

А. ИМШЕНЕЦКИЙ

**ОСАХАРИВАНИЕ КЛЕТЧАТКИ ТЕРМОФИЛЬНЫМИ БАКТЕРИЯМИ**

(Представлено академиком А. Н. Бахом 22 X 1938)

Повидимому целлюлоза является ферментом, встречающимся исключительно у бактерий и грибов, и только деятельностью этих организмов можно объяснить разрушение больших количеств клетчатки, происходящее в природе. В последнее время внимание микробиологов привлекают бактерии, сбраживающие целлюлозу при высоких температурах. Это связано с тем, что при термофильном брожении происходит быстрое разложение клетчатки с образованием спирта и летучих кислот. Однако наши представления об этом биохимическом процессе базируются на изучении смешанных культур, и физиология целлюлозных бактерий остается неясной.

Естественно, что накопление вышеуказанных продуктов может произойти только после появления в среде растворимых углеводов и сбраживания их целлюлозными и сопутствующими микроорганизмами. Такой гидролиз клетчатки в культурах термофильных бактерий должен происходить скорее, чем при развитии мезофильных форм, разрушающих клетчатку гораздо медленнее. Можно было также предполагать, что в этих условиях для накопления сахаров в среде добавление к культуре антисептиков, парализующих сбраживающую и не влияющих на гидролизующую способность бактерий, явится излишним.

Исследования, результаты которых изложены ниже, были проведены с выделенной мною чистой культурой анаэробной бактерии, развивающейся на целлюлозе при 60°.

Изолированные бактерии представляют собой палочки, образующие терминальные споры. Развиваясь в анаэробных условиях на кусочках фильтровальной бумаги, они окрашивают ее в желтый цвет и сбраживают целлюлозу в течение 4—5 дней. После окончания брожения на дне пробирки остается аморфная желтая масса, состоящая из неразложившейся клетчатки и бактериальных клеток. Бациллы не развиваются на минеральных средах с клетчаткой, применяемых обычно для получения элективных культур целлюлозных бактерий. Брожение клетчатки на синтетических средах возможно только после добавления к ним сложных азотистых соединений. Хорошее развитие происходит при дополнительном внесении в среду альбумина, кусочков внутренних органов животных, мясопептонного бульона, фекального экстракта или отвара из клеток различных бактерий. Минеральный азот бактерии не ассимилируют также после добавления к среде биоса (дрожжи). По своему систематическому по-

ложению этот вид наиболее близок к *Bacillus cellulosaе dissolvens*. Детальное описание методов выделения чистых культур и биологии микроорганизмов будет дано в другой статье.

При изучении способности бактерий осахаривать клетчатку их культивирование производилось на среде следующего состава:  $\text{NaNH}_4\text{HPO}_4$   $4\text{H}_2\text{O}$  1.5  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5  $\text{MgSO}_4$  0.4  $\text{NaCl}$  0.1  $\text{MnSO}_4$  и  $\text{FeSO}_4$  по 1 капле 1% раствора, пептон 5.0  $\text{CaCO}_3$  20.0. Воды водопроводной 1000.0. К 750 см<sup>3</sup> этой среды добавлялся 10% водный фекальный экстракт в количестве 250 см<sup>3</sup>; рН среды 7.4.

В круглые колбы вместимостью в 300 см<sup>3</sup> вносились навеска высушенной клетчатки (кусочки фильтровальной бумаги) и наливалось 250 см<sup>3</sup> среды. После стерилизации и заражения колб 25 см<sup>3</sup> старой культуры поверхность среды заливалась высоким слоем стерильного вазелинового масла. Колбы выдерживались при 60°. Брожение обычно начиналось на следующий день после посева, но не всегда протекало одинаково интенсивно во всех колбах. Этим объясняется различный процент разложения клетчатки в параллельных опытах.

Продолжительность опытов варьировала от 4 до 17 дней. Результаты исследований учитывались следующим образом. С поверхности среды удалялось вазелиновое масло, некоторое количество культуры фильтровалось, и в фильтрате определялся сахар по Бертрану. Затем в колбы добавлялась горячая 1% соляная кислота для растворения мела, и фильтровалось уже все содержимое колбы. Оставшаяся на фильтре неразложенная клетчатка промывалась водой, высушивалась и взвешивалась. Таким путем устанавливалось количество разрушенной клетчатки.

Результаты двух серий таких опытов сведены в таблице.

Накопление сахара в культурах термофильных целлюлозных бактерий

Продолжительность опыта (в днях) . . . . .	4	4	8	8	12	13	16	17
№ колб . . . . .	1	5	2	6	7	3	8	4
Навеска клетчатки (в г) . . . . .	5.33	5.24	5.33	5.23	5.27	5.33	5.25	5.33
Разложение клетчатки (в г) . . . . .	1.17	0.30	1.60	1.66	2.29	2.05	2.51	1.91
Разложение клетчатки (в %) . . . . .	21.95	5.72	30.01	31.74	43.47	38.46	47.81	35.83
Сахар в среде (в г) . . . . .	0.47	0.19	0.85	0.77	1.56	1.53	1.19	1.09
Сахар в среде (в %) . . . . .	0.17	0.07	0.31	0.28	0.42	0.41	0.45	0.41
Отношение сахара к разложенной клетчатке (в %) . . . . .	40.17	63.33	53.12	46.38	68.12	74.63	47.41	57.07

Анализ этих данных позволяет сделать следующие выводы:

1. Термофильные бактерии вызывают гидролиз целлюлозы, и в культурах независимо от их возраста постоянно может быть обнаружен сахар.
2. Между разложением клетчатки и образованием сахара существует прямая зависимость.
3. Образующийся сахар в различных опытах сбрасывается не в одинаковой степени. Поэтому отношение накапливающегося сахара к разрушенной целлюлозе колеблется в довольно широких пределах (от 40.17% до 74.63%).

После добавления к фильтрату содержимого колб солянокислого фенилгидразина и уксуснокислого натрия были получены кристаллы фенилозазона глюкозы с точкой плавления 204—205°. В связи с этим следовало ожидать, что не только клетчатка, но и глюкоза может служить источником энергии для анаэробных бактерий. Посевы на вышеуказанную среду с добавлением 1% глюкозы это подтвердили—бактерии в этих условиях развиваются и сбрасывают глюкозу. Таким образом брожение клетчатки

фактически сводится к ферментации глюкозы и, возможно, некоторых других растворимых углеводов, образующихся в результате гидролиза целлюлозы. Но только незначительная часть этих углеводов сбраживается целлюлозными бактериями, остальное же количество остается в среде неиспользованным. Естественно, что в смешанных культурах этот сахар потребляется сопутствующими бактериями, и в зависимости от физиологических особенностей симбионтов в среде накапливаются различные продукты и в различных соотношениях. Между прочим по моим наблюдениям отсутствие или значительное уменьшение редуцирующих веществ в культуре всегда указывает на загрязнение ее посторонними микроорганизмами, утилизирующими сахар.

Для биолога несомненный интерес представляет тот факт, что гидролиз целлюлозы происходит значительно энергичнее, чем последующее сбраживание растворимых углеводов. В некоторых опытах только около 25% разложившейся клетчатки используется бактериями в качестве источника энергии, остальное количество также подвергается гидролизу, но накапливается в виде сахаров. Здесь можно высказать следующее предположение. Анаэробные целлюлозные бактерии относятся к микроорганизмам, постоянно существующим в природе в необычайно тесных симбиотических отношениях с другими бактериями (возможно, что именно поэтому их так трудно изолировать в чистой культуре). Используя глюкозу, сопутствующие микробы в свою очередь оказывают благоприятное влияние на развитие целлюлозных бактерий, накапливая необходимый органический азот, снижая потенциал среды и потребляя токсичные продукты жизнедеятельности. В правильности этой предпосылки можно убедиться, сравнивая интенсивность брожения клетчатки в чистых и смешанных культурах. В последнем случае оно протекает значительно скорее. Изолируя бактерии в чистой культуре, мы нарушаем исторически сложившийся симбиоз и создаем необычные для целлюлозных бактерий условия, при которых образующиеся углеводы не потребляются бактериями-спутниками.

Институт микробиологии.  
Академия Наук СССР.

Поступило  
22 X 1938.