komórek mikroorganizmów.

Podając przez 5 dni z dawką pokarmową ^{35}S Singh i in. (78) osiągnęli jednolite rozmieszczenie piętna izotopowego w komórkach mikroorganizmów. Dzienną dawkę podawano w 12 porcjach co 2 godz., aby zapewnić w żwaczu stan równowagi dynamicznej. Zastąpienie dawki znaczonej ^{35}S dawką bez izotopu powodowało (z opóźnieniem 6—8 godz. potrzebnym na pełne wbudowanie siarki radioaktywnej) zmniejszanie w czasie radioaktywności właściwej (RW_t) frakcji mikroorganizmów wg wzoru: $RW_t = RW_0 e^{-mt}$, gdzie RW_0 — początkowa radioaktywność właściwa, m — stała szybkości.

Po wyznaczeniu objętości płynu żwaczowego przy pomocy PEG wyliczono wielkość puli mikroorganizmów oraz szybkość produkcji mikroorganizmów. Dane te pozwoliły na stwierdzenie, że średnia dobowa produkcja mikroorganizmów u dwuletnich byczków zebu i buffalo wynosiła 150 i 180 g przy spożyciu białka w dawce odpowiednio 250 i 300 g.

Analogiczne zastosowanie tej metody to podawanie do żwacza jednorazowo dawki bakterii żwaczowych, znakowanych *in vitro* ^{35}S lub ^{14}C (77). Pomiar szybkości zmniejszania radioaktywności właściwej frakcji mikroorganizmów w czasie pozwala na wyliczenie puli mikroorganizmów i szybkości ich produkcji w żwaczu bez wyznaczania objętości żwacza. Prawidłowość metody zależy od spełnienia następujących założeń: a) znaczone mikroorganizmy są równomiernie rozprowadzone w treści żwacza, b) pobierane próbki mikroorganizmów są reprezentatywne dla całego żwacza, c) wprowadzone mikroorganizmy nie są traktowane jako białko obce i nie ulegają rozkładowi trawiennemu szybciej niż nieznakowane mikroorganizmy w żwaczu [szybki rozkład wprowadzonych *E. coli* i *Bacillus subtilis*, które normalnie nie występują w żwaczu, stwierdzili Hoogenraad i in. (39)].

Alantoina jako wskaźnik syntezy komórek mikroorganizmów

Metoda wykorzystująca alantoinę wydalaną w moczu opiera się na następujących przesłankach:

a) przeżuwacze wydają dużo więcej związków purynowych niż zwierzęta nieprzeżuwające (15),

b) puryny te są w dużej mierze pochodzenia egzogenne, gdyż zależą od ilości białka wprowadzonego do żwacza (16), oraz ich wydalanie znacznie maleje podczas głodzenia (75).

Egzogennym źródłem alantoiny w moczu są zasady purynowe mikroorganizmów żwacza. Topps i Elliott (85) wykazali wysoko istotną korelację pomiędzy zawartością kwasów nukleinowych w treści żwacza a ilością wydalanej alantoiny i kwasu moczowego.

Oznaczanie dobowego wydalania alantoiny może dać informację o ilości strawionych i wchłoniętych zasad purynowych o ile nie są one efektywnie zużywane do syntezy nukleotydów tkankowych, jak u rosnących przeżuwaczy (83).

Wykorzystanie azotu alantoiny do określenia syntezy białka mikroorganizmów wymaga wyznaczenia współczynników podających: a) udział azotu kwasów nukleinowych w azocie ogólnym mikroorganizmów, b) ilość azotu kwasów nukleinowych mikroorganizmów wydalanego jako alantoina, zależącą od strawności komórek i przemian puryn w tkankach, c) endogenne wydalanie alantoiny, np. podczas głodzenia.

W oparciu o dane piśmiennictwa Ryś i in. (75) przyjęli, że udział azotu RNA i DNA w azocie ogólnym mikroorganizmów wynosi średnio 18% (80) oraz, że 25% azotu kwasów nukleinowych mikroorganizmów wydalane jest jako alantoina (80).

Tak więc konwersję azotu dawki wyliczoną jako stosunek azotu wbudowanego w mikroorganizmy do azotu pobranego przedstawia wzór:

$$K = \frac{(N_a - N_{oa}) \times 4 \times \frac{100}{18} \times 100}{N_d}$$

gdzie N_a — azot alantoiny w okresie żywienia dawką doświadczalną (g/dobę), N_{oa} — azot alantoiny w okresie głodzenia (g/dobę), N_d — pobranie azotu z dawką.

Kwasy nukleinowe i zasady purynowe zawarte w spożytej dawce mogą powodować zwiększenie wydalania alantoiny w moczu. Mc Allan i Smith (56, 57) stwierdzili, że kwasy nukleinowe wprowadzone do żwacza ulegają szybkiej hydrolizie, natomiast rozkład zasad purynowych jest wolniejszy. Po 4 godz. inkubacji *in vitro* ksantyny, hipoksantyny i ade-

iny z treścią żwacza, odpowiednio 63, 45 i 38% pozostało nierozłożone. Guanina w tym czasie uległa całkowitej degradacji. Ekstrakt bezkomórkowy treści żwacza nie powoduje rozkładu zasad purynowych. Natomiast w warunkach *in vivo* następuje ich zanik w żwaczu, znacznie szybszy niż przepływ z treścią pokarmową do dwunastnicy. Na podstawie wyników Mc Allana i Smitha (56, 57) wydaje się, że w żwaczu w warunkach optymalnej podaży substratów mikroorganizmy wykorzystują dostępne zasady purynowe i pirymidynowe do syntezy własnych kwasów nukleinowych. Łatwość dostosowania mikroorganizmów, poprzez indukcję i represję układów enzymatycznych, do substratów obecnych w środowisku sugeruje taki proces. Jurtschuk i in. (47) oraz Belasco (10) stwierdzili, że bakterie żwaczowe rozkładają efektywnie puryny i mogą wykorzystywać je jako źródła azotu. Wydaje się, że analogicznie do czystych kwasów nukleinowych rozkładane są kwasy nukleinowe dawki pokarmowej. W żwaczu zachodzi współdziałanie wielu typów bakterii, a rozkładowi ulegają nawet trudnostrawne struktury komórkowe, co ułatwia kontakt enzymów ze składnikami wewnątrzkomórkowymi. Problem wpływu puryn dawki na wydalanie alantoiny w moczu przeżuwaczy wymaga jednak dalszych badań.

Metody oparte na swoistości składu aminokwasowego komórek mikroorganizmów żwacza

Cyliatyna jako wskaźnik obecności białka pierwotniaków

Cyliatyna — kwas 2-aminoetylofosfonowy (AEP), została wyosobniona po raz pierwszy z komórek pierwotniaków żwacza owcy przez badaczy japońskich (40). Z chemicznego punktu widzenia związek ten charakteryzuje się obecnością wiązania P—C, trwałego w warunkach hydrolyzy 8 N HCl przez 48 godzin w temperaturze 150°C (50). Cyliatyna jest integralnym składnikiem frakcji białkowych i tłuszczowych komórek pierwotniaków (40, 48), przy czym zawartość cyliatyny w komórkach poszczególnych gatunków pierwotniaków żwacza jest zróżnicowana (2).

Niniejsza metoda opiera się na założeniu, że cyliatyna występuje jedynie w komórkach pierwotniaków żwacza. Zawartość cyliatyny w treści żwacza, po uprzednim określeniu udziału azotu cyliatyny w azocie ogólnym frakcji pierwotniaków, pozwala zatem na określenie udziału azotu pierwotniaków w azocie ogólnym treści. Doświadczalnie stwierdzono istnienie pozytywnej korelacji pomiędzy poziomem AEP w żwaczu i liczebnością komórek pierwotniaków w 1 g treści (25).

Metoda AEP posiada jednak szereg ograniczeń, które mogą stawać się źródłem błędów. Pierwszym ograniczeniem jest niewątpliwie wspomniane gatunkowe zróżnicowanie zawartości AEP w komórkach pierwotniaków *Holotricha sp.* i *Entodinium sp.* Stwierdzono ponadto obecność AEP w preparatach komórek bakterii żwacza (25). Wydaje się również, że niezgodność wyników oznaczeń AEP w preparatach pierwotniaków żwacza (2, 25) jest wadą omawianej metody i wskazuje na konieczność opracowania standardowej techniki analitycznej. Pomimo tych ograniczeń, metoda AEP może znaleźć zastosowanie jako narzędzie badawcze w doświadczeniach stwarzających porównywalne warunki żywieniowe, gdzie błąd oznaczeń ma charakter systematyczny.

Kwas 2,6-dwuamio-pimeliowy jako wskaźnik obecności białka bakterii

Kwas 2—6-dwuamio-pimelinowy (DAP), znalazł stosunkowo szerokie zastosowanie jako wskaźnik obecności białka bakteryjnego w treści żwacza lub dwunastnicy (25, 27, 45, 46, 94). Aminokwas ten występuje jedynie w białku bakterii (96), natomiast nie występuje w białku pierwotniaków (96, 88, 94) ani też w tkankach roślinnych (84).

Metoda wskaźnika DAP polega na oznaczeniu zawartości DAP w treści żwacza lub dwunastnicy, określeniu stosunku N-DAP:N-ogólnego w oczyszczonym preparacie bakteryjnym uzyskanym z treści pokarmowej i obliczeniu i na podstawie tego stosunku, udziału azotu bakteryjnego w azocie ogólnym treści żwacza lub dwunastnicy.

Omawiana metoda, podobnie jak metoda AEP, obarczona jest kilkoma błędami. Stwierdzono mianowicie, że nie wszystkie bakterie zawierają w swym składzie DAP (96), zawartość DAP w komórkach bakterii jest zróżnicowana gatunkowo (25, 74).

Na stałość stosunku N-DAP:N-ogólnego w preparatach bakteryjnych wywiera wpływ zmienna zawartość azotu ogólnego w preparatach (43, 45, 60). Rozkład komórek bakteryjnych w żwaczu, w wyniku którego pozostają nienaruszone błony komórkowe (zawierające całkowity DAP komórki), może również zmieniać stosunek N-DAP:N-ogólnego (74).

Do ograniczeń metody należy zaliczyć także stwierdzoną ostatnio (25), obecność DAP w preparatach komórek pierwotniaków żwacza. Może to być spowodowane obecnością komórek bakteryjnych w komórkach pierwotniaków lecz także zanieczyszczeniem funkcji pierwotniaków bakteriami.

Niezależnie jednak od przedstawionych ograniczeń, w określonych stałych warunkach żywienia, bakteryjna populacja żwacza charakteryzuje się stałym stosunkiem N-DAP:N-ogólnego (93); stosunek ten może za-

tem służyć do poprawnego określenia udziału azotu bakteryjnego w azocie ogólnym treści żwacza lub dwunastnicy.

Kwasy nukleinowe (RNA i DNA) jako wskaźnik obecności białka bakterii i pierwotniaków

Azot kwasów nukleinowych stanowiąc 10—20% azotu ogólnego mikroorganizmów, przedstawia tym samym znaczną część azotu treści żwacza (80). Smith i McAllan (81, 82) oraz Ryś i in. (76) przyjęli poziom kwasów nukleinowych w treści żwacza jako miernik udziału białka mikroorganizmów.

Smith i McAllan (81) na podstawie badań nad szybkością rozkładu czystych kwasów nukleinowych (RNA i DNA) w obecności treści żwacza *in vitro* i *in vivo* przyjęli założenie, że kwasy nukleinowe występujące w żwaczu są pochodzenia wyłącznie mikrobiologicznego. Wymienieni autorzy określili również wartość stosunku azotu kwasów nukleinowych (N-RNA i N-DNA) do azotu ogólnego w oczyszczonych preparatach bakterii i pierwotniaków. Współczynniki te pozwalają na określenie udziału azotu mikroorganizmów w azocie ogólnym treści żwacza.

W stosunku do przyjętych założeń można wysunąć jednak pewne zastrzeżenia:

a) pasze wolno ulegające rozkładowi w treści żwacza będą zwiększały udział kwasów nukleinowych w treści żwacza, poprzez kwasy nukleinowe pochodzenia paszowego.

b) udział azotu kwasów nukleinowych w azocie ogólnym oczyszczonych preparatów mikroorganizmów żwacza zmienia się w zależności od dawki pokarmowej, składu populacji oraz warunków utrzymania zwierząt,

c) udział azotu kwasów nukleinowych we frakcji mikroorganizmów (średnio 0,19) jest znacznie wyższy niż w komórkach pierwotniaków (0,11), co przy dużej ilości tych ostatnich powodować może zaniżenie wyników oznaczania białka mikroorganizmów.

Badania nad udziałem azotu kwasów rybonukleinowych, dezoksyrybonukleinowych oraz azotu sumy tych kwasów a azocie ogólnym mikroorganizmów żwacza (80) sugerują użycie RNA jako wskaźnika obecności białka mikroorganizmów. Stwierdzono, że stosunek azotu RNA do azotu ogólnego mikroorganizmów jest mniej zmienny w porównaniu z udziałem azotu DNA czy też sumy kwasów nukleinowych. Ponadto ilość RNA jest powiązana z rozmiarami syntezy białka mikroorganizmów, podczas gdy ilość DNA jest wskaźnikiem liczebności komórek (59, 71). Uzasad-

nia to niewątpliwie użycie kwasów rybonukleinowych jako miernika białka mikroorganizmów.

W przedstawionej metodzie, podobnie jak w metodach omówionych poprzednio (użycie AEP, DAP) najbardziej miarodajne oznaczenie produkcji białka mikrobiologicznego w żwaczu można uzyskać w ściśle określonych porównywalnych warunkach żywieniowych. Na konieczność ścisłego określenia warunków doświadczalnych przy stosowaniu kwasów nukleinowych jako wskaźnika wskazują badania Smitha i McAllana (83), w których obserwowano istotny wpływ czynników środowiska, jak również czasu po odpasie, na wartość stosunku N-RNA i N-DNA do N-ogólnego w preparatach bakteryjnych.

Metoda matematyczna w oparciu o skład aminokwasowy białka mikroorganizmów

Evans i in. (28) opracowali nowoczesną metodę wyznaczania udziału białka mikroorganizmów w treści pokarmowej przepływającej z trawieńca do dwunastnicy. Metoda polega na wyliczeniu i dopasowaniu, przy pomocy maszyny matematycznej, proporcji w treści pokarmowej białka dawki, pepsyny i białka mikroorganizmów na podstawie znajomości składu aminokwasowego treści dwunastnicy i składu aminokwasowego tych 3 składników.

Metoda komputerowa została porównana z wskaźnikiem DAP i stwierdzono zadowalającą zbieżność.

Prawidłowość wyników w metodzie Evansa i in. (28) zależy od poprawności wyznaczenia składu aminokwasowego frakcji mikroorganizmów (udziału bakterii i pierwotniaków). Źródłem błędu może być przyjęcie pepsyny jako jedyne białko pochodzenia endogenne w treści pokarmowej a także założenie, że skład aminokwasowy niestrawionego białka dawki w dwunastnicy jest identyczny jak pierwotnego białka dawki, czyli że wszystkie składniki białkowe dawki są rozkładane w żwaczu i trawieńcu w takim samym stopniu.

Uwagi końcowe

Przedstawiony przegląd wskazuje na szerokie zainteresowanie metodami ilościowej oceny rozmiarów mikrobiologicznej syntezy białka w żwaczu. Zjawisko biosyntezy białka w żwaczu ma bowiem podstawowe znaczenie produkcyjne, gdyż białko mikroorganizmów jest źródłem aminokwasów niezbędnych dla organizmu zwierzęcego.

W przeglądzie nie wyróżniono żadnej z omawianych metod. Wszystkie obciążone są błędami ograniczającymi ich dokładność, a źródła błędów wskazano. Różnorodność, zmienność i dynamika populacji mikro-

organizmów żwaczowych powodują, że nie jest możliwe wyznaczenie obiektywnych wskaźników liczbowych i operować musi się wartościami średnimi lub przybliżonymi.

Niezależnie od istniejących ograniczeń należy zwrócić uwagę na metody wykorzystujące obecność kwasów nukleinowych w komórkach mikroorganizmów żwacza (metoda RNA, metoda alantoinowa). Ścisłe powiązanie kwasów nukleinowych z procesem biosyntezy białka uzasadnia ten wybór. Aktualnie jednak metody te nie są jeszcze w pełni opracowane.

Brak uniwersalnej i dokładnej metody oznaczania rozmiarów konwersji białka dawki pokarmowej na białko mikroorganizmów żwacza wskazuje na konieczność podjęcia dalszych wysiłków w celu poznania procesu syntezy białka w żwaczu oraz wyznaczenia wskaźników ilościowych tego procesu.

LITERATURA

1. Abe M., Kandatsu M.: *Jap. J. Zoot. Sci.*, 40, 313, 1969.
2. Abou Akkada A.R., Messmer D.A., Fina L.R., Bartley E.E.: *J. Dairy Sci.*, 51, 78, 1968.
3. Allison M.J.: W „*Physiology of Digestion and Metabolism in the Ruminant*”, s. 456. Ed. A.T. Phillipson. Newcastle upon Tyne: Oriel Press, 1970.
4. Al-Rabbat M.F., Baldwin R.L., Weir W.C.: *J. Dairy Sci.*, 54, 1150, 1971.
5. Annison E.F.: *Biochem. J.*, 64, 705, 1956.
6. Baldwin R.L., Lucas H.L., Cabrera R.: W „*Physiology of Digestion and Metabolism in the Ruminant*”, s. 319. Ed. A.T. Phillipson. Newcastle upon Tyne: Oriel Press, 1970.
7. Baldwin R.L., Reichl J.R., Al-Rabbat M.F.: W „*Tracer Studies on Non-protein Nitrogen for Ruminants*”, s. 43. Wiedeń: I.A.E.A., 1972.
8. Bauchop T., Elsdon S.R.: *J. gen. Microbiol.*, 23, 457, 1960.
9. Beever D.E., Harrison D.G., Thomson D.J., Cammell S.B., Osbourn D.F.: *Br. J. Nutr.*, 32, 99, 1974.
10. Belasco I.J.: *J. Anim. Sci.*, 13, 601, 1954.
11. Bergen W.G., Purser D.B., Cline J.H.: *J. Nutr.*, 92, 357, 1967.
12. Bergen W.G., Purser D.B., Cline J.H.: *J. Anim. Sci.*, 27, 1497, 1968.
13. Blackburn T.H., Hobson P.N.: *J. gen. Microbiol.* 22, 282, 1960.
14. Blackburn T.H., Hobson P.N.: *Br. J. Nutr.*, 14, 445, 1960.
15. Blaxter K.L.: W „*Digestive Physiology and Nutrition of the Ruminant*”. Londyn: Butterworth, 1961.
16. Blaxter K.L., Martin A.K.: *Br. J. Nutr.*, 16, 397, 1962.
17. Block R.J., Stekol J.A., Loosli J.K.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 33, 353, 1951.
18. Bryant M.P., Doetch R.N.: *J. Dairy Sci.*, 37, 1176, 1954.
19. Bryant M.P., Robinson I.M.: *Appl. Microbiol.*, 9, 96, 1961.
20. Bryant M.P., Robinson I.M.: *J. Dairy Sci.*, 46, 150, 1963.
21. Bucholtz H.F., Bergen W.G.: *Appl. Microbiol.*, 25, 504, 1973.

22. De Calesta D.S., Ward G.M., Nay J.G., Bailey J.A.: *J. Anim. Sci.*, 39, 236, 1974.
23. Chalupa W., Clark J.A., Opliger P., Lavker R.: *J. Nutr.*, 100, 161, 1970.
24. Comar C.L.: W „Izotopy promieniotwórcze w biologii i rolnictwie”, s. 52. PWN, Warszawa 1958.
25. Czerkawski J.W.: *J. Sci. Fd Agric.*, 25, 45, 1974.
26. Demeyer D.I., Henderickx H.K., Van Nevel C.J.: *Proc. Nutr. Soc.*, 54A, 31, 1972.
27. El-Shazly K., Hungate R.E.: *Appl. Microbiol.*, 14, 27, 1966.
28. Evans P.A., Axford R.F.E., Offer N.W.: *Proc. Nutr. Soc.*, 34, 65A, 1975.
29. Forrest W., Walker D.J.: *Adv. Microb. Physiol.*, 5, 213, 1971.
30. Halverson A.W., Williams G.D., Paulson G.D.: *J. Nutr.*, 95, 363, 1968.
31. Harmeyer J., Martens H., Höller H.: W „Tracer Studies on Non-protein Nitrogen for Ruminants”, s. 7. Wiedeń: I.A.E.A., 1975.
32. Henderickx H.K., Martin J., Baert L.: *I.R.S.I.A. Compt. Rend. Rech.*, 28, 61, 1962.
33. Henderickx H.K., Martin J.: *I.R.S.I.A. Compt. Rend. Rech.*, 31, 9, 1963.
34. Henderickx H.K., Demeyer D.J., Van Nevel J.J.: W „Tracer Studies on Non-protein Nitrogen for Ruminants”, s. 57. Wiedeń: I.A.E.A., 1972.
35. Hobson P.N.: *J. gen. Microbiol.*, 38, 167, 1965.
36. Hobson P.N.: W „19-th Symp. Society for General Microbiology”, s. 43. Ed. P. Meadow, S.J. Pirt. Cambridge: University Press, 1969.
37. Hogan J.P., Weston R.H.: W „Physiology of Digestion and Metabolism in the Ruminant”, s. 474. Ed. A.T. Phillipson. Newcastle upon Tyne: Oriel press, 1970.
39. Höller M., Harmeyer J.: *Zentbl. Vet. Med.*, 11, 244, 1964.
39. Hoogenraad N.J., Hird F.R.J., White R.G., Leng R.A.: *Br. J. Nutr.*, 24, 129, 1970.
40. Horiguchi M., Kandatsu M.: *Bull. Agr. Chem. Jap.*, 24, 565, 1960.
41. Hume I.D., Moir R.J., Somers M.: *Aust. J. agric. Res.*, 21, 283, 1970.
42. Hume I.D.: *Aust. J. agric. Res.*, 25, 155, 1974.
43. Hungate R.E.: W „The Rumen and Its Microbes”. New York, London: Academic Press, 1966.
44. Hungate R.E.: W „Handbook of Physiology”. Ed. C.F. Code. Baltimore: Waverly Press, 1968.
45. Hutton K., Bailey J.F., Annison E.F.: *Br. J. Nutr.*, 25, 165, 1971.
46. Ibrahim E.A., Ingalls J.R.: *J. Dairy Sci.*, 55, 971, 1972.
47. Jurtshuk J.R., Doetch R.N., Shaw J.C.: *J. Dairy Sci.*, 41, 190, 1958.
48. Kandatsu M., Horiguchi M.: *Agr. Biol. Chem.*, 26, 721, 1962.
49. Kepes A., Cohen G.N.: W „The Bacteria”, vol. IV, s. 179. Ed. I.C. Gunsalus, R.U. Stanier. London: Academic Press, 1962.
50. Kittredge J.S., Roberts E., Simonsen D.G.: *Biochemistry*, 1, 624, 1962.
51. Leibholtz J.: *Aust. J. agric. Res.*, 23, 1073, 1972.
52. Leng R.A.: W „Chemistry and Biochemistry of Herbage”, s. 108. Ed. G.W. Butler, R.W. Bailey. London, New York: Academic Press, 1973.
53. Luria S.E.: W „The Bacteria”, vol. I, s. 1. Ed. I.C. Gunsalus, R.U. Stanier. London, New York: Academic Press, 1960.
54. Maalq O., Kjeldgaard N.O.: W „Control of Macromolecular Synthesis”, Ed. W.A. Benjamin. New York: Academic Press, 1966.
55. Mathison G.W., Milligan L.P.: *Br. J. Nutr.*, 25, 351, 1971.
56. McAllan A.B., Smith R.H.: *Br. J. Nutr.*, 29, 331, 1973.

57. McAllan A.B., Smith R.H.: *Br. J. Nutr.*, 29, 467, 1973.
58. Müller R., von Erischsen L.: *Z. Tierzücht. Zücht. Biol.*, 60, 20, 1952.
59. Neidhardt F.C.: *Ann. Rev. Microbiol.*, 17, 61, 1963.
60. Nicolić J.A., Jovanović M.: *J. Agric. Sci.*, 81, 1, 1973.
61. Nicolić J.A., Jovanović M., Filipović R.: W „Tracer Studies on Non-protein Nitrogen for Ruminants”, s. 43. Wiedeń: I.A.E.A., 1975.
62. Nolan J.V., Leng R.A.: *Br. J. Nutr.*, 27, 177, 1972.
63. Ohki M.: *J. Mol. Biol.*, 68, 249, 1972.
64. Ørskov E.R., Flatt W.P., Moe P.W.: *J. Dairy Sci.*, 51, 1429, 1968.
65. Palmquist D.L., Baldwin R.L.: *Appl. Microbiol.*, 14, 60, 1966.
66. Pardee A.B.: *Science*, 162, 632, 1968.
67. Pilgrim A.F., Grey F.V., Belling G.B.: *Br. J. Nutr.*, 23, 647, 1969.
68. Pilgrim A.F., Grey F.V., Weller R.A., Belling G.B.: *Br. J. Nutr.*, 24, 589, 1970.
69. Pittman K.A., Bryant M.P.: *J. Bacteriol.*, 88, 401, 1964.
70. Portugal A.V.: W „2-nd World Congress of Animal Feeding”, vol. IV, s. 13. Madryt, 1972.
71. Price W.H.: *J. gen. Physiol.*, 35, 741, 1952.
72. Purser D.B.: *J. Anim. Sci.*, 30, 988, 1970.
73. Purser D.B., Buechler S.M.: *J. Dairy Sci.*, 49, 81, 1966.
74. Rhuland L.E.: *Nature*, 185, 224, 1960.
75. Ryś R., Antoniewicz A., Maciejewicz J.: *Rocz. Nauk Roln.*, B-95-2, 89, 1973.
76. Ryś R., Kryściak J., Antoniewicz A.: *Zesz. Probl. Post. Nauk Roln.*, 126, 79, 1972.
77. Singh U.B., Verma D.N., Varma A., Ranjhan S.K.: *J. Agric. Sci.*, 83, 13, 1974.
78. Singh U.B., Varma A., Verma D.N., Lal M., Ranjhan S.K.: *J. Agric. Sci.*, 81, 349, 1973.
79. Smith R.C., Moussa N.M., Hawkins G.E.: *Br. J. Nutr.*, 32, 529, 1974.
80. Smith R.H.: *J. Dairy Res.*, 36, 313, 1969.
81. Smith R.H., McAllan A.B.: *Br. J. Nutr.*, 24, 545, 1970.
82. Smith R.H., McAllan A.B.: *Br. J. Nutr.*, 25, 181, 1971.
83. Smith R.H., McAllan A.B.: *Br. J. Nutr.*, 31, 27, 1974.
84. Syngé R.L.M.: *J. gen. Microbiol.*, 9, 407, 1953.
85. Topps J.H., Elliot R.C.: *Nature*, 4970, 498, 1965.
86. Ulbrich M., Scholtz H.: *Arch. Tierernährg.*, 16, 325, 1966.
87. van Nevel C.J., Demeyer D.I., Henderickx H.K.: W „Tracer Studies on Non-protein Nitrogen for Ruminants”, s. 15. Wiedeń: I.A.E.A., 1975.
88. Virtanen A.I.: *Ned. Melk- en Zuiveltijdschr.*, 21, 233, 1967.
89. Walker D.J.: W „Physiology of Digestion in the Ruminant”, s. 296. Ed. R.W. Dougherty. London: Butterworth, 1965.
90. Walker D.J., Nader C.J.: *Appl. Microbiol.*, 16, 1124, 1968.
91. Warner A.S.I.: *Biochem. J.*, 164, 1, 1956.
92. Weissbach H., Thomas E., Kaback A.R.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 147, 249, 1971.
93. Weller R.A.: *Aust. J. Biol. Sci.*, 10, 384, 1957.
94. Weller R.A., Gray F.V., Pilgrim A.F.: *Br. J. Nutr.*, 12, 421, 1958.
95. White D.C., Tucker A.N.: *J. Lipid Res.*, 10, 220, 1969.
96. Work E., Dewey D.L.: *J. gen. Microbiol.*, 9, 394, 1953.
97. Wright D.E.: *Appl. Microbiol.*, 15, 547, 1967.