

ВЛИЯНИЕ pH НА РАЗВИТИЕ НЕКОТОРЫХ ЦЕЛЛЮЛОЗОРАЗЛАГАЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Й. СЕГИ

Научно-исследовательский институт почвоведения и агрохимии Академии Наук Венгрии, Будапешт

Главным прямым или косвенным источником энергии для большинства почвенных микроорганизмов являются растительные остатки. По *Фёдорову* растительные корневые и пожнивные остатки, остающиеся в почве после уборки урожая на 40—60% состоят из целлюлозы. Из этого видно, что биологическое разложение целлюлозы играет исключительно большую роль в биологических процессах, протекающих в почве. Как известно, в разложении целлюлозы участвуют три основных группы микроорганизмов: бактерии, лучистые грибы и микроскопические грибы. Хотя в литературе в связи с биологической минерализацией целлюлозы опубликовано уже много сообщений, большинство из них имело предметом целлюлозоразлагающие бактерии и значительно меньше работ опубликовано в связи с целлюлозоразлагающими актиномицетами и микроскопическими грибами. Уже *Краинску* наблюдал, что ряд выделенных из почвы штаммов лучистых грибов способен интенсивно развиваться на минеральной питательной среде, содержащей целлюлозу. Данные *Ваксман, Jensen, Навмсен, Красильникова, Дин Цзянь* также подтверждают роль, которую играют лучистые грибы в разложении целлюлозы микроорганизмами. Микроскопические грибы очень широко распространены в природе и они, как это определили *Тыве, Кеунан* и сотр., *Захаров, Еггинс* и *Рун* и др. чрезвычайно интенсивно разлагают целлюлозу.

Экспериментальная часть

В ходе проведенных исследований была поставлена цель собрать данные о том, с какой интенсивностью штаммы лучистых и микроскопических грибов, выделенные из венгерских почв способны использовать целлюлозу как единственный источник энергии, кроме того изучали влияние реакции питательной среды на процесс разложения целлюлозы.

При выделении лучистых грибов пользовались казеино-глюкозо-агаровой питательной средой Йенсена, а микроскопических грибов — целлюлозосодержащей питательной средой Ваксмана. Очищенные штаммы привили на кремлоксигельные пластинки, пропитанные минеральной питательной средой Виноградского, которые предварительно накрывали кружочком фильтровальной бумаги. Культуры инкубировали в термостате при температуре 28° С. По истечении 1—2 недель целлюлозоразлагающие лучистые и микроскопические грибы интенсивно росли на кружочке фильтровальной

бумаги (Рис. 1). Определение выделенных таким путем микроорганизмов производили частично до видов, частично до родов, или серий. Определение лучистых грибов проводили при помощи определительного ключа, описанного Szabó и Marton.

Для изучения целлюлозоразлагающей активности культур применялся крахмалистый питательный раствор для лучистых грибов описанный Вакманом, с той разницей, что вместо 2% крахмала в каждую колбу

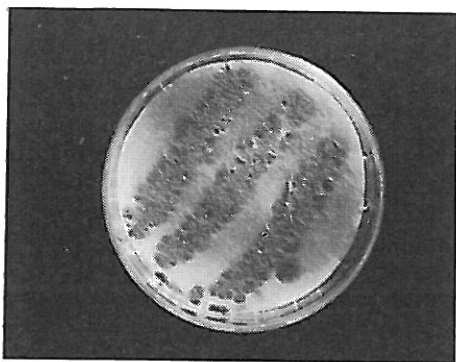


Рис. 1.

Развитие актиномицета № 1₅₁, разлагающего клетчатку, на фильтрованной бумаге. Fotó: Lőrinczy

вносили эквивалентное по весу количество молотой фильтровальной бумаги. Кроме того, концентрацию NaNO_3 , использованной в качестве источника азота увеличили до соотношения C:N 20:1. Инкубацию проводили в колбах Эрленмайера емкостью в 250 мл, содержащих по 100 мл питательной среды в трех повторениях. Реакцию питательной среды при помощи М/30 фосфатного буферного раствора установили на pH 5, 6, 7, и 8, pH 9 установили прибавлением буферного раствора бората натрия. После того как прививка исследуемых микроорганизмов на питательную среду была поведена, ватные пробки заменили изготовленными для этой цели резиновыми пробками с

двумя просверленными в них отверстиями в которые вставляли по одной короткой и одной более длинной стеклянной трубке. Стеклянные трубки над пробкой отогнуты под прямым углом и после колена расширяются в шарообразные утолщения диаметром в 10 мм. Эти шары заполнены ватой в целях фильтрации зародышей микроорганизмов из воздуха. Приготовленные таким путем пробки были завернуты в пергаментную бумагу, стерилизованы и после этого использованы для закрытия культур.

При помощи электрического мембранного насоса малой мощности через культуры медленно пропускали пузырьки воздуха. Чистота культур обеспечивалась с одной стороны ватным фильтром, помещенным в стеклянную трубку, а с другой стороны колбой содержащей 1-нормальный раствор NaOH. Инкубирование при постоянном продувании воздуха проводилось в течение 12 недель. По истечении этого срока питательный раствор отделили от оставшейся целлюлозы и мицелия микроорганизмов при помощи стеклянного фильтра G—4. После этого отфильтрованный раствор, перед дальнейшим использованием для анализов стерилизовали путем пропускания через фильтр Seitz EK.

Количество использованной целлюлозы определяли путем вычитания оставшейся неиспользованной в питательном растворе целлюлозы из количества первоначально заложенной. Оставшуюся неразложенной целлюлозу промывали 0,2% раствором соды, горячей водой, затем 10%-ной соляной кислотой и опять горячей водой. В ходе промывки удалили слизистые вещества микроорганизмов и неорганические соли питательной среды. После этого целлюлозу высушивали до постоянного веса и взвешивали на анали-

тических весах. Количество оставшегося вместе с целлюлозой мицелия определяли следующим образом: взвешенную целлюлозу сжигали по методу Кьелдаля и из установленного содержания азота вычисляли вес мицелия. Результаты анализа приведены в Табл. 1.

Во второй части работы изучали то, насколько способность штаммов лучистых грибов и грибов, участвовавших в опыте, усваивать глюкозу при различных значениях рН похожа, или отклоняется от усвоения целлюлозы в подобных условиях. В целях решения этого вопроса проведен опыт на

Таблица 1.
Разложение целлюлозы при различных значениях рН

	(1) Наименование микроорганизмов	(2) Вес разложенной целлюлозы									
		рН 5		рН 6		рН 7		рН 8		рН 9	
		мг	%	мг	%	мг	%	мг	%	мг	%
лучистые грибы	<i>Str. flavovirens</i> (S ₂₄)	—	—	773	38,6	1017	50,8	—	—	—	—
	<i>Str. flavovirens</i> (S ₉)	—	—	753	37,6	414	20,7	—	—	—	—
	<i>Str. olivaceus</i> (S _{2a})	—	—	—	—	14	0,7	—	—	—	—
	<i>Act. roseolus</i> (M ₆)	—	—	749	37,4	691	34,5	184	9,2	—	—
	<i>Str. oidiosporus</i> (M ₂₀)	—	—	881	44,0	863	43,1	—	—	—	—
	<i>Str. antibioticus</i> (M ₆₀)	897	44,8	1175	58,7	499	28,9	—	—	—	—
	Сер: я: <i>Albus</i> (I ₄₀)	—	—	—	—	263	13,1	202	10,1	—	—
	Серия: <i>Albosporus</i> (I ₉)	—	—	76	3,8	670	33,5	322	16,1	—	—
	Серия: <i>Collinus</i> (I ₅₁)	—	—	62	3,1	343	17,1	373	18,6	—	—
микроскопические грибы	<i>Aspergillus ustus</i>	1229	61,4	1492	74,6	1391	69,5	1045	52,2	—	—
	<i>Pen. pallidum</i>	1126	56,3	1310	65,1	1252	62,6	824	41,2	—	—
	<i>Stachybotris atra</i>	1164	58,2	1365	68,2	1157	57,8	863	34,1	—	—
	<i>Penicillium sp.</i> (K 9)	1609	82,5	1472	73,6	1170	58,5	928	46,4	—	—
	<i>Trichoderma sp.</i>	1650	82,5	1627	81,3	1515	75,7	268	13,8	—	—
	<i>Humicola sp.</i> (Hsz 304)	1617	80,8	1589	79,4	869	43,4	693	34,6	—	—
	<i>Humicola sp.</i> (Á 22)	1174	58,7	1541	77,0	1424	71,2	720	36,0	—	—

описанной выше питательной среде Ваксмана. В качестве источника углерода в питательную среду вносили 1% глюкозы и устанавливали ее рН на уровнях 1—5, 6, 7, 8, 9 описанным выше способом. Инкубирование проводили в колбах Эрленмайера емкостью в 150 мл, содержащих по 50 мл питательной среды в термостате при 20° С в течение 8 недель. После окончания опыта убыток воды из питательного раствора на испарение восполнили и количество оставшейся в растворе глюкозы определили методом Бертрана. Результаты опыта сведены в табл. 2.

Обсуждение результатов опыта

Из результатов опытов видно, что по способности разлагать целлюлозу отдельные штаммы лучистых грибов и микроскопических грибов резко отличаются друг от друга. Наиболее интенсивно в условиях опыта целлюлозу разлагали участвовавшие в опыте грибы, которые за 12-ти недельный срок инкубации разложили преобладающую часть внесенной целлюлозы. Исследованные лучистые грибы усваивали значительно меньшее количество целлюлозы, наиболее активные штаммы разложили не более 50% целлюлозы, внесенной в начале опыта, а большинство штаммов — еще меньше.

Интенсивность разложения в значительной степени зависит от реакции питательной среды. Из данных, приведенных в табл. 1. видно, что лучистые грибы не только разлагают сравнительно меньше целлюлозы, чем микроскопические грибы, но значительно чувствительнее к реакции среды, чем последние. В то время как лучистые грибы в присутствии целлюлозы способны развиваться лишь при 1—2 значениях рН, грибы развиваются при значительно более широком интервале значений рН — при 4 значениях.

Совсем иные результаты получаются, если в качестве источника углерода использовать не целлюлозу, а глюкозу. В этом случае лучистые грибы способны развиваться на значительно более широкой шкале значений рН, чем при наличии целлюлозы. Хотя результаты исследований, проведенных

Таблица 2.
Использование глюкозы при различных значениях рН

	(1) Наименование микроорганизмов	(2) Количество использованной глюкозы в % к контролю				
		рН 5	рН 6	рН 7	рН 8	рН 9
Лучистые грибы	<i>Str. flavovirens</i> (S ₂₄)	—	100	100	100	—
	<i>Str. flavovirens</i> (S ₉)	51,7	100	100	100	15,7
	<i>Str. flavovirens</i> (S _{2b})	53,9	68,2	94,5	23,5	—
	<i>Act. roseolus</i> (M ₈)	100	100	100	100	—
	<i>Str. oidiosporus</i> (M ₂₀)	15,7	100	100	100	15,7
	<i>Str. antibioticus</i> (M ₆₀)	25,6	61,4	69,0	51,2	9,9
	Серия: Albus (I ₄₀)	100	100	84,0	19,7	—
	Серия: Albosporeus (I ₁)	33,2	23,8	95,0	89,0	—
	Серия: Collinus (I ₅₁)	—	—	56,7	51,4	6,2
грибы	<i>Trichoderma</i> sp.	100	100	100	88,8	—
	<i>Humicola</i> sp. (Hsz 304)	100	100	100	100	7,8
	<i>Penicillium</i> sp. (K 9)	100	100	100	100	10,1

в лабораторных условиях относительные и, вероятно, не являются полностью аналогичным результатам процессов, протекающих в природных условиях, они дают нам право предположить, что нет уверенности в том, что данный штамм лучистых грибов, который при оптимальных лабораторных условиях (рН, температура) довольно интенсивно разлагает целлюлозу, в почве, где эти оптимальные условия довольно часто отсутствуют, также будут использовать в качестве источника энергии целлюлозу. Можно предположить, что в таком случае они будут использовать в качестве пищи скорее более доступные для них различные вторичные продукты разложения (органические кислоты, сахара и др.).

Резюме

Изучали с какой интенсивностью актиномицеты и штаммы микроскопических грибов, изолированные из почв Венгрии, могут использовать в качестве единственного источника энергии клетчатку и в какой степени реакция питательной среды влияет на процесс разложения клетчатки.

Установили что целлюлозоразлагающая способность актиномицетов существенно отличается от целлюлозоразлагающей способности микроскопических грибов. Активнее всего разлагают целлюлозу исследуемые грибы. Актиномицеты разлагают целлюлозу значительно слабее микроскопических грибов.

Интенсивность разложения целлюлозы в большой степени зависит от реакции питательной среды. Актиномицеты не только используют меньше целлюлозы, чем микро-

скопические грибы, но и гораздо чувствительнее к реакции питательной среды. Actinomyces растут на целлюлозе только в узком интервале pH, грибы же имеют более широкий спектр роста.

При замене целлюлозы, которая является источником углерода, глюкозой actinomyces могут развиваться уже в более широких пределах pH. Поэтому нельзя утверждать, что исследуемые нами actinomyces, которые при оптимальных условиях могут использовать целлюлозу, в природе, где подобные условия часто отсутствуют используют целлюлозу в качестве источника энергии. Вероятнее всего, что в подобных условиях источником энергии для них служат легко доступные органические вещества почвы.

The Development of Some Cellulose Decomposing Microorganisms as Affected by the pH Value

J. SZEGI

Research Institute of Soil Science and Agricultural Chemistry of the Hungarian Academy of Sciences, Budapest

Summary

In the course of investigations it was our aim to collect data elucidating the intensity with which Actinomyces and microscopic fungus strains isolated from Hungarian soils, can utilize cellulose as a unique source of energy; further the influence of the reaction of the medium on the process of cellulose decomposition was studied.

It has been found that cellulose decomposing capacity of Actinomyces and microscopic fungi is widely different. The most active cellulose decomposing agents are found among the fungi while the amount of cellulose decomposed by Actinomyces is substantially less as compared with the former.

The intensity of the decomposition of cellulose is influenced by the chemical reaction of the medium to an exceedingly high rate. The Actinomyces not only utilize less cellulose than the microscopic fungi but they are substantially more susceptible to the reaction of the nutrient medium than the latter. Actinomyces are able to grow on cellulose only within a narrow pH interval, while the growth spectrum of the fungi is much broader.

If cellulose used as a carbon source is substituted by glucose, the Actinomyces can grow on a much wider pH range. On the grounds of this finding it is not certain at all that the Actinomyces investigated which under optimum conditions can utilize cellulose, also in the nature where the optimum conditions are often absent would nourish themselves with cellulose. It is more likely that in such cases they rather utilize the more readily available decomposition products as a source of energy, the substances organics of the soil.

Fig. 1. The growth of the Actinomyces strain 1₅₁ on filter paper.

Table 1. Cellulose decomposition at different pH-values. (1) Microorganisms. (2) The weight of decomposed cellulose in mg.

Table 2. Glucose utilization at different pH values (1) Microorganisms. (2) The value of glucose used up (in per cent of the controls).

L'effet du pH sur le développement de quelques microorganismes décomposant la cellulose

J. SZEGI

Institut des Recherches de Pédologie et de Chimie Agricole de l'Académie des Sciences de Hongrie, Budapest

Résumé

Au cours de nos études nous désirions d'obtenir des données relativement à la question avec quelle intensité les races d'actinomycètes et de champignons microscopiques isolées des sols hongrois peuvent-elles utiliser la cellulose comme seule source d'énergie, ensuite nous avons étudié l'effet du pH du milieu nutritif sur la décomposition de la cellulose.

Nous avons établi que le pouvoir de décomposer la cellulose des actinomycètes et des champignons microscopiques diffère essentiellement l'un de l'autre. Les organismes décomposant le plus activement la cellulose se trouvent parmi les champignons, la quantité de la cellulose décomposée par les actinomycètes est considérablement moindre.

Le pH du milieu nutritif influence d'une manière extraordinaire à l'intensité de la décomposition de la cellulose. Les actinomycètes n'utilisent pas seulement moins de cellulose que les champignons microscopiques, mais ils sont aussi plus sensibles envers la réaction du milieu nutritif que ces derniers. Les actinomycètes ne peuvent croître sur la cellulose que dans un intervalle étroit, tandis que le spectre de croissance des champignons est bien plus large.

Si l'on remplace la cellulose par de la glucose les actinomycètes croissent dans des intervalles de pH bien plus larges. D'après cette constatation l'on peut admettre que les actinomycètes étudiés, qui peuvent utiliser la cellulose dans des conditions optimales, ne l'utilisent pas dans les conditions naturelles où les conditions optimales manquent souvent. Il paraît vraisemblable que dans ce cas ils utilisent comme sources d'énergie les produits de décomposition plus facilement utilisable c'est à dire les substances organiques du sol.

Figure 1. La croissance de la souche 1₅₁ d'Actinomycète sur papier filtre.

Tableau 1. La décomposition de la cellulose à divers pH. (1) Microorganismes. (2) Poids de la cellulose décomposée en mg.

Tableau 2. L'utilisation de la glucose à divers pH. (1) Microorganismes. (2) Poids de la glucose consommée (en % des contrôles).

Der Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf das Wachstum einzelner cellulosezersetzender Mikroorganismen

J. SZEGI

Forschungsinstitut für Bodenkunde und Agrikulturchemie der Ungarischen Akademie der Wissenschaften, Budapest

Zusammenfassung

Wir wollten mit unseren Versuchen feststellen, wie die einzelnen Stämme, die wir aus den ungarischen Böden isolierten, die Cellulose als einzige Energiequelle verwenden können. Wir untersuchten außerdem, welchen Effekt die Wasserstoffionenkonzentration des Nährbodens auf die Cellulosezersetzung ausübt.

Wir konnten zwischen den Strahlenpilzen und den mikroskopischen Pilzen bei der Cellulosezersetzung einen großen Unterschied beobachten. Mit größter Aktivität wird die Cellulose von den mikroskopischen Pilzen zersetzt, dagegen ist die Menge, die von den Strahlenpilzen zersetzten Cellulose verhältnismäßig sehr gering.

Der pH-Gehalt des Nährbodens hat einen großen Einfluß auf die Intensität der Cellulosezersetzung. Die Strahlenpilze können nicht nur weniger Cellulose verwenden als die mikroskopischen Pilze sondern sie sind auch in größerem Maße empfindlicher gegenüber dem pH-Wert des Nährbodens als die letzteren. Die Strahlenpilze wachsen nur in einem engen Bereich der pH-Werte, die mikroskopischen Pilze dagegen zeigen diesbezüglich ein größeres Intervall.

Wenn man als Kohlenstoffquelle Glukose verwendet anstatt Cellulose, wachsen die Strahlenpilze in einem viel größeren pH-Bereich. Infolge dieser Ergebnisse kann es bezweifelt werden, daß die untersuchten Strahlenpilze, die bei optimalen Verhältnissen die Cellulose verwenden, auch in der Natur, wo die optimalen Verhältnisse sehr oft fehlen, die Cellulose verwerten können.

Es scheint sehr wahrscheinlich zu sein, daß in den letzteren Fällen diese Mikroorganismen als Energiequelle in erster Linie die leichter aufnehmbaren organischen Stoffe des Bodens.

Abbildung 1. Das Wachstum des Strahlenpilzstammes 1₅₁ auf Filterpapier.

Tabelle 1. Die Cellulosezersetzung bei verschiedenen pH-Werten. (1) Mikroorganismen. (2) Das Gewicht der zersetzten Cellulose in mg.

Tabelle 2. Die Glukoseverwertung bei verschiedenen pH-Werten. (1) Mikroorganismen. (2) Die Menge der verbrauchten Glucose (in Prozenten der Kontrollen).