

JERZY PIOTROWSKI

Zakład Hodowli Doświadczalnej Zwierząt PAN

## NIEKTÓRE METODY BADAWCZE TYPU „IN VITRO” W ZASTOSOWANIU DO PROCESÓW TRAWIENNYCH W PRZEDŻOŁĄDKACH PRZEŻUWACZY

Stosowanie w fizjologii badań w warunkach *in vitro* nie stanowi w chwili obecnej żadnej rewelacji. Co więcej, eksperymenty tego typu składają się dzisiaj na silnie rozbudowaną gałąź doświadczalnictwa, której zadaniem jest rozwiązywanie przede wszystkim zagadnień teoretycznych. W odniesieniu do badań trawienia u zwierząt prace te grają rolę stosunkowo bardzo poważną, służąc jako metoda poznania wielu procesów zachodzących w przewodzie pokarmowym.

Szczególnie zjawiska zachodzące w przewodzie pokarmowym przeżuwaczy pod wpływem bytujących w nim mikroorganizmów były i są w dalszym ciągu przedmiotem nieustannych i wnikliwych badań. W tym wypadku omawiana metoda badawcza polega najczęściej bądź na oczyszczeniu treści pokarmowej zalegającej żwacz (rzadziej czepiec lub nawet księgi) z grubszych cząstek paszy i otrzymaniu tzw. płynu żwaczowego (który zawiera pełny komplet drobnoustrojów, pierwotniaki, a także produkty ich przemiany materii i drobne części paszy), bądź też na mechanicznym wyizolowaniu drobnoustrojów z treści pokarmowej w drodze sporządzenia tzw. przemytej wodnej zawiesiny bakterii. Otrzymane w ten sposób płyny wyjściowe przenosi się do odpowiednio spreparowanego środowiska sztucznego i śledzi zmiany zachodzące w tym środowisku pod wpływem ich różnokierunkowej aktywności. Środowisko takie pod względem temperatury, pH, warunków anaerobiozy itd. zbliżone jest możliwie jak najbardziej do warunków panujących *in vivo* w danym przedżołądku — stąd nazwa „sztuczny żwacz”. Pozostałe czynniki środowiska sztucznego — jak obecność i stężenie składników mineralnych i organicznych bywają zazwyczaj zmienne i zależne od celu, w którym przeprowadza się *in vitro* dany eksperyment.

Oczywistą jest rzeczą, że w zależności od komponentów sztucznego środowiska i ich wzajemnych proporcji inna będzie każdorazowo reakcja drobnoustrojów, co więcej — inna będzie reakcja poszczególnych ich grup. Taka czy inna reakcja mikroorganizmów przeniesionych do warunków sztucznych, a więc zmiany, które zajdą w tym środowisku pod ich

wpływem, mogą być (oczywiście tylko do pewnego stopnia) utożsamiane ze zjawiskami, które zaszłyby w podobnych warunkach *in vivo*.

W doświadczeniach *in vitro* obejmujących badania trawienia w przedżołądkach u przeżuwaczy problemem opracowywanym najczęściej jest ustosunkowanie się mikroorganizmów zwacza do danej paszy lub grupy pasz wprowadzanych w różnej postaci i ilości wobec najrozmaitszych dodatków mineralnych i organicznych. Dodatki te stymulują lub hamują typową działalność poszczególnych grup drobnoustrojów w stosunku do wprowadzonych pasz i odwrotnie. Pozwala to na wyciąganie wniosków odnośnie zapotrzebowania mikroorganizmów w stosunku do środowiska oraz na dokładne prześledzenie zmian zachodzących pod ich wpływem.

Jak każda metoda badawcza, tak i doświadczenia typu *in vitro* posiadają, oprócz bezspornych stron dodatnich, sporo mankamentów.

Poważną korzyścią płynącą z prowadzenia omawianych eksperymentów jest ogromne uproszczenie strony organizacyjnej i poważne obniżenie kosztów. Ponadto, wobec prowadzenia prac w warunkach laboratoryjnych, istnieje możliwość dokonania w krótkim czasie dowolnej liczby powtórzeń i zachowanie dużej precyzji i dokładności. Co więcej, przebadanie można bardziej wszechstronnie przebieg poszczególnych zjawisk dzięki możliwości ograniczenia liczby czynników zmiennych, które mogą zaciemniać i zniekształcać wyniki.

Do stron ujemnych omawianej metody należy przede wszystkim ograniczona reprezentatywność uzyskanych rezultatów. Nigdy nie istnieje pełna gwarancja, że zjawisko nawet kilkakrotnie stwierdzone *in vitro* ma w warunkach naturalnych przebieg identyczny. Przewód pokarmowy, a szczególnie przedżołądki, nie stanowią układu zamkniętego i w warunkach naturalnych obserwuje się tam równoległy przebieg kilkudziesięciu odrębnych procesów, które pozostają w mniej lub bardziej ścisłej od siebie zależności. Nie wszystkie z nich można odtworzyć *in vitro* i nie zawsze można zapewnić odpowiednie warunki dla ich normalnego przebiegu. Wynika z tego konieczność upraszczania szeregu zjawisk, co rzucać może na słuszność wyciąganych wniosków. Ponadto, w wyniku przetrzymywania drobnoustrojów w środowisku sztucznym przez dłuższy okres czasu, mogą pojawiać się tam całkowicie nowe grupy bakterii nie spotykane w warunkach naturalnych w zwaczu.

Z tego co zostało do tej chwili powiedziane wynika jasno, że wszelkie dane otrzymane *in vitro* w stosunku do drobnoustrojów zwacza powinny być możliwie dokładnie sprawdzane na zwierzętach żywych. Oczywiście nie może to stanowić zasadniczego kontrargumentu w stosunku do celowości prowadzenia tego typu obserwacji. Wiele zjawisk i faktów, których istnienie i przebieg pozostałyby być może do dziś nie zauważone w warunkach naturalnych, wyjaśniono i zinterpretowano na podstawie doświad-

czeń z wyizolowanymi z przewodu pokarmowego przeżuwacza drobno-ustrojami.

Na przestrzeni wielu lat metodyka postępowania przy przeprowadzaniu doświadczeń *in vitro* w stosunku do treści żwacza ulegała najrozmaitszym zmianom. Stosowano najrozmaitsze z punktu widzenia technicznego urządzenia, które w mniejszym lub większym stopniu upodobnić miały środowisko spreparowane sztucznie do warunków naturalnych. Trzeba pamiętać, że metoda prowadzenia doświadczeń *in vitro* w stosunku do treści żwacza nie stanowiła do niedawna osobnego problemu badawczego. Nie ukazywały się prace, których celem byłoby przeanalizowanie strony metodycznej i technicznej. Dopiero w latach powojennych pojawia się kilkanaście publikacji zawierających dokładny opis urządzeń, których autorzy proponują wniesienie takich czy innych ulepszeń technicznych. W chwili obecnej istnieje kilka metod postępowania stosowanych, rzecz jasna, w całym szeregu wariantów. Ponadto, w dalszym ciągu pracuje się nad wprowadzeniem całkiem nowych koncepcji, idąc naprzód wraz z rozwojem nauki i techniki w ogóle. W pracy niniejszej omówiono dwie, najbardziej rozpowszechnione i stosunkowo technicznie najprostsze metody.

Pierwsza ze wspomnianych dwóch metod przeprowadzania doświadczeń *in vitro* polega w zasadzie na badaniu poszczególnych procesów w oparciu o płyn żwacza pobrany bezpośrednio po przesączeniu treści pokarmowej przez odpowiednie sączki, a więc zawierający w zasadzie „wszystko”, z wyjątkiem dużych cząstek paszy. Metoda ta nosi ogólną nazwę „sztucznego żwacza” (artificial rumen). Najbardziej typowe jest w tym względzie postępowanie opracowane przez Burroughs'a i współpracowników w roku 1950 (1, 2).

Tak zwany „sztuczny żwacz” składa się w tym wypadku z kompletu 6 butli szklanych o pojemności 600 ml każda. Butle zaopatrzone są w korki posiadające po trzy otwory. Pierwszy służy do wprowadzania dwutlenku węgla. Rurka znajdująca się w tym otworze dochodzi aż do dna butli. Przez drugi otwór przechodzi rurka wyprowadzająca CO<sub>2</sub> po przemyciu zawartości naczynia. Trzeci otwór zamknięty korkiem przeznaczony jest do regulowania pH w trakcie doświadczenia za pomocą dodawania roztworu węglanu sodu. Źródłem CO<sub>2</sub> jest butla ze sprężonym gazem zaopatrzona w reduktor. Dwutlenek węgla przepływa przez naczynia przez cały okres trwania eksperymentu w postaci pojedynczych pęcherzyków. Pozwala to na zachowanie warunków beztlenowych i powoduje jednocześnie mieszanie zawartości butli. Naczynia zanurzone są w łaźni wodnej o temperaturze 40°C.

Płyn żwacza stanowiący inokulat otrzymuje się w sposób następujący: sondą lub przez przetokę pobiera się na czczo (po upływie 16 godzin od

ostatniego odpasu) treść żwacza i sączy natychmiast przez cztery warstwy muślinu lub gazy młynarskiej. Po przesączeniu przemywa się otrzymany płyn ostrym strumieniem CO<sub>2</sub>. Przed dodaniem do poszczególnych butli płynu otrzymanego w powyższy sposób naczynia te napełnia się roztworem soli mineralnych w ilości 50 ml. Skład roztworu jest następujący:

fosforan sodu	52,50 g	chlórek wapnia	0,75 g
węglan sodu	52,50 „	siarczan żelaza	0,15 „
siarczan amonu	37,50 „	siarczan cynku	0,08 „
chlórek potasu	7,50 „	siarczan miedzi	0,04 „
chlórek sodu	7,50 „	chlórek kobaltu	0,02 „
siarczan magnezu	2,25 „	woda destylowana	2,00 l

Następnie do każdej butli dodaje się 1 g rozartej bibuły filtracyjnej, która spełnia rolę źródła błonnika rozkładanego następnie przez mikroorganizmy. Zawartość naczynia dopełnia się wodą destylowaną do objętości 350 ml i przemywa ostrym strumieniem CO<sub>2</sub> przez 30 minut. Po wstawieniu naczyń do łaźni wodnej o temperaturze 40°C wprowadza się do nich po 140 ml otrzymanego uprzednio płynu żwacza, po czym raz jeszcze przepłukuje strumieniem CO<sub>2</sub> przez 15 minut. Sprawdza się pH zawartości naczynia i w razie potrzeby doprowadza się je do wartości 6,2—6,8 za pomocą 0,5 M roztworu węglanu sodu. Do tak przyrządzonego medium dodawać można różne składniki pokarmowe (np. pasze) badając po upływie 36 godzin stopień rozkładu błonnika zawartego w bibule filtracyjnej traktując to jako wskaźnik celulolitycznej aktywności mikroorganizmów.

Po zakończeniu pierwszego 36-godzinnego okresu inkubacji połowę zawartości butli poddaje się odpowiednim analizom chemicznym. Pozostała, druga połowa płynu służy jako inokulat w stosunku do następnych doświadczeń. Metoda inokulowania butli w następnym okresie połową zawartości naczynia z okresu poprzedniego grozi stopniowym spadkiem aktywności drobnoustrojów w związku z długim utrzymywaniem ich w warunkach sztucznych. Autorzy (1) przeprowadzili doświadczenia dotyczące intensywności rozkładu błonnika w kolejnych, następujących bezpośrednio po sobie okresach inkubacji przy zastosowaniu różnych dodatków stymulujących działalność drobnoustrojów. Wyniki podaje tabela 1.

Jak widać, przy zastosowaniu jedynego dodatku do płynu żwacza, jakim jest siarczan amonu, następuje spadek strawności błonnika już w drugim okresie inkubacji. Przy dodaniu popiołu z lucerny spadek ten zaznacza się mniej intensywnie. Najdłużej wysoka strawność błonnika utrzymuje się przy zastosowaniu opisanego poprzednio roztworu soli mineralnych. Z tego też względu dodatek tego roztworu stanowi czynnik

niezbędny przy przeprowadzaniu inkubacji wieloetapowych, nie zapobiega jednak możliwości pojawienia się nietypowej mikroflory, a więc grozi popełnieniem błędów przy wyciąganiu wniosków na podstawie wyników uzyskanych w dalszych okresach.

Tabela 1

Okres inkubacji	Zawartość butli, w których dokonywano inkubacji		
	płyn żwacza, bibuła filtracyjna, siarczan amonu	płyn żwacza, bibuła filtracyjna, siarczan amonu, popiół z lucerny	płyn żwacza, bibuła filtracyjna, złożony roztwór soli mineralnych*
	strawność błonnika bibuły filtracyjnej w procentach		
1	68	81	77
2	9	24	41
3	6	7	56
4	—2	0	75
5	2	2	7

U w a g a : \* skład podany poprzednio

Opisana powyżej metodyka Burroughs'a może być w rozmaity sposób modyfikowana. Stosowano np. azot jako gaz utrzymujący anaerobiozę, skracano czas trwania pojedynczej inkubacji do 12 godzin, wprowadzano zamiast złożonego roztworu soli mineralnych bufor fosforanowy o pH 6,1 itd. Modyfikacje te uzależnione są zawsze od celu, w którym przeprowadzano obserwacje (rozkład błonnika, powstawanie kwasów tłuszczowych, synteza białka itp.). W zależności jednak od wprowadzanych zmian uzyskiwano zawsze bardzo różne wyniki, nawet w wypadku najprostszego do śledzenia *in vitro* zjawiska, jakim jest rozkład celulozy. Co więcej, nawet przy kilkakrotnym powtarzaniu doświadczeń w oparciu o jedną i tę samą metodę istnieje często trudność w otrzymaniu nie tylko analogicznych, lecz nawet zbliżonych wyników.

Metodyka Burroughs'a stosowana jest przez szereg autorów do chwili obecnej. Drugą metodą „sztucznego żwacza” jest używanie zamiast naczyń szklanych — półprzepuszczalnych błon, np. worków celofanowych. Typową metodę tego rodzaju proponował w roku 1949 Louw (4), później zaś, w roku 1954 Huhtanen, Saunders i Gall (3). Opracowali oni tzw. miniaturowy sztuczny żwacz, którego opis ze względu na bardzo prostą konstrukcję podano poniżej.

W szklanych słoiczkach zawierających po 100 ml roztworu soli mineralnych (w niektórych wypadkach stosowano wodę destylowaną) o składzie zbliżonym do proponowanego przez Burroughs'a zawieszano wore-

czki celofanowe o pojemności 10 ml. Do woreczków wprowadza się po 10 ml płynu żwacza otrzymanego przez sączenie przez muślin i 500 mg mielonych liści siana lucerny. Płyn, w którym zawieszono woreczek, przemywa się strumieniem CO<sub>2</sub> do chwili osiągnięcia pH = 6,6—7,0. Górną, otwartą krawędź woreczka zamyka się przez „przycięcie” nakrętką od słoika. Naczynia umieszcza się następnie w termostacie w temperaturze 38°C. Po upływie 3 godzin od rozpoczęcia inkubacji odkręca się pokrywki słoiczeków celem odpuszczenia nagromadzonych gazów, po czym zakręca się je powtórnie wkręcając krawędź woreczka między nagwintowaną część słoika a przykrywkę. Czas trwania inkubacji wynosi od 16 do 24 godzin. Po upływie tego okresu czasu przerywa się proces i przeprowadza analizy zawartości pozostałej w woreczku.

Jak wynika z powyższego, zasadnicza różnica między opisanymi dwiema metodami „sztucznego żwacza” polega na stosowaniu w pierwszym wypadku naczyń szklanych, w drugim zaś — półprzepuszczalnej błony. Rola tej ostatniej polega na dopuszczeniu do ewentualnej wymiany między środowiskiem otaczającym (np. wodą) a zawartością woreczka. W tym przypadku konieczne jest przeprowadzanie analiz płynu, w którym zanurzone są woreczki. Metoda ta niewątpliwie góruje nad systemem inkubacji w naczyniach szklanych ze względu na uniemożliwienie koncentrowania się w woreczku produktów ubocznych fermentacji, których zbyt duże stężenie (powiększające się stopniowo w miarę upływu czasu inkubacji) może w zasadniczy sposób rzutować na przebieg samego procesu. Cytowany już poprzednio Louw (4) przeprowadził porównanie intensywności rozkładu błonnika *in vitro* przy zastosowaniu naczyń szklanych i worków półprzepuszczalnych (wszystkie czynniki środowiska sztucznego były w obu wypadkach jednakowe). Wyniki podaje tabela 2.

Tabela 2

	Inkubacja w butlach szklanych		Inkubacja w worku półprzepuszczalnym	
	początkowa zawartość błonnika w g	strawność błonnika w procentach	początkowa zawartość błonnika w g	strawność błonnika w procentach
Doświadczenie 1	11,89	42	11,89	58
Doświadczenie 2	11,58	43	11,58	67
Doświadczenie 3	19,36	58	19,36	68

Interesujące rozwiązanie techniczne „sztucznego żwacza” opracował w roku 1956 Warner (13). W dużym naczyniu szklanym wypełnionym złożonym roztworem soli mineralnych zawieszają się woreczki celofanowe zawierające płyn żwacza i badane substancje (w tym wypadku kazeinę). W górnej części woreczka znajduje się korek z trzema rurkami (wlot i wy-

lot dla CO<sub>2</sub>, oraz otwór dla pobierania prób i regulacji pH). Dwutlenek węgla po przemyciu zawartości woreczka wyprowadza się nie na zewnątrz lecz dodatkowo przez otaczający roztwór mineralny, którego obecność umożliwia wymianę w drodze dializy między zawartością woreczka a otaczającym płynem, co pozwala na dokładne śledzenie produktów pośrednich powstających przy rozkładzie kazeiny i dalszej dezaminacji aminokwasów. CO<sub>2</sub> przemywa cały układ utrzymując warunki anaerobiozy.

O ile w metodzie „sztucznego żwacza” płyn inokulujący zawiera wszystkie typowe czynniki treści żwacza z wyjątkiem większych cząstek paszy, o tyle druga metoda badań *in vitro* posługuje się wyłącznie drobnoustrojami występującymi w tym przedżoładku. Metoda ta, jak już poprzednio wspomniano, nosi nazwę „przemytej zawiesiny bakterii”. Przykładem zastosowania tej metody jest m. in. praca Cheng, Hall i Burroughs z roku 1955 (6). Zasadniczym celem stosowania wodnej zawiesiny drobnoustrojów jest otrzymanie możliwie czystej formy samych tylko bakterii żwacza, bez jakichkolwiek dodatkowych czynników występujących *in vivo* w żwaczu. Postępowanie w tym wypadku wygląda następująco:

Treść żwacza przesącza się kilkakrotnie przez gazę młynarską, następnie zaś wiruje z szybkością około 1200 obr./min. W ten sposób większość niestrawionych części paszy (które przeszły przez sącdek), jak i zawarte w płynie żwacza pierwotniaki, ulegają osadzeniu na dnie kuwety. Płyn znad osadu wiruje się następnie przez 20 minut z szybkością 5000 obr./min. Do powstałego w ten sposób osadu, zawierającego przede wszystkim bakterie, dodaje się wodę destylowaną lub bufor fosforanowy o pH = 7,0, po czym wiruje się ponownie przez 20 minut z szybkością 5000 obr./min. Wymienioną czynność powtarza się raz jeszcze. Ostatecznie uzyskany osad, który stanowią prawie wyłącznie same tylko bakterie, „rozpuszcza” się w złożonym z 11 komponentów roztworze mineralnym z dodatkiem mocznika. Płyn, będący już właściwą „zawiesiną bakterii”, przemywa się strumieniem CO<sub>2</sub> i sprowadza (jego pH do wartości = 7,0, dodając odpowiednią ilość węglanu sodu. Otrzymany w ten sposób płyn stanowi inokulat wyjściowy w stosunku do poszczególnych naczyń szklanych, w których przeprowadza się dalsze, właściwe obserwacje. Wymienieni autorzy (6) przeprowadzili eksperymenty nad wpływem poszczególnych czynników na aktywność celulolityczną bakterii żwacza. Badano m. in. wpływ pH na rozkład błonnika przez drobnoustroje (tabela 3).

Ponadto badano także wpływ ilości błonnika w roztworze inkubowanym na intensywność jego rozkładu (tabela 4).

Prócz tego autorzy stwierdzili, że najintensywniejszy rozkład błonnika następuje między 16 a 20 godziną inkubacji.

W roku 1958 Hubbert (11) i wsp. posługując się techniką przemytej zawiesiny bakterii badali wpływ stężenia poszczególnych składników

Tabela 3

pH środowiska <i>in vitro</i>	Strawność błonnika w %
5,6	30,3
6,0	47,8
6,4	55,1
6,8	64,8
7,2	65,4
7,6	63,2
8,0	56,8
8,4	52,5

Tabela 4

Zawartość błonnika w roztworze w %	Strawność błonnika w %
0,25	75,7
0,50	57,3
0,75	64,6
1,00	53,6

mineralnych na aktywność celulolityczną drobnoustrojów. Tabela 5 zawiera dane dotyczące optymalnego stężenia tych składników i stężeń toksycznych dla mikroorganizmów.

Tabela 5

Pierwiastek	Optymalne stężenie dla rozkładu błonnika (mikrogramy w ml)	Stężenie toksyczne dla mikroorganizmów (mikrogramy w ml)
Siarka	100—500	1 000
Magnez	20—160	320
Wapń	50—300	450
Żelazo	0—50	300
Mangan	0—160	320
Miedź	0—1	1,5
Kobalt	0—0,5	5
Cynk	0—0,05	5
Bor	0—0,000	0,5

Zacytowane wyniki wskazują na fakt ścisłej zależności przebiegu typowych procesów żwaczowych *in vitro* od czynników środowiska zewnętrznego. Ponadto, z całą wyrazistością występuje tu możliwość otrzymania w różnych wypadkach różnych wyników przy badaniu jednego i tego samego zjawiska. Wypływa stąd konieczność posługiwania się na szeroką skalę ujednoliconą metodyką, szczególnie zaś w wypadku prowadzenia *in vitro* badań mających ściślejszy związek z praktyką żywieniową, jak np. badanie wpływu poszczególnych pasz na procesy zachodzące w żwaczu i odwrotnie (1, 2, 7), badanie reakcji drobnoustrojów na pow-

szechnie zalecane dodatki antybiotyków, mikroelementów i produktów syntetycznych. W wypadku opisanej metody uzyskiwania inokulatu wyjściowego w drodze kilkakrotnego przemywania i wirowania zawiesiny bakterii — wydaje się celowe zastosowanie jej raczej do bakteriologicznego badania samych drobnoustrojów bytujących w żwaczu, jest ona bowiem o wiele bardziej sztuczna od „sztucznego żwacza” i odbiega bardzo poważnie od warunków normalnych dla bakterii. Przez samą bowiem czynność kilkakrotnego wirowania i przemywania otrzymuje się wprawdzie oczyszczoną w wysokim stopniu populację mikroorganizmów, jednak inokulat sporządzony w ten sposób nie zawiera pełnego kompletu czynników występujących w żwaczu *in vivo*, co zmniejsza dodatkowo możliwość przeprowadzania analogii między wynikami uzyskanymi *in vitro* a warunkami naturalnymi. Ponadto, w procesie frakcjonowanego przemywania drobnoustrojów tracą one w poważnym stopniu aktywność enzymatyczną, z drugiej jednak strony niebezpieczeństwo pojawienia się nietypowych szczepów bakterii (tak bardzo aktualne przy posługiwaniu się pełnym płynem żwacza) jest niewielkie wobec trudności w rozmnażaniu drobnoustrojów i stosunkowo krótkiego czasu trwania eksperymentu. Z tego też względu metoda przemytych zawiesin nadaje się przede wszystkim do badania biochemicznych reakcji rozkładu, w dużo mniejszym zaś stopniu do obserwacji zjawisk syntezy.

Skądinąd jednak metoda ta przedstawia sobą z innego punktu widzenia bardzo poważne osiągnięcie teoretyczne. Pozwala ona na studiowanie tych procesów mikrobiologicznych, które dzięki swej specyfice i małemu stosunkowo nasileniu mogą pozostawać nieuchwytnie w doświadczeniach ze „sztucznym żwaczem”. Jako przykład wymienić tu można prace dotyczące tzw. „niezidentyfikowanego czynnika celulolitycznego” (UCF), który zawarty w środowisku żwaczowym stymuluje rozkład błonnika przez mikroorganizmy. W roku 1955 Bentley i wsp. (12) stwierdził korzystny wpływ niektórych kwasów tłuszczowych *in vitro* na rozkład błonnika i wykazał, że szczególnie kwas walerianowy stymuluje ten proces. Ponadto w roku 1958 Cline (8) stwierdził, że kwas walerianowy jest szczególnie chętnie wychwytywany przez bakterie celulolityczne i stymuluje tym samym ich działalność. Podobnie Dehority (9) wykazał dodatni wpływ niektórych aminokwasów na rozkład celulozy przez bakterie w żwaczu (prolina, walina).

Jak już wspomniano, obie wymienione metody badań *in vitro* mniej lub bardziej odbiegają od warunków naturalnych, co zresztą jest nieuniknione. Na zakończenie, wydaje się celowe wspomnieć pokrótce o metodzie „sztucznego żwacza”, która bardziej od innych zbliżona jest do warunków przyżyciowych. Jest nią metoda „inkubacji ciągłej” opracowana w 1959 roku przez Stewarta i Warnera (10). Naczynie o pojemności

5,5 l, zaopatrzone w mieszkadło i utrzymywane w temperaturze 39°C, napełnia się kulturą bakterii i pierwotniaków pochodzących ze zwacza. Badane substancje wraz z niezbędnymi dodatkami mineralnymi wprowadzane są do naczynia w sposób ciągły (lub okresowo) w przeciętnej ilości 450 ml/godz. Naczynie opatrzone odpływem ciągłym, co ułatwia pobieranie próbek i reguluje ilość płynu w naczyniu. Autorzy, stosując opisany sposób do badania powstawania lotnych kwasów tłuszczowych, stwierdzili istnienie poważnych analogii z warunkami naturalnymi. Ponadto, pierwotniaki występujące *in vitro* wykazywały dużą ruchliwość i aktywność, co nie zdarzało się dotąd w żadnym poprzednim systemie „sztucznego zwacza”.

Nie jest zadaniem autora szczegółowe omawianie wszystkich opisanych w literaturze metod i koncepcji badań *in vitro* dotyczących mikroflory przedżołądków przeżuwaczy, ani też silenie się na opracowanie monografii tak obszernego zagadnienia, zwłaszcza że liczba odnośnych modyfikacji jest ogromna i powiększa się niemal z miesiąca na miesiąc. W Polsce obserwacje procesów trawiennych u przeżuwaczy na podstawie doświadczeń *in vitro* należą dziś jeszcze do rzadkości. Mimo jednak wielu mankamentów omawiana metoda zasługuje na szersze zainteresowanie, zwłaszcza że realizacja strony technicznej nie natrafia w warunkach laboratoryjnych na większe trudności.

#### LITERATURA

1. Burroughs W., Frank N. A., Gerlaugh P., Bethke R. M.: (1950). Journal of Nutrition, 40, 9.
2. Burroughs W., Headley H. G., Bethke R. M., Gerlaugh P.: (1950). Journal of Animal Science, 9, nr 4, 513.
3. Huhtanen C. N., Saunders R. K., Gall R. S.: (1954). Journal of Dairy Science, 37, nr 3, 328.
4. Louw J. G., Williams H. H., Maynard L. A.: (1949). Science, 110, 478.
5. Marston H. R.: (1948). Biochemical Journal, 42, 564.
6. Cheng E. W., Hall G., Burroughs W.: (1955). Journal of Dairy Science, 38, nr 11, 1225.
7. Lodge J. R., Miles J. T., Jacobson N. L.: (1954). Journal of Dairy Science, 37, nr 6.
8. Cline J. H., Hershberger T. V., Bentley O. G.: (1958). Journal of Animal Science, 17, 284.
9. Dehority B. A., Bentley O. G., Johnson R. R., Moxon A. L.: (1957). Journal of Animal Science, 16, 502.
10. Stewart D. G., Warner R. G.: (1959). Journal of Dairy Science, 42, 913.
11. Hubbert F., Cheng E., Burroughs W.: (1958). Journal of Animal Science, 17, 559.
12. Bentley O. G., Johnson R. R., Hershberger T. V., Cline J. H., Moxon A. L.: (1955). Journal of Nutrition, 57 389.
13. Warner A. C. I.: (1956). Journal of Gen. Microbiology, 5, 869.