

ZDZISŁAW ZAWADZKI, WOJCIECH ZAWADZKI*

Proteolityczne właściwości mikroflory żwacza

Instytut Inżynierii Ochrony Środowiska Politechniki Wrocławskiej,
Plac Grunwaldzki 9, 50-377 Wrocław

* Katedra Fizjologii Zwierząt Wydziału Weterynaryjnego AR, ul. Norwida 31, 50-375 Wrocław

Proteoliza przebiegająca obok procesów fermentacyjnych w żwacu może przynieść korzyść zwierzęciu, ale w pewnych przypadkach może oddziaływać szkodliwie. Korzyść ma miejsce wówczas, gdy produkty powstające w wyniku proteolizy są później wykorzystywane do syntezy łatwostrawnych białek, o większej wartości biologicznej niż białka paszy. Natomiast jej oddziaływanie szkodliwe jest następstwem powstawania strat w wykorzystaniu białek netto.

Pomimo znaczenia proteolizy w odżywianiu się zwierząt, proteolityczne bakterie żwacza, jako specyficzna grupa jego mikroflory, wzbudzają znacznie mniejsze zainteresowanie badaczy, niż inne grupy mikroflory przedżołądków, jak np. bakterie rozkładające błonnik czy bakterie metanowe. Badania przeważnie ograniczały się do obserwacji rozkładu żelatyny lub kazeiny przez bakterie proteolityczne, natomiast inne ich badania były stosunkowo nieliczne. O zdolności niektórych szczepów bakteryjnych wyizolowanych ze żwacza do upłynniania żelatyny donoszą liczni badacze, a między innymi Hungate (23), Bryant i Small (10), Bryant i wsp. (11), Hamlin i Hungate (17), Huhtanen i Gall (21) oraz Mann i wsp. (28). Bryant i Doetsch (37) wyizolowali szczepy rozkładające kazeinę, a nie upłynniające żelatynę. Szczep *Selenomonas ruminantium* wyizolowany przez Bryanta (10) posiadał też podobne właściwości. Można zgodzić się ze zdaniem Fulghuma i Moore'a (15), że test na kazeinę jest bardziej czułym i on został zastosowany w naszych badaniach.

Celem badań było sprawdzenie, czy w różnych okresach trawienia treści pokarmowej w żwacu zmienia się liczebność bakterii proteolitycznych w składzie mieszanej flory bakteryjnej tego przedżołądka u przeżuwaczy. Ponadto wyrywkowo dokonywano identyfikacji taksonomicznej wyizolowanych szczepów bakterii proteolitycznych.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na trzech krowach rasy holsztyńskiej w wieku trzech lat, karmionych o godz. 7.30 i 19.30 srutą kukurydzianą i sianem z lucerny według norm żywieniowych (33). Paszę wzbogacano Polfamixem R w ilości po 40 g/dz/szt. Wodę do picia podawano do woli. Krowom założono podczas zabiegu operacyjnego kaniule do żwacza (13) i po upływie dwóch tygodni rozpoczęto pobieranie płynu żwaczowego do badań bakteriologicznych. Od wszystkich krów pobierano próbki czterokrotnie w ciągu dnia, a mianowicie o godz.: 7.00, 10.30, 15.30 i 17.30, a więc tuż przed rannym odpasem oraz po 3, 8 i 10 godzinach po jego rozpoczęciu. Czas pobierania próbek i ich badań obejmował łącznie 30 dni, z tym że po-

dzielono go na trzy okresy po 10 dni, stosując 14-dniowe przerwy między okresami pierwszym a drugim oraz drugim a trzecim.

Doświadczenia przeprowadzono z zapewnieniem warunków beztlenowych w atmosferze 100% (wolnego od O₂) gazowego CO₂ według zasad podanych przez Hungate'a (22, 24), Millera i Wolina (30) oraz Wolfe'a (35).

Podłoże płynne zawierało: roztwory mineralne A i B (25) po 25%, przejrzysty płyn żwaczowy — 30%, roztwór mikroelementów (32) — 1%, roztwór witamin (32) — 1%, chlorowodorek L-cysteiny — 0,05%, NaHCO₃ — 0,5%, resazurynę — 0,0001% oraz wodę destylowaną przedmuchaną gazowym CO₂, wolną od tlenu — ad 100%; pH podłoża ustalono na 6,8. Płyn żwaczowy używany do wzbogacania podłoża sączono przez dwie warstwy tkaniny bawełnianej, wirowano przez 20 minut przy 12 000 g na wirówce Beckmanna TG, a następnie przejrzysty płyn wyjaławiano w 121°C przez 20 minut w atmosferze 100% gazowego CO₂ w zamkniętym pojemniku. Roztwory chlorowodoru cysteiny (5%), NaHCO₃ (10%) oraz witamin wyjaławiano przy użyciu filtrów bakteriologicznych Schotta G-5 i dodawano do jałowego podłoża tuż przed jego użyciem do doświadczeń. Podłoże wyjaławiano w 121°C przez 20 minut.

Podłoże stałe przygotowywano wlewając po 9 ml podłoża płynnego (bez chlorowodoru cysteiny, NaHCO₃ i roztworu witamin) do probówek zawierających po 0,2 g agaru „Dfco”, a następnie wyjaławiano w 121°C przez 20 minut. Po wyjałowieniu ochładzano podłoże do temp. 45°C w łaźni wodnej i do każdej próbki dodawano po 1 ml wyjałowionego odtłuszczonego mleka ochłodzonego do temp. 45°C, a następnie pozostałe składniki podłoża, tj. jałowe roztwory chlorowodoru cysteiny, NaHCO₃ i witamin w takich ilościach, aby uzyskać takie ich stężenia, jak w podłożu płynnym. Podłoże zestalono na ściankach probówek (12, 22, 25, 30, 35), przedmuchiwano je gazowym CO₂ i zamykano korkami gumowymi.

Płyn żwaczowy do posiewów pobierano za pomocą zgłębnika zaopatrzonego w dolnej części w otwory o średnicy ok. 2 mm, używając do tego celu pompy ssącej. Pobierany płyn wprowadzano do kolby przedmuchanej uprzednio gazowym CO₂ i natychmiast po wprowadzeniu płynu zawartość kolby przedmuchiwano znowu przez około 10 minut gazowym CO₂, zamykano szczelnie kolbę korkiem gumowym i umieszczano w łaźni wodnej o temp. 39°C. W celu zwiększenia możliwości powtarzalności wyników badań pozostawiano płyn przez 30 minut do opadnięcia większych cząstek paszy, a następnie pobierano odpowiednią jego objętość z określonej głębokości kolby. Z płynu żwaczowego sporządzano kolejne rozcieńczenia w podłożu płynnym. Inoculum stanowiło rozcieńczenie 10⁻⁸, z którego sporządzano po 2—3 równoległe posiewy. Po wykonaniu posiewów próbki jeszcze raz przedmuchiwano gazowym CO₂, zamykano szczelnie korkami gumowymi i inkubowano przez 120 h w temp. 39°C. Po okresie inkubacji liczono wyrosłe kolonie. Wokół kolonii bakterii proteolitycznych powstawała strefa przejrzystego podłoża jako wynik hydrolizy białek mleka. Obserwacje wyrosłych kolonii przeprowadzano pod 10-krotnym powiększeniem, obliczając ogólną ich liczbę, w tym też liczbę bakterii proteolitycznych. Badania taksonomiczne przeprowadzono w sposób podany przez Fulghuma i Moore'a (15) i jak u tych autorów o przynależności szczepów do rodzajów *Butyrivibrio* i *Succinovibrio* decydo-

Tab. 1. Udział mikroflory proteolitycznej żwacza krów w ogólnej liczbie bakterii żwacza w zależności od czasu, jaki upłynął od nakarmienia zwierząt (średnie liczby bakterii $\times 10^8/1$ ml)

Czas pobierania próbek	Przed karmieniem	Po karmieniu (godziny)			
		3	6	9	10
Ogólna liczba bakterii żwacza	$26,8 \pm 0,3$	$22,2 \pm 0,1$	$20,6 \pm 0,1$	$20,1 \pm 0,1$	
Bakterie proteolityczne żwacza	$9,9 \pm 0,1$	$9,0 \pm 0,2$	$8,6 \pm 0,1$	$8,5 \pm 0,1$	
Procent udziału bakterii proteolitycznych w ogólnej liczbie bakterii żwacza	36,9	40,5	41,7	42,3	
Wskazanie różnic P	$\leq 0,01$	$\leq 0,05$	$\leq 0,01$	$\leq 0,01$	

wały opisy wymienione w pracach Bryanta i Smalla (9, 10). Natomiast do rodzajów *Bacteroides* i *Peptostreptococcus* zaliczono szczepy odpowiadające opisom podanym przez Geisecka (16).

Wyniki i omówienie

Średnie liczby kolonii izolowanych w naszych badaniach z treści żwacza są zgodne z liczbami bakterii oznaczonych przez Bryanta i Robinsona (8) oraz Fulghuma i Moore'a (15) na zmodyfikowanym podłożu niewybiórczym w próbkach pobranych od zwierząt karmionych paszą o podobnym składzie. Blackburn i Hobson (4) stwierdzili, że 10% z ogólnej liczby bakterii wyhodowanych ze żwacza owiec posiada właściwości proteolityczne, podczas gdy Fulghum i Moore (15) wykazali takie właściwości u 38% bakterii wyizolowanych ze żwacza krów. Wyniki badań przeprowadzonych przez nas (tab. 1) wykazały stopniowe zmniejszanie się ogólnej liczby bakterii w 1 ml treści żwacza z $26,8 \times 10^8$ (przed karmieniem) do $20,1 \times 10^8$ (po karmieniu), z jednoczesnym wzrostem odsetka bakterii proteolitycznych wśród ogólnej liczby bakterii żwacza, wynoszącego od 36,9% do 42,3%. W przeprowadzonych przez nas badaniach wstępnych (36) dotyczących tylko próbek pobranych przed karmieniem, średnia ogólna liczba bakterii w płynie żwaczowym wynosiła $24,2 \times 10^8$, w tym bakterii proteolitycznych $7,6 \times 10^8$, co stanowiło 31% ogólnej liczby bakterii. Podobne rezultaty uzyskał Warner (34), który zaobserwował najaktywniejsze właściwości proteolityczne u bakterii wyizolowanych ze żwacza w 6–10 h po nakarmieniu zwierząt gospodarskich. Bakterie proteolityczne wyizolowane ze żwacza owiec sklasyfikowano jako *Bacteroides amylophilus*, *Bacteroides rumicola*, wytwarzający kwas masłowy szczep z rodzaju *Bacteroides*, *Butyrovibrio* sp., *Selenomonas ruminantium*, *Lechnospira multiparus* i liczne niezidentyfikowane Gram-dodatnie i Gram-ujemne ziarniaki (4). Bakterie o zasadniczo takiej samej przynależności taksonomicznej, ale z przewagą *Butyrovibrio* sp. wyizolowali Fulghum i Moore (15) ze żwacza krów, a proteolityczne bakterie *Peptostreptococcus*, *Butyrovibrio fibrilolvens* i *Bacteroides* sp. wyizolował Geisecke (16). Badania przeprowadzone przez Fulghuma i Moore'a (15) potwierdzają wyniki wcześniejszych badań Bryanta (5) sugerując, że aktywność proteolityczna jest w znacznej mierze właściwością bakterii wystę-

pujących w żwaczu w dużych ilościach. W niniejszej pracy przeprowadzono badania mające na celu dokonania identyfikacji taksonomicznej 40 szczepów, wybranych spośród wyizolowanych bakterii proteolitycznych. W wyniku tych badań 23 szczepy zaliczono do *Butyrovibrio* sp. (9), 1 do *Succinivibrio* sp. (10), 4 do *Bacteroides* sp. (16) oraz 3 do *Peptostreptococcus* sp. (16). Pozostałych 9 szczepów niezidentyfikowano. Były to Gram-dodatnie i Gram-ujemne ziarniaki oraz Gram-zmienne pałeczki.

Blackburn i Hobson (3) nie stwierdzili w płynie żwaczowym obecności wolnych pozakomórkowych enzymów proteolitycznych. Optimum dla aktywności proteolitycznej bakterii żwacza *in vitro* wykazano dla pH około 6,5 (1, 3), jednak bez stwierdzenia jakiegos wyrażonego maksimum. Według Warnera (34) optimum to waha się pomiędzy 6,5 a 7,0. Clarke i Bauchop (12) uważają za nieprawdopodobne, by pH w żwaczu mogło spadać do takich wartości, które wywoływałyby zupełną inhibicję proteaz drobnoustrojowych. W badaniach *in vitro* stwierdzono inhibicję proteolizy przez rozpuszczalne, podlegające fermentacji węglowodany (19). Aktywność proteolityczną bakterii mogą obniżać takie łatwo fermentujące węglowodany, jak dekstryna oraz cukry proste, a zachodzić to może na skutek zakwaszenia środowiska żwacza, względnie w wyniku zahamowania czynności proteolitycznej enzymów przez produkty rozpadu cukrów (14). Enzymy proteolityczne bakterii są przeważnie wewnątrzkomórkowe, związane ze ścianą komórkową, z której mogą być uwalniane po jej traktowaniu n-butanołem. Około 10% do 30% enzymów proteolitycznych jest uwalnianych do podłoża wzrostu bakterii. Enzymy te mają właściwości podobne do tych, jakie posiada trypsyna (2).

Warner (34) w swoich badaniach przeprowadzonych na owcach stwierdził, że rodzaj stosowanej diety miał mały wpływ na stopień aktywności proteolitycznej bakterii żwacza. Autor ten stwierdził również, że przy żywieniu owiec dietą wysokobiałkową, stosowaną zwykle przez niego w doświadczeniach, aktywność proteolityczna była rozłożona mniej więcej po połowie pomiędzy mikroflorą a mikrofauną żwacza (orzęski). Również Blackburn i Hobson (3) uważają, że enzymy proteolityczne wytwarzane są mniej więcej w równych ilościach przez bakterie i pierwotniaki żwacza, a Bryant (6) wykazał, że poziom ich aktywności proteolitycznej jest zbliżony, niezależnie od stosowanej diety.

Nowsze badania Nugenta i Mangana (31) dowiodły, że aktywność proteolityczna w żwaczu jest prawie całkowicie związana z działaniem komórek bakterii, a bezkomórkowy płyn żwaczowy i pierwotniaki posiadają małą aktywność. Autorzy stwierdzają, że wcześniejsze sugestie mówiące, iż pierwotniaki mają zasadnicze znaczenie w proteolizie treści pokarmowej w żwaczu nie zostały potwierdzone w ich badaniach.

Praca ta również sugeruje, że pochłaniane rozpuszczalne białka są bardzo szybko wiązane przez ściany komórek bakterii i tam szybko ulegają rozkładowi biochemicznemu.

Szybkość przebiegu proteolizy białek paszy zależy od stopnia ich rozpuszczalności (20, 29), a Mangan (27) stwierdził, że duże znaczenie ma przy tym również budowa chemiczna trawionych białek. Około 80—90% białka pasz ulega przemianie na białka mikroorganizmów żwacza (cyt. 14). Stwierdzono, że białka bakterii żwacza są bardzo łatwo trawione i posiadają dużą wartość biologiczną (6). Według Smitha (cyt. 5) całkowita ilość paszy, jaka jest trawiona w żwaczu waha się od około 70—80% lub więcej dla niektórych diet do 30—40% dla innych.

Należy jeszcze wspomnieć o wynikach badań Lathana i wsp. (26), którzy wykazali, że pasze zbożowe powodują w żwaczu zmniejszenie liczby bakterii z rodzaju *Butyrivibrio*, natomiast wzrost liczby bakterii z rodzajów: *Selenomonas*, *Peptostreptococcus*, *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*. Można więc wnioskować, że wpływając na skład taksonomiczny mikroflory żwacza pasza może wpływać pośrednio na stopień aktywności proteolitycznej.

Stwierdzono, że aktywność proteolityczna bakterii żwacza w zawiesinie wodnej, badana *in vitro*, jest stymulowana przez jon żelazawy i cysteinę, podobnie jak to ma miejsce w odniesieniu do beztlenowych bakterii rodzaju *Clostridium* (cyt. 34). Stymulacja taka nie zachodzi z bezkomórkowymi przesącami tych bakterii (34). Uwzględniając wynik tych badań użyto w niniejszej pracy obu wymienionych stymulatorów proteolizy.

Wniosek

1. W miarę upływu czasu od nakarmienia zwierząt wzrasta procentowy udział bakterii proteolitycznych w ogólnej liczbie bakterii żwacza.

Piśmiennictwo

1. Annison E. F.: *Biochem. J.* 64, 705, 1956.
2. Blackburn T. H.: W: *Physiology of digestion in the ruminant*. R. W. Dougherty ed., Butterworth, London 1965, s. 322.
3. Blackburn T. H., Hobson P. N.: *J. gen. Microbiol.* 22, 272, 1960.
4. Blackburn T. H., Hobson P. N.: *J. gen. Microbiol.* 29, 69, 1962.
5. Bryant M. P.: *Bacteriol. Rev.* 23, 125, 1959.
6. Bryant M. P.: W: *Duke's physiology of domestic animals*. M. S. Swenson ed., Cornell Univ. Press, Ithaca and London, 1977, s. 287.
7. Bryant M. P., Doetsch R. N.: *J. Dairy Sci.* 37, 1176, 1954.
8. Bryant M. P., Robinson I. M.: *J. Dairy Sci.* 44, 1446, 1961.
9. Bryant M. P., Small N.: *J. Bacteriol.* 72, 16, 1956.
10. Bryant M. P., Small N.: *J. Bacteriol.* 72, 22, 1956.
11. Bryant M. P., Small N., Bouma C., Chu H.: *J. Bacteriol.* 76, 15, 1958.
12. Clarke R. T. J., Bauchop T.: W: *Microbial ecology of the gut*. Academic Press, New York 1977, s. 1—19.
13. Dejneka J., Zięba D.: *Weterynaria*, Wrocław 19, 177, 1965.
14. Ewy Z.: *Zarys fizjologii zwierząt*. PWN, 1976.
15. Fulghum R. S., Moore W. E. C.: *J. Bacteriol.* 83, 808, 1963.
16. Geisecke D.: *Zbl. Bakt. I Orig.* 186, 170, 1962.
17. Hamlin L. J., Hungate R. E.: *J. Bacteriol.* 72, 548, 1956.
18. Henderickx H.: *Archs. Int. Physiol. Biochim.* 69, 449, 1961.
19. Henderickx H., Baert L.: *Verslagen over Navorsingen*, I W.O.N.L. 28, 61, 1962.
20. Henderickx H., Martin J.: *Compt. Rend. Rech. IRSIA. Brussels* 31, 7, 1963.
21. Huhtanen C. N., Gall L. S.: *J. Bacteriol.* 65, 554, 1953.
22. Hungate R. E.: *Bacteriol. Rev.* 14, 1, 1950.
23. Hungate R. E.: *Can. J. Microbiol.* 3, 289, 1957.
24. Hungate R. E.: *The rumen and its microbes*. Academic Press, New York 1966.
25. Hungate R. E.: W: *Methods in microbiology*. J. R. Norms and D. W. Ribbons eds., Academic Press, London and New York 1969, tom 3B, s. 117—132.
26. Lathan N. J., Sharpe M. S., Sutton J. D.: *J. Bacteriol.* 34, 425, 1971.
27. Mangan J. L.: *Br. J. Nutr.* 27, 261, 1972.
28. Mann S. O., Masson F. M., Oxford A. E.: *J. gen. Microbiol.* 10, 142, 1954.
29. Mc Donald J. W., Hall R. J.: *Biochem. J.* 67, 400, 1959.
30. Miller T. L., Wolin M. J.: *Appl. Microbiol.* 27, 985, 1974.
31. Nugent J. H. A., Mangan J. L.: *Br. J. Nutr.* 46, 39, 1981.
32. Paynter M. J. B., Hungate R. E.: *J. Bacteriol.* 95, 1943, 1968.
33. Rył R.: *Normy żywienia zwierząt gospodarskich*. PWRiL 1981.
34. Warner A. C. I.: *J. gen. Microbiol.* 14, 749, 1956.
35. Wolfe R. S.: *Adv. Microbiol. Physiol.* 6, 107, 1971.
36. Zawadzki Z., Zawadzki W.: *Biul. XVI Zjazdu PTF*, Katowice, 396, 1984.

Adres autora: doc. dr habil. Zdzisław Zawadzki, ul. Dąbrowska 35/1, 50-306 Wrocław

Завадский З., Завадский В. — Протеолитические свойства микрофлоры рубца

Исследования провели на 3 коровах голштейнской породы возрастом 3 лет, кормленных в 7.30 и 19.30 кукурузным шротом и сеном из люцерны согласно нормам кормления. От всех коров брали через вложенные во время операции канюли в жвач проб — 4 раза за день. Время взятия проб и их исследований охватывало в общем 30 дней, с тем, что его разделили на 3 периода по 10 дней, применяя 14-дневные перерывы между I и II периодами, а также II и III. Опыт провели с сохранением анаэробных условий в атмосфере 100% (свободного от O₂) газового CO₂. Определили процентную долю протеолитических бактерий в составе бактериальной флоры содержимого рубца коров, а сверх того выборочно идентифицировали таксономически изолированные штаммы протеолитических бактерий.

Отметили, что по мере влияния времени росла от 36,9 до 42,3% доля протеолитических бактерий в общем числе всех анаэробных бактерий, изолированных из содержимого рубца коров.

Zawadzki Z., Zawadzki W. — Proteolytic properties of the rumen microflora

The experiments were performed on 3 Holstein cows aging 3 years fed at 7³⁰ and 19³⁰ ground corn and alfalfa hay according to the feeding standards. The samples of the rumen content were taken four times daily by surgical cannulation of the rumen. Thirty days time of sampling was divided into three 10 days periods with two weeks interruptions between the 1st and the 2nd, and the 2nd and the 3rd interval. The experiments were performed in anaerobic conditions — 100% of CO₂ free of oxygen. There was determined a percent of proteolytic bacteria in the rumen flora, and haphazardly the isolated proteolytic bacteria were identified. It was found that along with time increased from 36.9% to 42.3% the participation of proteolytic bacteria in a whole number of anaerobic bacteria isolated from the rumen content of cows.